

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

JULIANA DE ALMEIDA RIBEIRO

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOFILME POR AMOSTRAS CLÍNICAS DE
***Acinetobacter baumannii* DO ESTADO DE MINAS GERAIS**

UBERLÂNDIA

2019

JULIANA DE ALMEIDA RIBEIRO

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOFILME POR AMOSTRAS CLÍNICAS DE
Acinetobacter baumannii DO ESTADO DE MINAS GERAIS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biomedicina da Universidade Federal de Uberlândia como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sabrina Royer

UBERLÂNDIA

2019

JULIANA DE ALMEIDA RIBEIRO

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BIOFILME POR AMOSTRAS CLÍNICAS DE
Acinetobacter baumannii DO ESTADO DE MINAS GERAIS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biomedicina da Universidade Federal de Uberlândia como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Uberlândia, 10 de dezembro de 2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Sabrina Royer - ICBIM/UFU

Dr^a. Melina Lorraine Ferreira - ICBIM/UFU

Prof^a. Dr^a. Raquel Cristina Cavalcanti Dantas - IBTEC/UFU

Dedico esse trabalho aos meus pais Ivan e Mônica, que todos os dias me deram forças para superar as dificuldades e persistir no sonho de fazer faculdade. Obrigado por fazerem o possível e o impossível por mim, com todo amor do mundo.

*“A meta da vida não é a perfeição, mas o eterno processo de aperfeiçoamento,
amadurecimento, refinamento”*

(John Dewey)

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por guiar e iluminar meu caminho, sempre abençoando e dando exatamente o que preciso na hora certa.

Ao meus pais, **Ivan, Mônica** e a meu irmão **Rafael**, que sempre estiveram ao meu lado me apoiando e me dando conselhos nas horas mais difíceis e felizes da minha vida.

Ao meu namorado, **Carlos Henrique**, pelo companheirismo, cuidado, incentivo e apoio.

À minha orientadora, **Prof^ª. Dra. Sabrina Royer**, pela paciência, ensinamentos, amizade e disponibilidade que foram indispensáveis para realização deste trabalho.

À **Profa. Dra. Rosineide Marques Ribas** do Laboratório de Microbiologia Molecular (UFU), por ceder gentilmente o espaço e os materiais necessários ao desenvolvimento da pesquisa.

À **MSc. Iara Rossi Gonçalves** e à **Dra. Cristiane Silveira de Brito** do Laboratório de Microbiologia Molecular (UFU), pelo auxílio na execução do experimento.

Muito obrigada!

RESUMO

Acinetobacter baumannii é um problema crescente em indivíduos hospitalizados, particularmente naqueles imunocomprometidos. As infecções causadas por esse microrganismo estão associadas com maior morbidade, mortalidade, tempo de internação e custos. A importância clínica de *A. baumannii* está relacionada à erradicação difícil, aumento da incidência de amostras multirresistentes, assim como sua capacidade de resistir à desinfecção, persistir por longo tempo em superfícies e produzir biofilme, o que contribui para sua sobrevivência tanto no hospedeiro quanto no ambiente hospitalar. Dessa maneira, o presente estudo teve como objetivo avaliar e comparar a produção de biofilme em amostras clínicas de *A. baumannii*, provenientes de diferentes hospitais e mesorregiões do estado de Minas Gerais. Para o trabalho, foram selecionadas aleatoriamente 10 amostras clínicas previamente caracterizadas, pertencentes a coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia Molecular (MICROMOL) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). A avaliação da produção de biofilme foi realizada através dos ensaios de adesão a superfície inerte, contagem de células viáveis e quantificação de biomassa pelo método do cristal violeta. Todas as amostras avaliadas apresentaram a capacidade de aderir à superfície de poliestireno não modificada e conseguiram produzir biofilme após 24 horas de incubação, independente da origem clínica e perfil de resistência. Assim, o presente estudo demonstrou que a presença de fatores de resistência e a capacidade de formar biofilme em *A. baumannii* podem contribuir para a emergência e a disseminação de fenótipos adaptativos no ambiente hospitalar. Também, a associação entre a produção de biofilme e a multirresistência certamente é um limitante para o tratamento de infecções graves causadas por esse fenótipo.

Palavras-chave: *Acinetobacter baumannii*, biofilme, multirresistência

ABSTRACT

Acinetobacter baumannii is a growing problem in hospitalized individuals, particularly that immunocompromised. Infections caused by this microorganism are associated with higher morbidity, mortality, length of stay and costs. The clinical importance of *A. baumannii* is related to the difficult eradication, increased incidence of multiresistant specimens, as well as its ability to resist disinfection, to persist for a long time on surfaces and to produce biofilm, which contributes to its survival in both host and hospital environment. Thus, the present study aimed to evaluate and compare biofilm production in clinical samples of *A. baumannii* from different hospitals and regions of the state of Minas Gerais. For the study, 10 previously characterized clinical samples were randomly selected, belonging to the culture collection of the Molecular Microbiology Laboratory of the Federal University of Uberlandia. Biofilm production was evaluated by inert surface adhesion, viable cell count and biomass quantification by the crystal violet method. All samples evaluated could adhere to the unmodified polystyrene surface and were able to produce biofilm after 24 hours of incubation, regardless of clinical origin and resistance profile. Thus, the present study demonstrated that the presence of resistance factors and the ability to form biofilm in *A. baumannii* may contribute to the emergence and dissemination of adaptive phenotypes in the hospital environment. Additionally, the association between biofilm production and multidrug resistance is certainly a limiting factor for the treatment of serious infections caused by this phenotype.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, biofilm, multiresistance.

LISTA DE ABREVIATURAS

<	Menor
°C	Graus Celsius
μL	Microlitro
AMI	Amicacina
APS	Ampicilina-sulbactam
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CAZ	Ceftazidima
CDC	<i>Centers for Diseases Control and Prevention</i>
DO	Densidade ótica
CFL	Cefalotina
CFP	Cefoperazona
CIP	Ciprofloxacina
CPM	Cefepime
CRO	Ceftriaxona
CV	Cristal Violeta
et al	E colaboradores
GEN	Gentamicina
IPM	Imipenem
MDR	Multidrug-Resistant, Multirresistente
MER	Meropenem

