

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

SARA CAROLLINE RIBEIRO DA FONSECA

Identificação de fatores de virulência relacionados ao biofilme em cepas clínicas de *Acinetobacter baumannii*: abordagens fenotípicas e moleculares

UBERLÂNDIA

2024

SARA CAROLLINE RIBEIRO DA FONSECA

Identificação de fatores de virulência relacionados ao biofilme em cepas clínicas de *Acinetobacter baumannii*: abordagens fenotípicas e moleculares

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC II) apresentado à Coordenação do curso de Biomedicina, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

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

Coorientadora: Me. Vitelhe Ferreira de Almeida

UBERLÂNDIA

2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Identificação de fatores de virulência relacionados ao biofilme em cepas clínicas
de *Acinetobacter baumannii*: abordagens fenotípicas e moleculares

SARA CAROLLINE RIBEIRO DA FONSECA

Orientadora: Profa. Dra. Sabrina Royer

Coorientador: Ms. Vitelhe Ferreira de Almeida

Banca examinadora:

Profa. Dra. Sabrina Royer

Prof. Dr. Vinícius Lopes Dias

Me. Elias Rodrigues de Almeida Junior

Uberlândia – MG

2024

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha profunda gratidão em primeiro lugar a Deus por me conceder forças e sabedoria ao longo de toda a minha jornada. Sou grata a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho. Suas orientações, apoio e incentivo foram fundamentais para que eu pudesse concluir este TCC com êxito.

Agradeço de coração à minha família pelo amor incondicional, apoio emocional e compreensão durante os momentos dedicados ao TCC. Sem o suporte de vocês, este trabalho não teria sido possível. Obrigada por sempre acreditarem em mim. Expresso também minha gratidão ao meu noivo, Frederico Martins, por seu constante apoio.

À minha orientadora, Sabrina Royer, expresso minha profunda gratidão por sua orientação, paciência e expertise ao longo deste processo. Suas sugestões e *feedbacks* foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho, e sou imensamente grata por sua dedicação e comprometimento.

Agradeço também à minha coorientadora e amiga, Vitelhe Almeida, pelos momentos de colaboração e aprendizado compartilhado.

Aos meus amigos de graduação, especialmente Bruna Tessaro e Gabriela Moreira, agradeço o apoio e companheirismo ao longo dessa jornada acadêmica.

Expresso minha gratidão à Universidade Federal de Uberlândia (UFU) que me proporcionou a oportunidade de possuir um ensino superior e a expansão de meus horizontes.

Agradeço à professora Dra. Rosineide Marques Ribas pela generosidade dos recursos e oportunidades que foram fundamentais para a realização deste trabalho. Expresso também minha gratidão a toda a equipe do Laboratório de Microbiologia Molecular da Universidade Federal de Uberlândia (MICROMOL) por me receber de braços abertos e por proporcionar inúmeras possibilidades e oportunidades, criando assim um ambiente propício ao aprendizado e à pesquisa.

Muito Obrigada!

RESUMO

Introdução: *Acinetobacter baumannii* representa uma séria ameaça clínica, tanto por seu papel como um importante patógeno em Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS), quanto pela escassez de opções terapêuticas, devido à sua alta capacidade de adquirir resistência antimicrobiana e persistência no ambiente hospitalar, agravada pela habilidade de formação de biofilme. **Objetivo:** Analisar e comparar a formação fenotípica de biofilme por cepas clínicas de *A. baumannii*, assim como a presença de genes de virulência associados ao biofilme. **Metodologia:** Foram avaliadas seis cepas clínicas de *A. baumannii* previamente caracterizadas, obtidas de pacientes internados no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU), durante os anos de 2015 e 2016. A formação fenotípica de biofilme foi avaliada através das técnicas de adesão, produção de biomassa por cristal violeta e contagem de células viáveis, e a detecção dos genes de virulência (*bfmS*, *bap*, *csuE*, *csuA*, *adeH*, *pgaA*, *abaI*, *ptk*, *plcD*) através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional. **Resultados:** Todas as cepas exibiram resistência aos carbapenêmicos e apresentaram capacidade de aderir à superfície inerte. Adicionalmente, apresentaram um número superior de células viáveis após 24 horas de incubação. A produção de biofilme, avaliada pelo ensaio de cristal violeta, revelou que 50% dos isolados testados foram capazes de formar biofilme. A análise da amplificação dos genes de virulência por PCR indicou que todos os isolados carregavam pelo menos sete dos nove genes testados, sendo os mais prevalentes *bfmS* (sistema de regulação), *csuE* (montagem de pili), *ptk* (formação de cápsula) e *plcD* (fosfolipase), presente em todas as cepas. **Conclusão:** O presente estudo, apesar de não encontrar relação entre a formação de biofilme, o perfil de resistência das cepas analisadas e a presença dos genes de virulência testados, levanta questões importantes sobre o tema. A habilidade de formar biofilme, associada com a presença de diferentes genes de virulência, pode contribuir para a emergência e a disseminação de fenótipos adaptativos no ambiente hospitalar. Aprofundar a análise gênica e seus mecanismos de regulação seria essencial para aprimorar a compreensão desses fenômenos.