MI	Mililitro
NOR	Nofloxacina
OMS	Organização Mundial de Saúde
PTZ	Piperacilina/Tazobactam
P	Valor de p
RPM	Rotação por minuto
SUL	Sulfonamida
TSA	<i>Trypticase Soy Agar</i> ; Ágar Triptona de Soja
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i> ; Caldo Triptona de Soja
UFC/mL	Unidade Formadora de Colônia/mililitro
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
WHO	<i>World Health Organization</i> ; Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	11
2.	OBJETIVOS.....	13
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3.1.	Amostras bacterianas.....	14
3.2.	Avaliação da produção de biofilme.....	16
3.2.1.	Preparação do inóculo bacteriano.....	16
3.2.2.	Ensaio de adesão à superfície inerte.....	16
3.2.3.	Contagem de células viáveis no biofilme.....	16
3.2.4.	Produção de biomassa.....	17
3.3.	Análise estatística.....	17
3.4.	Comitê de ética.....	17
4.	RESULTADOS.....	18
5.	DISCUSSÃO.....	20
6.	CONCLUSÃO.....	23
	REFERÊNCIAS.....	24

1. INTRODUÇÃO

Acinetobacter baumannii é um problema crescente para a população hospitalizada principalmente nas Unidades de Terapia Intensiva (UTIs), particularmente em indivíduos imunocomprometidos (DIJKSHOORN; NEMEC; SEIFERT, 2007; CAMP; TATUM, 2010; SANDIUMENGE; RELLO, 2012; DOI; MURRAY; PELEG, 2015), uma vez que infecções causadas por esse microrganismo estão associadas com maior morbidade, mortalidade, tempo de internação e custos (DIJKSHOORN; NEMEC; SEIFERT, 2007; PEREZ et al., 2007; PELEG; SEIFERT; PATERSON, 2008; GORDON; WAREHAM, 2010; LIU et al., 2014; MARAKI et al., 2016). A sua importância clínica está associada com a erradicação difícil, considerando que as opções para tratamento de infecções graves são limitadas devido ao aumento da incidência de amostras multirresistentes (MDR) no ambiente hospitalar (KARAGEORGOPOULOS et al., 2008; MARAGAKIS; PERL, 2008; MICHALOPOULOS; FALAGAS, 2008; VALENCIA et al., 2009; KAYE; POGUE, 2015; HE et al., 2016; TSIOUTIS et al., 2016; GUPTA et al., 2017).

A resistência antimicrobiana em *A. baumannii* pode ser dividida em resistência intrínseca e adquirida. A resistência intrínseca ocorre pela diminuição da permeabilidade da membrana externa, expressão de bombas de efluxo e/ou pela produção de enzimas inativadoras de antibióticos. Já a resistência adquirida é o resultado de mutações em genes cromossômicos e da aquisição horizontal de genes de resistência ocasionando, por exemplo, a hiperexpressão de bombas de efluxo, diminuição da permeabilidade aos antibióticos, alterações no sítio alvo das drogas ou a degradação enzimática dos antimicrobianos (EICHENBERGER; THADEN, 2019).

O mecanismo de resistência adquirida mais relevante presente em *A. baumannii* é a produção de β -lactamases, incluindo serina e metalo- β -lactamases, as quais conferem resistência aos carbapenêmicos (QUEENAN; BUSH, 2007). Essas enzimas são um grupo heterogêneo de β -lactamases, do qual fazem parte a classe A (penicilinas), B (metaloenzimas) e D (oxacilinas) de Ambler, que hidrolisam imipenem e meropenem, além de outras penicilinas e cefalosporinas (QUEENAN; BUSH, 2007). As carbapenemases do tipo oxacilinas (OXA) são mundialmente reconhecidas como o principal mecanismo de resistência aos carbapenêmicos em *Acinetobacter* spp., especialmente no ambiente hospitalar (CARVALHO et al., 2009; WOODFORD; TURTON; LIVERMORE, 2011; LABARCA et al., 2014).

Nessa espécie, dentre as oxacilinas, destacam-se os grupos OXA-51-“like”, OXA-23-“like”, OXA-24/40-“like”, OXA-58-“like” e OXA-143-“like” (POIREL, NAAS,

NORDMANN, 2010; ZANDER et al., 2014). Genes do grupo *bla*_{OXA-51-like} são considerados intrínsecos ao genoma da espécie *A. baumannii* (WALTHER-RASMUSSEN; HØIBY, 2006) e usados como marcador taxonômico (HÉRITIER et al., 2005). Atualmente, o gene *A.b_hyp* também tem sido utilizado como um biomarcador para identificação de *A. baumannii* (HAMOUDA, 2017). No Brasil, a OXA-23 é a principal oxacilinase responsável pela resistência aos carbapenêmicos nos hospitais (DALLA-COSTA et al., 2003; CARVALHO et al., 2009; MARTINS et al., 2009; MOSTACHIO et al., 2009; ROYER et al., 2015).

É consenso que a resistência bacteriana é um fator importante no aumento dos índices de mortalidade em pacientes criticamente doentes (AZEVEDO, 2005), e que as infecções por amostras resistentes vêm aumentando expressivamente, tornando-se um problema de saúde pública (HAMBRAEUS, 2006). Neste contexto, destaca-se a importância clínica de *A. baumannii*, considerando seus níveis crescentes de resistência, sua capacidade de resistir à desinfecção, persistir por longo período de tempo em superfícies e produzir biofilme, o que contribui para sua sobrevivência tanto no hospedeiro quanto no ambiente hospitalar (VILA; MARTÍ; SÁNCHEZ-CÉSPEDES, 2007; KEMPF; ROLAIN, 2012).

Dessa forma, além dos genes de resistência, a virulência das cepas, particularmente a capacidade de produzir biofilme, contribui para sua persistência e disseminação nos hospitais. (LONGO; VUOTTO; DONELLI, 2014). Os biofilmes são comunidades bacterianas nas quais as células se aderem umas às outras e a uma superfície viva ou inerte (FLEMMING; WINGENDER, 2010). Estas células aderentes são envolvidas em uma matriz de polímero extracelular composta principalmente por polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos (LAPPIN-SCOTT, BASS, 2001; FLEMMING; WINGENDER, 2010). Esse estilo de vida microbiano permite que as bactérias suportem condições ambientais hostis, como a escassez de nutrientes, dessecação e as torna capazes de causar uma ampla gama de doenças e infecções graves (ROY et al., 2018).

A matriz do biofilme envolve as bactérias tornando-as tolerantes às condições adversas e ainda mais resistentes aos tratamentos antimicrobianos (NA et al., 2016; ROY et al., 2018), atuando como uma barreira à difusão dos mesmos, imobilizando-os (FLEMMING; WINGENDER, 2010). Ela é também responsável pela geração de gradientes nutricionais, o que pode resultar em declínio na taxa de crescimento e redução na atividade metabólica bacteriana, levando a um aumento da quantidade de células persistentes (metabolicamente inertes) (FLEMMING; WINGENDER, 2010). Como a maioria dos antimicrobianos são eficazes apenas contra células em crescimento, as células persistentes do biofilme resistem àqueles que conseguem ultrapassar a matriz (HE et al., 2015; NA et al., 2016). Isso é comprovado através

de estudos que indicam que bactérias em biofilmes podem ser de 10 a 1000 vezes mais resistentes aos antibióticos quando comparadas às mesmas células planctônicas (MAH; O'TOOLE, 2001; GIRARD et al., 2010; HENGZHUANG et al., 2011).

Fica claro a partir de evidências epidemiológicas que o biofilme de *A. baumannii* desempenha um papel importante nas doenças infecciosas, devido sua habilidade de colonização e multiplicação em dispositivos médicos invasivos (FLEMMING; WINGENDER, 2010; EZE; CHENIA; ZOWALATY, 2018; HARDING; HENNON; FELDMAN, 2018). Nesse contexto, foram selecionadas para este trabalho amostras de *A. baumannii* de diversos hospitais e mesorregiões do estado de Minas Gerais, que apresentaram elevados índices de resistência aos carbapenêmicos e que ainda não haviam sido analisadas quanto à produção de biofilme. Dessa forma, o presente estudo procurou responder algumas questões ainda não completamente esclarecidas sobre esse importante patógeno e seus mecanismos de virulência.

2. OBJETIVOS

Considerando a necessidade de realizar estudos que permitam compreender melhor a produção de biofilme de amostras de *Acinetobacter baumannii* obtidas de diferentes hospitais e mesorregiões do estado de Minas Gerais, foram propostos os seguintes objetivos:

- Analisar e comparar a formação de biofilme por amostras de *Acinetobacter baumannii* através das técnicas de adesão, produção de biomassa por cristal violeta e contagem de células viáveis;
- Avaliar a relação entre a multirresistência e a formação de biofilme;
- Avaliar a relação entre os diferentes sítios de isolamento das amostras e a formação de biofilme.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostras bacterianas

Foram avaliadas 10 amostras clínicas de *Acinetobacter baumannii* previamente caracterizadas e pertencentes a coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia Molecular (MICROMOL) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), obtidas de diferentes hospitais do estado de Minas Gerais, nos anos de 2015 e 2016. A tabela 1 demonstra a caracterização das amostras de *A. baumannii* analisadas nesse estudo.

Tabela 1. Caracterização das amostras de *Acinetobacter baumannii* selecionadas para o estudo

Amostras	Data de Isolamento	Mesorregião de MG	Perfil de resistência	Genótipo de Oxacilinase*/ <i>A.b_hyp</i>	Sítio de Infecção
P01	2016	Sul e Sudoeste	AMI, APS, CAZ, CFL, CIP, CPM, GEN, MER	<i>bla</i> _{OXA-51} ⁺ ; <i>bla</i> _{OXA-23} ⁺ / <i>A.b_hyp</i> ⁺	Ferida
P03	2016	Triângulo Mineiro	AMI, CAZ, CFL, CFP, CIP, CRO, IMP, MER, NOR, SUL	<i>bla</i> _{OXA-51} ⁻ ; <i>bla</i> _{OXA-23} ⁻ / <i>A.b_hyp</i> ⁺	Sangue
P04	2016	Triângulo Mineiro	AMI, CAZ, CFP, CIP, CRO, GEN, IMP, MER, PTZ	<i>bla</i> _{OXA-51} ⁺ ; <i>bla</i> _{OXA-23} ⁺ / <i>A.b_hyp</i> ⁺	Sangue
18	2015	Triângulo Mineiro	APS, CIP, CPM, IPM, MER	<i>bla</i> _{OXA-51} ⁺ ; <i>bla</i> _{OXA-23} ⁺ / <i>A.b_hyp</i> ⁺	Secreção traqueal
P21	2016	Norte	AMI, APS, CAZ, CFP, CRO, GEN, IMP, MER, PTZ, SUL	<i>bla</i> _{OXA-51} ⁺ ; <i>bla</i> _{OXA-23} ⁺ / <i>A.b_hyp</i> ⁺	Ponta de cateter
P22	2016	Norte	AMI, APS, CAZ, CIP, CPM, CRO, IMP, MER	<i>bla</i> _{OXA-51} ⁺ ; <i>bla</i> _{OXA-23} ⁻ / <i>A.b_hyp</i> ⁻	Swab retal
P24	2016	Norte	AMI, APS, CAZ, CFL, CIP, CPM, GEN, IMP, MER	<i>bla</i> _{OXA-51} ⁺ ; <i>bla</i> _{OXA-23} ⁺ / <i>A.b_hyp</i> ⁺	Swab retal
P25	2016	Norte	AMI, APS, CAZ, CIP, CRO, IMP, PTZ, MER, SUL	<i>bla</i> _{OXA-51} ⁺ ; <i>bla</i> _{OXA-23} ⁻ / <i>A.b_hyp</i> ⁻	Secreção traqueal
P26	2016	Norte	AMI, APS, CAZ, CIP, CRO, IMP, MER, PTZ, SUL	<i>bla</i> _{OXA-51} ⁺ ; <i>bla</i> _{OXA-23} ⁺ / <i>A.b_hyp</i> ⁺	Urina
120	2016	Triângulo Mineiro	AMI, APS, CIP, CPM, IPM, MER	<i>bla</i> _{OXA-51} ⁺ ; <i>bla</i> _{OXA-23} ⁺ / <i>A.b_hyp</i> ⁺	Sangue

*Todas amostras negativas para os genes *bla*_{OXA-24}, *bla*_{OXA-58} e *bla*_{OXA-143}; AMI, amicacina; APS, ampicilina/sulbactam; CAZ, ceftazidima, CFL, cefalotina; CFP, cefoperazona; CRO, ceftriaxona; CIP, ciprofloxacina; CPM, cefepime; GEN, gentamicina; IMP, imipenem; MER, meropenem; NOR, norfloxacina; PTZ, piperacilina/tazobactam; SUL, sulfonamida.

3.2. Avaliação da produção de Biofilme

Os ensaios de produção de biofilme foram realizados em 10 amostras clínicas de *Acinetobacter baumannii*, obtidas de diferentes hospitais do estado de Minas Gerais. Como controle positivo foi utilizada a cepa *A. baumannii* ATCC 19606 e como controle negativo apenas o meio de cultura sem inóculo bacteriano. A pesquisa de biofilme foi realizada segundo o protocolo proposto por Rodríguez-Baño e colaboradores (2008) com algumas modificações, conforme descrito abaixo. Todos os experimentos foram repetidos em três ensaios independentes.