Palavras-chave: *Acinetobacter baumannii*; biofilme; virulência; PCR.

ABSTRACT

Introduction: *Acinetobacter baumannii* represents a serious clinical threat, both due to its role as an important pathogen in Healthcare-associated infections (HAIs) and the lack of therapeutic options, as to its high capacity to acquire antimicrobial resistance and persistence in the hospital environment, increased by its ability to form biofilm. **Objective:** To analyze and compare the phenotypic biofilm formation of clinical strains of *A. baumannii*, as well as the presence of biofilm-associated virulence genes. **Methodology:** Six previously characterized clinical strains of *A. baumannii*, obtained from patients admitted to the Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU) during the years 2015 and 2016, were evaluated. Phenotypic biofilm formation was assessed using adhesion techniques, biomass production by crystal violet staining, and viable cell counting, while detection of virulence genes (*bfmS*, *bap*, *csuE*, *csuA*, *adeH*, *pgaA*, *abaI*, *ptk*, *plcD*) was performed using conventional Polymerase Chain Reaction (PCR) technique. **Results:** All strains exhibited resistance to carbapenems and demonstrated the ability to adhere to inert surfaces. Moreover, they exhibited a higher count of viable cells following 24 hours of incubation. Evaluation of biofilm formation, conducted through the crystal violet assay, indicated that 50% of the tested isolates were capable to form biofilm. Analysis of virulence gene amplification via PCR revealed that all isolates carried at least seven out of the nine tested genes, with the most prevalent being *bfmS* (regulatory system), *csuE* (pilus assembly), *ptk* (capsule formation), and *plcD* (phospholipase), which were present in all strains. **Conclusion:** Despite not finding a relationship between biofilm formation, the resistance profile of the analyzed strains, and the presence of the tested virulence genes, this study raises significant matter in this field. The capacity for biofilm formation, coupled with the presence of different virulence genes, could potentially foster the emergence, and spread of adaptive phenotypes within hospital settings. Delving deeper into gene analysis and its regulatory mechanisms is imperative for enhancing comprehension of these phenomena.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*; biofilm; virulence; PCR.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	07
2. OBJETIVOS	10
2.1 Objetivo geral	10
2.2 Objetivos específicos	10
3. METODOLOGIA	10
3.1 Cepas bacterianas	10
3.2 Avaliação da produção de Biofilme	12
3.2.1 Preparação do inóculo bacteriano	12
3.2.2 Ensaio de adesão à superfície inerte	12
3.2.3 Contagem de células viáveis no biofilme	12
3.2.4 Produção de biomassa	13
3.2.5 Classificação do biofilme	13
3.3 Técnicas moleculares	14
3.3.1 Detecção dos genes de virulência pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) ...	14
3.4 Análise estatística	15
3.5 Comitê de ética	15
4. RESULTADOS	16
5. DISCUSSÃO	19
6.CONCLUSÃO	23
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24

1. INTRODUÇÃO

As Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) representam um grande desafio para a saúde pública no Brasil e no mundo, contribuindo para o aumento das taxas de morbidade e mortalidade entre os pacientes afetados (LEONCIO et al., 2019). Essa questão é especialmente preocupante entre segmentos mais vulneráveis da população, como idosos, crianças e indivíduos imunocomprometidos, que exercem pressão adicional sobre os sistemas de saúde (KHAN; BAIG; MEHBOOB, 2017). Além disso, as IRAS frequentemente estão associadas a patógenos altamente resistentes a antimicrobianos, comprometendo a eficácia dos tratamentos médicos e favorecendo a disseminação de cepas resistentes (URZEDO et al., 2020).