3.2.1. Preparação do inóculo bacteriano

Uma colônia bacteriana de cada amostra teste de *A. baumannii* foi suspensa em 20 mL de caldo TSB (*Tryptic Soy Broth*), seguindo-se incubação a 37°C, durante 18 horas (*overnight*), sob agitação a 120 rpm.

3.2.2. Ensaio de adesão à superfície inerte

A suspensão celular obtida pelo crescimento *overnight* ($\sim 10^9$ células/mL) foi lavada duas vezes em solução salina estéril (20mL NaCl 0,9%, 7800 rpm, 10 minutos) e diluída para uma concentração celular de aproximadamente 10^7 células/mL em caldo TSB. 200 μ L dessa suspensão de células foram transferidas para microplaca de poliestireno estéril com 96 poços, utilizando-se 3 poços para cada amostra testada. As placas foram incubadas por 2 horas a 37°C sob agitação a 120 rpm. Após o período de adesão, os poços foram raspados para remoção das células aderidas (*scrapping*) por tempo determinado (1 minuto e 30 segundos). Diluições seriadas foram realizadas e as suspensões celulares plaqueadas em agar TSA (*Tryptic Soy Agar*) para enumeração das células.

3.2.3. Contagem de células viáveis no biofilme

Foram realizados dois ensaios diferentes para formação de biofilme, um para enumeração de células viáveis do biofilme e outro para quantificação de biomassa. A suspensão celular

obtida pelo crescimento *overnight* ($\sim 10^9$ células/mL) foi diluída para uma concentração celular de aproximadamente 10^7 células/mL. Para cada amostra, 200 μ L dessa suspensão de células foi inoculada em 3 poços da microplaca de poliestireno estéril. Após 24 horas de incubação, os poços foram raspados para remoção das células aderidas (*scrapping*) por tempo determinado (1 minuto e 30 segundos). Diluições seriadas foram realizadas e as suspensões celulares plaqueadas em Agar TSA para enumeração das células.

3.2.4. Produção de biomassa

Para os ensaios de quantificação de biomassa por cristal violeta, cada bactéria teste foi inoculada em 8 poços da microplaca. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C sob agitação a 120 rpm. Os biofilmes foram lavados duas vezes com solução salina estéril e, em seguida, os poços foram preenchidos com metanol por 15 minutos para fixação do biofilme. Após esse período, o metanol foi descartado e as placas secas em posição invertida à temperatura ambiente. Em seguida, 200 μ L de uma solução de cristal violeta 1% foram adicionados em cada poço por 5 minutos. Os poços foram lavados vigorosamente com água destilada estéril e secos à temperatura ambiente. 200 μ L de solução de ácido acético 33% foram adicionados a cada poço para solubilizar o corante. A microplaca foi incubada por 10 minutos, à temperatura ambiente. 100 μ L da solução de cristal violeta solubilizado foram transferidos para nova placa e a absorbância avaliada em leitor a 570 nm com solução de ácido acético 33% como branco.

3.3. Análise Estatística

Os ensaios quantitativos foram comparados por meio de análise de variância simples (One way ANOVA) ou pelo teste de Kruskal-Wallis, utilizando como pós-testes os testes de comparação múltipla de Bonferroni ou Dunn's, quando apropriado. Todos os testes foram realizados com um intervalo de confiança de 95%, sendo os resultados obtidos através do software GraphPad Prism[®], versão 6.0, considerando significativo $P < 0,05$.

3.4. Comitê de Ética

Uma vez que as amostras utilizadas no trabalho são parte da coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia Molecular (MICROMOL) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), e o trabalho não envolveu a participação de pacientes, tornou-se desnecessária a aprovação pelo comitê de ética em pesquisa.

4. RESULTADOS

Para avaliação da formação de biofilme foram selecionadas aleatoriamente 10 amostras clínicas de *Acinetobacter baumannii*, pertencentes a coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia Molecular (MICROMOL) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), representativas de diferentes regiões do estado de Minas Gerais. Todas as amostras apresentaram os genes *bla_{oxa-51}* e/ou *A.b_{hyp}*, marcadores taxonômicos da espécie, e todas exibiram resistência aos carbapenêmicos, assim como perfil de multirresistência. As principais características das amostras estão representadas na tabela 1.

Todas as amostras de *A. baumannii* avaliadas aderiram à superfície de poliestireno não modificada no período de 2 horas (Fig. 1A). Adicionalmente, apresentaram número superior de células viáveis após 24 horas de incubação quando comparadas ao ensaio de adesão. As amostras P01, P04, P21 e P26 apresentaram significativamente maior número de células viáveis quando comparadas ao controle (ATCC 19606) (Fig. 1B). Em relação à quantificação da produção de biomassa, avaliada pelo ensaio de cristal violeta, foi possível inferir que as amostras P01, P04 e P26 foram capazes de produzir estatisticamente maior quantidade de biomassa quando comparadas com a amostra controle (Fig 1C).

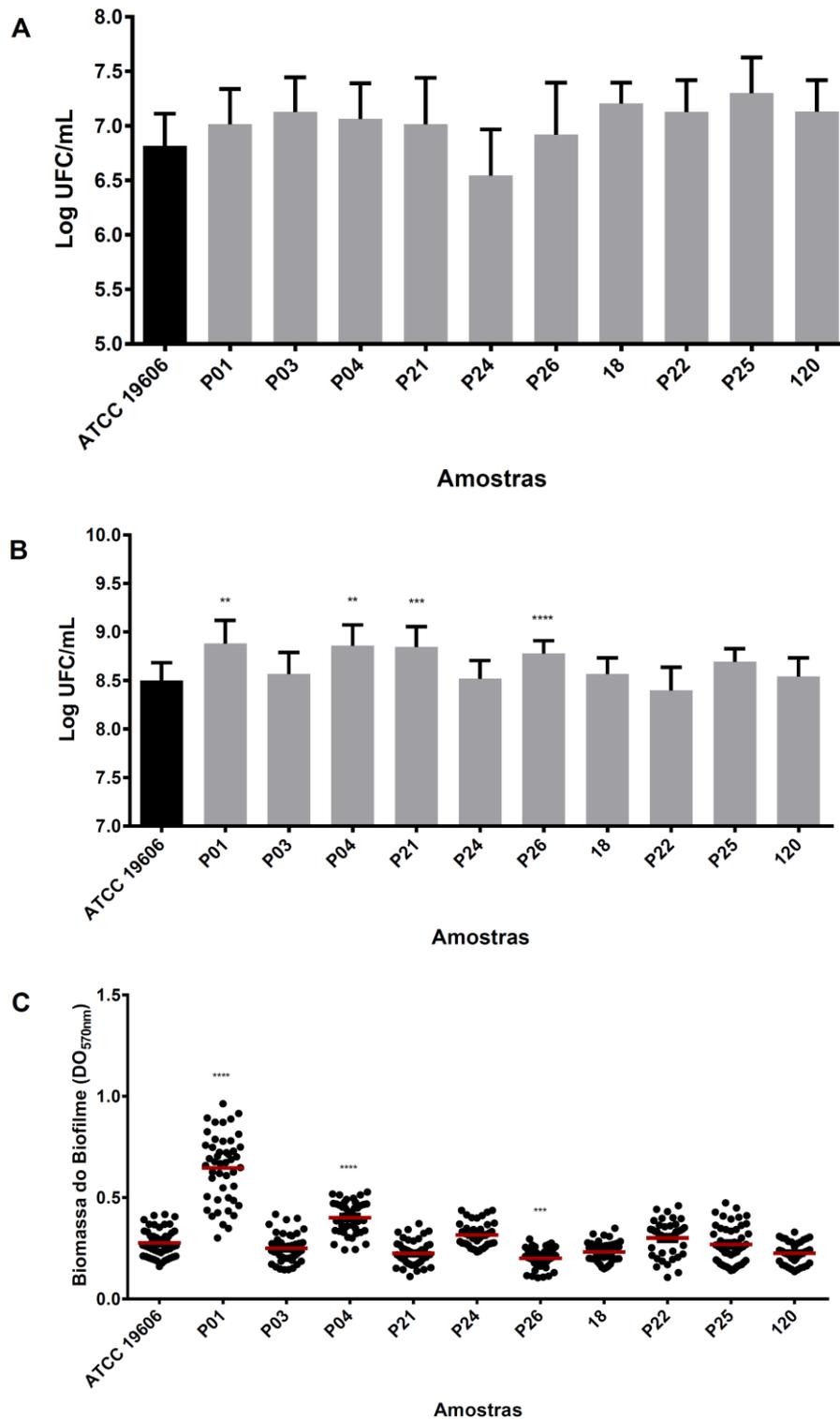


Figura 1. Avaliação do número de células aderidas, formação de biofilme e biomassa em 10 amostras clínicas de *A. baumannii*, providas de diferentes mesorregiões de Minas Gerais. (A) Número de células aderidas em placas de poliestireno após 2 h de contato; (B) Concentração celular do biofilme; (C) Biomassa do biofilme expressa como densidade óptica do cristal violeta (DO_{570nm}). Resultados representam médias com desvio padrão (barras de erro) de três experimentos independentes. * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$, no teste de Kruskal-Wallis e comparação múltipla de Dunn. Amostra de *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 foi utilizada como controle.

5. DISCUSSÃO

Acinetobacter baumannii é um patógeno nosocomial que causa infecções graves, como pneumonia associada à ventilação mecânica e infecção de corrente sanguínea em pacientes críticos, e a disseminação de cepas multirresistentes (MDR) desse microrganismo é motivo de preocupação global (HARDING; HENNON; FELDMAN, 2018).

Infecções causadas por *A. baumannii* representam ~2% de todas as infecções associadas à assistência médica nos Estados Unidos (MAGILL et al., 2014) e na Europa (LOB et al., 2016), já na Ásia e Oriente Médio, essas taxas são duas vezes maiores (LOB et al., 2016). No Brasil, os bacilos Gram-negativos multirresistentes, incluindo *A. baumannii*, têm surgido como os principais agentes de infecções relacionadas à assistência à saúde (RARO et al., 2016; ROYER et al., 2015; GONÇALVES et al., 2016; ROSSI et al., 2017).

Diante desses dados, o CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) categorizou *Acinetobacter* spp. MDR como uma ameaça séria, levando a atividades contínuas de monitoramento e prevenção da saúde pública (CDC, 2013). Além disso, a OMS incluiu *A. baumannii* resistente aos carbapenêmicos no grupo crítico da lista de bactérias que representam a maior ameaça à saúde humana, priorizando os esforços de pesquisa e desenvolvimento para novos tratamentos antimicrobianos (WHO, 2017).

As carbapenemases do tipo oxacilinasas (OXA) são mundialmente reconhecidas como o principal mecanismo de resistência aos carbapenêmicos em *Acinetobacter* spp. (CARVALHO et al., 2009; WOODFORD; TURTON; LIVERMORE, 2011; LABARCA et al., 2014) e o aumento dessas taxas de resistência se devem principalmente à disseminação de amostras produtoras de OXA-23 (DALLA-COSTA et al., 2003; CARVALHO et al., 2009; MARTINS et al., 2009; MOSTACHIO et al., 2009; HIGGINS; LEHMANN; SEIFERT, 2010; CHAGAS et al., 2014; ROYER et al., 2015; VASCONCELOS et al., 2015). No presente estudo, todas as amostras selecionadas exibiram resistência aos carbapenêmicos, em sua maioria pela presença do gene *bla*_{OXA-23}.

Além da resistência aos carbapenêmicos, o que dificulta consideravelmente o tratamento de infecções causadas por esse patógeno, a presença de fatores de virulência, como a capacidade de formação de biofilme, pode contribuir para a emergência e a disseminação dos fenótipos multirresistentes no ambiente hospitalar. A formação de biofilme é crucial, não só para a

sobrevivência do microrganismo no ambiente, mas também para o seu sucesso como patógeno (VUOTTO et al., 2014; DUARTE et al., 2016).

O biofilme é uma comunidade bacteriana envolvida por uma matriz de polímeros extracelulares produzida pelas próprias bactérias e que confere proteção contra diversos tipos de agressões como: antibióticos, condições ambientais e agentes químicos, colaborando dessa forma para a maior sobrevivência e crescimento das células (EZE; CHENIA; ZOWALATY, 2018). A estrutura do biofilme é dinâmica e se inicia a partir da adesão de células planctônicas em uma superfície abiótica (KUMAR et al., 2017; HARDING; HENNON; FELDMAN, 2018). Esta primeira etapa é considerada reversível, sendo mediada por interações físico-químicas e eletrostáticas entre os substratos e as bactérias (ULETT et al., 2007). Posteriormente, as células passam a secretar substâncias que serão responsáveis pela formação da matriz, resultando em uma adesão irreversível e o desenvolvimento da arquitetura do biofilme maduro, com poros e canais de água que funcionam como um sistema de troca de nutrientes, oxigênio e metabólitos que precisam ser secretados (STOODLEY et al., 2002). Por fim, ocorre a ruptura do biofilme, devido ao aumento de células e a escassez de nutrientes, ocorrendo a liberação de células que irão se deslocar para novos ambientes iniciando uma nova colonização (KUMAR et al., 2017).