Entre os principais microrganismos associados às IRAS, *Acinetobacter baumannii* destaca-se devido à sua plasticidade na aquisição de mecanismos de resistência e virulência, assim como pela capacidade de adaptação e sobrevivência em diferentes ambientes, como superfícies e dispositivos invasivos (EZE; CHENIA; ZOWALATY, 2018; CAVALCANTE et al., 2019). Essa habilidade é uma das principais razões para sua persistência e sucesso como patógeno oportunista, podendo causar infecções graves em pacientes imunocomprometidos, sendo as mais frequentes as infecções de corrente sanguínea, pneumonia associada à ventilação mecânica e infecções no trato urinário (HARDING; HENNON; FELDMAN, 2018; GEDEFIE et al., 2021; TIKU, 2022). A importância clínica desta bactéria decorre da sua erradicação difícil, considerando as limitadas opções para tratamento de infecções graves em decorrência do aumento da prevalência de amostras multirresistentes (MDR), extensivamente resistentes (XDR) e pan-resistentes (PDR) no ambiente hospitalar (KYRIAKIDIS et al., 2021).

O fenótipo de resistência às múltiplas drogas em *A. baumannii* é mediado por vários mecanismos de resistência, incluindo a modificação de sítio alvo, inativação enzimática, efluxo ativo e diminuição no influxo dos antimicrobianos (DIJKSHOORN; NEMEC; SEIFERT, 2007, LEE et al., 2017). A resistência pode ser intrínseca, devido à produção de cefalosporinases codificadas cromossomicamente, além da baixa permeabilidade de membrana, ou adquirida, após a transferência de genes ou mutação de genes estruturais ou regulatórios (YOON; COURVALIN; GRILLOT-COURVALIN, 2013; IBRAHIM, et al., 2021).

Atualmente, a produção de β -lactamases, especialmente da classe D (oxacilinas/OXA), permanece como o mecanismo de resistência aos antimicrobianos mais relevante em *A. baumannii* (RAMIREZ; BONOMO; TOLMASKY, 2020). Diversos grupos dessas enzimas foram identificados nesse microrganismo, incluindo as intrínsecas, como a OXA-51, e as adquiridas, como a OXA-23, OXA-58, OXA-24/40, OXA-143 e OXA-235

(HAMIDIAN; NIGRO, 2019). A disseminação de clones carreando o gene *bla_{OXA-23}*, associados a outros mecanismos de resistência, como perda de porinas e hiperexpressão de bombas de efluxo, podem explicar a prevalência de isolados MDR, XDR e PDR em surtos no ambiente hospitalar (IBRAHIM et al., 2021).

Além da resistência, a virulência das cepas, particularmente a capacidade de produzir biofilme, contribui para sua persistência e disseminação nos hospitais. Os biofilmes caracterizam-se como uma comunidade complexa de bactérias que se aderem umas às outras, sendo capazes de se ligar a diferentes superfícies, sejam elas vivas, como tecidos humanos, ou inertes, como dispositivos médicos invasivos (MEA; YONG; WONG, 2021). 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, mudança de temperatura e dessecação (CHOUDHARY; SHRIVASTAVA; VASHISTT, 2022). As bactérias inseridas dentro de um biofilme podem escapar das respostas imunes do hospedeiro e resistir aos tratamentos antimicrobianos até 1000 vezes mais do que suas contrapartes planctônicas, as tornando capazes de causar uma ampla gama de doenças e infecções graves (LEWIS, 2021).

Existem diversos fatores de virulência envolvidos na formação de biofilme de *A. baumannii*. Têm-se observado que algumas proteínas codificadas por determinados genes, parecem ser indispensáveis para o êxito desse patógeno no ambiente e nas interações com seus hospedeiros, tais como: proteínas associadas ao biofilme (*bap*), pili (*csuABCDE*), sistema de regulação (*bfmRS*), sistema de comunicação celular/*quorum sensing* (*abaI*), polissacarídeos (*pgaABCD*), formação de cápsula (*ptk*), sistemas de efluxo (*adeH*) e fosfolipases (*plcD*) (Quadro 1) (GADDY; ACTIS, 2009; HARDING; HENNON; FELDMAN, 2018; HUA et al., 2021; SILVA et al., 2021; TIKU, 2022). Até o momento, permanece incerto como esses fatores de virulência contribuem para a formação de biofilme e a resistência aos antibióticos. A investigação dessa relação é fundamental para aprimorar a compreensão das interações desse microrganismo no ambiente e com os hospedeiros, podendo resultar em intervenções potenciais que impactem o prognóstico dos pacientes.