A taxa de formação de biofilme em *A. baumannii* é de 80 a 91%, e essa alta produção é um importante fator de virulência, característico da espécie (ZEIGHAMI et al., 2019). Em estudos prévios (THUMMEEPAK et al., 2016; SUNG, 2018; ZEIGHAMI et al., 2019), verificou-se que cerca de 75% dos isolados de *A. baumannii* possuíam a capacidade de produzir biofilme, e quando se tratava de amostras clínicas, essa produção era ainda maior em amostras MDR (LEE et al., 2008; SANCHEZ et al., 2013; NAPARSTEK et al., 2014; ZEIGHAMI et al., 2019). Esses dados corroboram com as amostras selecionadas e avaliadas nesse estudo, as quais apresentaram perfil de multirresistência, segundo os critérios estabelecidos por Magiorakos e colaboradores (2012).

Neste estudo, foi verificado que todas as amostras de *A. baumannii* avaliadas, provindas de diferentes hospitais e mesorregiões de Minas Gerais, têm a capacidade de aderir à superfície de poliestireno não modificada, passo considerado essencial, e conseguem produzir biofilme após 24 horas de incubação, independente do perfil de resistência, confirmando assim uma das principais características dessa espécie.

A fim de quantificar a biomassa do biofilme utilizou-se, neste trabalho, a metodologia do cristal violeta. A coloração em microplacas é um método amplamente utilizado para análise da produção de biofilme em diferentes bactérias e em diferentes condições, e o ensaio de cristal

violeta é atualmente o mais utilizado para a quantificação de biomassa do biofilme (AZEREDO et al., 2016; OMMEN; ZOBEEK; MEYER, 2017). Neste estudo, verificou-se que as amostras P01, P04 e P26 produzem mais biomassa quando comparadas com a amostra controle. Adicionalmente, corroborando com o trabalho de Sanchez e colaboradores (2013), inferimos que a amostra P01 produziu mais biomassa quando comparada com as demais amostras pelo fato de ter sido isolada de sítio não-fluido (amostra de ferida), quando comparada com as demais, isoladas de fluidos como urina, secreção traqueal e sangue. Como não analisamos a estrutura da matriz do biofilme, não podemos justificar detalhadamente esse resultado.

O cristal violeta (CV) é um corante básico que se liga negativamente corando a matriz das bactérias e circundando o biofilme, porém este método não é totalmente confiável uma vez que o corante se liga a fragmentos de células mortas e vivas, podendo acarretar alterações na quantificação da biomassa de células viáveis (PEETERS; NELIS; COENYE, 2007). Vale ressaltar ainda, que o CV é um reagente cancerígeno, classificado como resíduo tóxico, o que torna o seu manuseio ainda mais complexo (OMMEN; ZOBEEK; MEYER, 2017).

Foi verificado que as amostras P03, P21, P24, 18, P22, P25 e 120 não apresentaram diferença significativa na produção de biomassa quando comparadas com a amostra controle, e esse resultado pode ter ocorrido devido a falhas na técnica de coloração. A etapa de lavagem do CV busca retirar fragmentos de células mortas e células não aderidas, porém, essa fase pode resultar no deslocamento e remoção de algumas células bacterianas sésseis (AZEREDO et al., 2016). Também, durante o processo de lavagem, ao mergulhar a placa em água, ocorre o contato da amostra com uma interface ar-líquido em movimento, o que leva ao desprendimento de um número imprevisível de microrganismos aderidos (GÓMEZ-SUÁREZ et al., 2001; AZEREDO et al., 2016).

A maioria dos estudos publicados avalia a produção de biofilme apenas pelo ensaio de cristal violeta, sem enumerar as células do biofilme. O ensaio de cristal de violeta é uma medida indireta da biomassa do biofilme e, apesar de sua versatilidade, é pouco reprodutível especialmente devido às etapas de lavagem, podendo subestimar ou superestimar os resultados (AZEREDO et al., 2016). Nosso trabalho avaliou também o número de células viáveis no biofilme revelando que todos os isolados testados apresentam número considerável de células após 24 horas de incubação, resultado que sugere a limitação do ensaio de cristal violeta.

Algumas alternativas têm sido utilizadas a fim de minimizar os problemas técnicos encontrados na utilização do cristal violeta. Um dos exemplos é a utilização da resazurina,

considerada um corante não tóxico, barato e com protocolo padronizado (AZEREDO et al., 2016). A safranina também vem sendo utilizada como método de coloração alternativo ao cristal violeta, por ser não tóxica e possuir alta reprodutibilidade, resultado igualmente eficiente, além de fácil manuseio (OMMEN; ZOBEEK; MEYER, 2017). Devido condições técnico-financeiras não conseguimos utilizar os dois últimos corantes com a finalidade de comparar os resultados com o cristal violeta.

Apesar das limitações técnicas encontradas durante a execução do trabalho, este estudo demonstra que a formação de biofilme é uma característica prevalente entre as várias cepas de *A. baumannii* testadas, o que corrobora com achados prévios (DONLAN, 2001; LEE et al., 2008; ESPINAL; MARTI; VILA, 2012; SANCHEZ et al., 2013; HOIBY et al., 2014; KRZYSCIANK et al., 2017; ZEIGHAMI et al., 2019). A presença de fatores de resistência e virulência, como a capacidade de formar biofilme em *A. baumannii*, podem contribuir para a emergência e a disseminação de fenótipos altamente adaptativos no ambiente hospitalar. Também, a associação entre a produção de biofilme e a multirresistência certamente é um limitante para o tratamento de infecções causadas por esse fenótipo.

6. CONCLUSÃO

Acinetobacter baumannii possui grande importância clínica devido aos seus mecanismos de resistência e virulência, como a capacidade de formação de biofilme, e sua alta prevalência ocasionando infecções graves em pacientes imunocomprometidos.

Dessa forma, os resultados deste estudo comprovaram que amostras de *A. baumannii* são capazes de aderir à superfície de microplacas de poliestireno não modificadas e produzir biofilme, independentemente da sua origem clínica/sítio de infecção, confirmando assim uma das principais características dessa espécie.

Identificamos também que o protocolo de cristal violeta é um método falho, particularmente devido aos processos de lavagens durante os quais pode ocorrer o desprendimento de células aderidas, dificultando a quantificação exata da biomassa. Dessa maneira, há a necessidade de uma melhor padronização e utilização de protocolos alternativos que empreguem outras colorações para a quantificação da biomassa, como os corantes não tóxicos safranina ou resazurina.

REFERÊNCIAS

- AZEREDO, J. *et al.* Critical review on biofilm methods. **Journal of Critical Reviews in Microbiology**, v. 43, n. 3, p: 313-351, 2016.
- AZEVEDO, F. M. Micro-organismos multirresistentes. In: OLIVEIRA, A. C. **Infecções hospitalares: epidemiologia, prevenção e controle**. 3a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.
- CAMP, C.; TATUM, O.L. A Review of *Acinetobacter baumannii* as a Highly Successful Pathogen in Times of War. **LabMedicine**, v. 41, n. 11, p: 649-657, 2010.
- CARVALHO, K.R. *et al.* Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes carrying blaOXA23 collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 34, n. 1, p: 25-8, 2009.
- Centers for Disease Control and Prevention**. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013. Disponível em : < <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf> > acesso em 03 nov.2019.
- CHAGAS, T.P. *et al.* Characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Brazil (2008-2011): countrywide spread of OXA-23-producing clones (CC15 and CC79). **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v. 79, n. 4, p: 468-72, 2014.
- DALLA-COSTA, L.M. *et al.* Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme in Curitiba, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 7, p: 3403-6, 2003.
- DIJKSHOORN, L.; NEMEC, A.; SEIFERT, H. An increasing threat in hospitals: multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 12, p: 939-51, 2007.
- DOI, Y.; MURRAY G.L.; PELEG, A.Y. *Acinetobacter baumannii*: evolution of antimicrobial resistance treatment options. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 36, n. 1, p: 85–98, 2015.
- DONLAN, R.M. Biofilm Formation: A Clinically Relevant Microbiological Process. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, n. 8, p: 1387-1392, 2001.
- DUARTE, A. *et al.* Clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from a Portuguese hospital: PFGE characterization, antibiotic susceptibility and biofilm-forming ability. **Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases**, v. 45, p: 29-33, 2016.
- EICHENBERGER, E.M.; THADEN, J.T. Epidemiology and mechanisms of resistance of extensively drug resistant gram-negative bacteria. **Antibiotics**, v. 8, n. 2, p: 1-21, 2019.
- ESPINAL, P.; MARTÍ, S.; VILA, J. Effect of biofilm formation on the survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. **Journal of Hospital Infection**, v. 80, n. 1, p: 56-60, 2012.

- EZE, E.C.; CHENIA, H.Y.; ZOWALATY, M.E.E. *Acinetobacter baumannii* biofilms: effects of physicochemical factors, virulence, antibiotic resistance determinants, gene regulation, and future antimicrobial treatments. **Infection and Drug Resistance**, v. 11, p: 2277-2299, 2018.
- FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 9, p: 623-633, 2010.
- GIRARD, L.P. *et al.* MIC versus MBEC to determine the antibiotic sensitivity of *Staphylococcus aureus* in peritoneal dialysis peritonitis. **Peritoneal Dialysis International**, v. 30, n. 6, p: 652-656, 2010.
- GÓMEZ-SUÁREZ, C.; BUSSCHER, H.J.; VAN DER MEI, H.C. Analysis of bacterial detachment from substratum surfaces by the passage of air-liquid interfaces. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 67, n. 6, p: 2531-2537, 2001.
- GORDON, N.C.; WAREHAM, D.W. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 35, n. 3, p: 219-226, 2010.
- GUPTA, R. *et al.* Epidemiology of multidrug-resistant Gram-negative pathogens isolated from ventilator-associated pneumonia in ICU patients. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 9, p: 47-50, 2017.
- HAMBRAEUS, A. Lowbury lecture 2005. Infection control from a global perspective. **Journal of Hospital Infection**, v. 64, n. 3, p: 217-223, 2006.
- HAMOUDA, A. Identification of *Acinetobacter baumannii* of Human and Animal Origins by a Gene-Specific PCR. **Current Microbiology**, v. 74, n. 9, p: 1118-1122, 2017.
- HARDING, C.M.; HENNON, S.W.; FELDMAN, M.F. Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. **Nature reviews microbiology**, v. 16, n. 2, p: 91-102, 2018.
- HE, H. *et al.* Tigecycline combination for ventilator-associated pneumonia caused by extensive drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Thoracic Disease**, v. 8, n. 10, p: 2784-2792, 2016.
- HE, X. *et al.* Biofilm Formation Caused by Clinical *Acinetobacter baumannii* Isolates Is Associated with Overexpression of the AdeFGH Efflux Pump. **Antimicrobials Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 8, p: 4817-25, 2015.
- HENGZHUANG, W. *et al.* Pharmacokinetics/pharmacodynamics of colistin and imipenem on mucoid and nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 9, p: 4469-4474, 2011.
- HÉRITIER, C. *et al.* Characterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 10, p: 4174-9, 2005.
- HIGGINS, P.G.; LEHMANN, M.; SEIFERT, H. Inclusion of OXA-143 primers in a multiplex polymerase chain reaction (PCR) for genes encoding prevalent OXA

carbapenemases in *Acinetobacter* spp. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 35, n. 3, p: 305, 2010.

HOIBY, N. *et al.* Study Group for Biofilms and Consulting External Expert Werner Zimmerli. ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 1, n. 25, p: 1-25, 2019.

KARAGEORGOPOULOS, D.E. *et al.* Tigecycline for the treatment of multidrug-resistant (including carbapenem-resistant) *Acinetobacter* infections: a review of the scientific evidence. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, n. 1, p: 45-55, 2008.

KAYE, K.S.; POGUE, J.M. Infections Caused by Resistant Gram-Negative Bacteria: Epidemiology and Management. **Pharmacotherapy**, v. 35, n. 10, p: 949-62, 2015.

KEMPF, M.; ROLAIN, J.M. Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 39, n. 2, p: 105-14, 2012.

KUMAR, A. *et al.* Biofilms: Survival and defense strategy for pathogens. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 307, n. 8, p: 481-489, 2017.

LABARCA, J.A. *et al.* Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in the nosocomial setting in Latin America. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 42, n. 2, p: 276-92, 2014.

LAPPIN-SCOTT, H.M.; BASS, C. Biofilm formation: attachment, growth, and detachment of microbes from surfaces. **American Journal of Infection Control**, v. 29, n. 4, p: 250-251, 2001.

LEE, C.R. *et al.* Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. 55, 2017.

LIU, Q. *et al.* Efficacy and safety of polymyxins for the treatment of *Acinetobacter baumannii* infection: a systematic review and meta-analysis. **PLoS One**, v. 9, n. 12, p: 98091, 2014.

LOB, S.H. *et al.* Regional differences and trends in antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter baumannii*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 47, n. 4, p: 317-323, 2016.

LONGO, F.; VUOTTO, C.; DONELLI, G. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. **New Microbiologica**, v. 37, n. 2, p: 119-127, 2014.

MAGILL, S.S. *et al.* Multistate Point-Prevalence Survey of Health Care–Associated Infections. **The New England Journal of Medicine**, v. 370, n. 13, p: 1198-1208, 2014.

MAGIORAKOS, A.P. *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**. V. 18, n. 3, p: 268-281, 2012.

MAH, T. F.; O'TOOLE, G. A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 1, p: 34-9, 2001.

MARAKI, S. *et al.* A 5- year Surveillance Study on Antimicrobial Resistance of *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates from a Tertiary Greek Hospital. **Infection & Chemotherapy**, v. 48, n. 8, p: 190-198, 2016.

MARAGAKIS, L.L.; PERL, T.M. *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 8, p: 1254-63, 2008.

MARAGAKIS, L.L. *et al.* A 5- year Surveillance Study on Antimicrobial Resistance of *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates from a Tertiary Greek Hospital. **Infection & Chemotherapy**, v. 48, n. 8, p: 190-198, 2016.

MARTINS, A.F. *et al.* Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme: dissemination in Southern Brazil. **Infection**, v. 37, n. 5, p: 474-6, 2009.

MICHALOPOULOS, A.; FALAGAS, M.E. Colistin and polymyxin B in critical care. **Critical Care Clinics**, v. 24, n. 2, p: 377-91, 2008.

MOSTACHIO, A.K. *et al.* Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding oxacillinases and metallo- β -lactamases in carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, n. 11, p: 1522-1524, 2009.

NA, I.Y. *et al.* Comparison of the Virulence-Associated Phenotypes of Five Species of *Acinetobacter baumannii* Complex. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 1, p: 171-9, 2016.

NAPARSTEK, L. *et al.* Biofilm formation and susceptibility to gentamicin and colistin of extremely drug-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 4, p: 1027-34, 2014.

OMMEN, P.; ZOBEL, N.; MEYER, R. Quantification of biofilm biomass by staining: Non-toxic safranin can replace the popular crystal violet. **Journal of Microbiological Methods**, v.141, p: 87-89, 2017.

World Health Organization (WHO). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery and development of new antibiotics. WHO 2017. Disponível em > http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPLShort_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1 > Acesso em 13 nov. 2019.

PELEG, A.Y. *et al.* *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 3, p: 538-82, 2008.

PEETERS, E.; NELIS, H.J.; COENYE, T. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilm grown in microtiter plates. **Journal Microbiology Methods**, v. 72, n. 2, p: 157-165, 2008.

PEREZ, F. *et al.* Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 10, p: 3471-84, 2007.

POIREL, L.; NASS, T.; NORDMANN, P. Diversity, Epidemiology, and Genetics of Class D –Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 1, p: 24-38, 2010.

QUEENAN, A.M.; BUSH, K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. **Clinical microbiology reviews**, v. 20, n. 3, p: 440-58, 2007.

RARO, O.H.F. *et al.* Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* contamination in an intensive care unit. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 2, p: 167-172, 2016.

RODRÍGUEZ-BAÑO, J. *et al.* Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*: associated features and clinical implications. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, n. 3, p: 276-8, 2008.

ROSSI, F. *et al.* Emergence of colistin resistance in the largest university hospital complex of São Paulo, Brazil, over five years. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, p: 98-101, 2017.

ROY, R. *et al.* Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. **Virulence**, v. 9, n. 1, p: 522-554, 2018.

ROYER, S. *et al.* Spread of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* clones in patients with ventilator-associated pneumonia in an adult intensive care unit at a university hospital. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 19, n. 4, p: 350-7, 2015.

SANCHEZ, C. J. JR. *et al.* Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, n. 47, p: 13-47, 2013.

SANDIUMENGE, A; RELLO, J. Ventilator-associated pneumonia caused by ESKAPE organisms: cause, clinical features, and management. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, v. 18, n. 3, p: 187-93, 2012.

SAXENA, S. *et al.* Comparative Study of Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Patients of Lower Respiratory Tract Infection. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 8, n. 5, p: 9-11, 2014.

STOODLEY, P. *et al.* Biofilm as Complex Differentiated Communities. **Annual Review of Microbiology**, v. 56, p: 187-209, 2002.

SUNG, J. Molecular Characterization and Antimicrobial Susceptibility of Biofilm-forming *Acinetobacter baumannii* Clinical isolates from Daejeon, Korea. **Korean Journal of Clinical Laboratory Science**, v. 50, n.2, p: 100-109, 2018.

THUMMEEPAK, R. *et al.* Distribution of virulence genes involved in biofilm formation in multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. **International Microbiology**, v. 19, n. 2, p: 121-129, 2016.

TSIOUTIS, C. *et al.* Clinical epidemiology, treatment and prognostic factors of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* ventilator-associated pneumonia in critically ill patients. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 48, n. 5, p: 492-497, 2016.

ULETT, G.C. *et al.* Functional Analysis of Antigen 43 in Uropathogenic *Escherichia coli* Reveals a Role in Long-Term Persistence in the Urinary Tract. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 7, p: 3233-3244, 2007.

VALENCIA, R. *et al.* Nosocomial outbreak of infection with pan-drug resistant *Acinetobacter baumannii* in a tertiary care university hospital. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 30, n. 3, p: 257-63, 2009.

VILA, J.; MARTÍ, S.; SÁNCHEZ-CÉSPEDES, J. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, n. 6, p: 1210-5, 2007.

VASCONCELOS, A.T. *et al.* The changing epidemiology of *Acinetobacter* spp. producing OXA carbapenemases causing bloodstream infections in Brazil: a BrasNet report. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 83, n. 4, p: 382-5, 2015.

VUOTTO, C. *et al.* Antibiotic Resistance Related to Biofilm Formation in *Klebsiella pneumoniae*. **Pathogens**, v.3, n.3, p: 743-58, 2014.

WALTHER-RASMUSSEN, J.; HØIBY, N. OXA-type carbapenemases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. 3, p: 373-83, 2006.

WOODFORD, N.; TURTON, J.F.; LIVERMORE, D.M. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 35, n. 5, p: 736-55, 2011.

ZANDER, S. *et al.* Characterization of *bla*_{OXA-143} Variants in *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter pittii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 5, p: 2704-2708, 2014.

ZEIGHAMI, H. *et al.* Virulence characteristics of multidrug resistant biofilm forming *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care unit patients. **BMC Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, p: 629, 2019.