Quadro 1. Genes associados à formação de biofilme em *A. baumannii*

Gene	Produto gênico	Função	Referência
<i>bfmS</i>	Sistema de regulação (<i>BfmRS</i>)	Auxiliar na formação e manutenção de biofilme em superfícies abióticas e resistência antimicrobiana.	ROY et al., 2022
<i>bap</i>	Proteína associada ao biofilme	Auxiliar na formação de biofilme promovendo a adesão das células bacterianas a superfícies bióticas e abióticas.	UPMANYU; HAQ; SINGH, 2022
<i>csuABCDE</i>	Sistema de transporte e montagem de pili (fimbrias)	Auxiliar na montagem de pili e formação de biofilme em superfícies abióticas.	EZE; CHENIA; ZOWALATY, 2018 GEDEFIE et al., 2021
<i>adeH</i>	Sistemas de efluxo	Sintetizar e transportar de moléculas auto indutoras; contribui para a resistência do patógeno a vários antibióticos.	EZE; CHENIA; ZOWALATY, 2018 ZHU et al., 2022
<i>pgaA</i>	Polissacarídeos	Estimular a formação de polímeros dos principais componentes da matriz extracelular.	CHOI et al., 2009
<i>abaI</i>	Sistema de comunicação celular/ <i>quorum sensing</i>	Regular o sistema <i>quorum sensing</i> .	GEDEFIE et al., 2021
<i>ptk</i>	Formação do fator de virulência cápsula.	Tem associação com a formação de cápsula e formação de biofilme.	MENDES et al., 2023
<i>plcD</i>	Sistema de fosfolipases	Facilitar a invasão bacteriana nas células do hospedeiro.	ZHU et al., 2022

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Este estudo tem como objetivo analisar e comparar a formação fenotípica de biofilme em cepas clínicas de *A. baumannii* provenientes de infecções graves, além de detectar a presença de genes de virulência associados ao biofilme.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar e comparar a formação fenotípica de biofilme por cepas clínicas de *A. baumannii* através das técnicas de adesão, produção de biomassa por cristal violeta e contagem de células viáveis;
- Avaliar a presença de genes de virulência associados ao biofilme de *A. baumannii* (*bfmS*, *bap*, *csuE*, *csuA*, *adeH*, *pgaA*, *abaI*, *ptk*, *plcD*) pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional;
- Examinar a relação entre a formação de biofilme, o fenótipo de resistência a antibióticos e a presença dos genes de virulência em isolados clínicos de *A. baumannii*.

3. METODOLOGIA

3.1 Cepas bacterianas

Foram avaliadas seis cepas clínicas de *A. baumannii* previamente caracterizadas e pertencentes a coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia Molecular (MICROMOL) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), obtidas de pacientes internados no Hospital de Clínicas da UFU (HC-UFU). As cepas foram selecionadas a partir de dados preliminares como perfil de resistência e sítio de infecção. A tabela 1 exhibe alguns dados dos isolados clínicos de *A. baumannii* estudados.

Tabela 1. Caracterização das cepas selecionadas para o estudo

Cepa	Data de Isolamento	Sítio de Infecção	Diagnóstico de internação	Unidade de internação	Evolução	Perfil de resistência	Genótipo de Oxacilinase
Ab78	22/10/2015	Sangue	Câncer de bexiga	UTI	Óbito	IMP, MER	<i>bla_{OXA-51}⁺; bla_{OXA-23}⁺</i>
Ab 84	26/10/2015	Sangue	Neoplasia maligna de encéfalo	UTI	Óbito	APS, CPM, CIP, IMP, MER	<i>bla_{OXA-51}⁺; bla_{OXA-23}⁺</i>
Ab 92	08/12/2015	Sangue	Adenocarcinoma	ONCO	Óbito	IMP, MER	<i>bla_{OXA-51}⁺; bla_{OXA-23}⁺</i>
Ab 106	23/02/2016	Sangue	Politrauma	UTI	Óbito	AMI, APS, CPM, CIP, IMP, MER, TIG	<i>bla_{OXA-51}⁺; bla_{OXA-23}⁺</i>
Ab 114	09/03/2016	Sangue	Oclusão arterial	UTI	Óbito	CPM, CIP, IMP, MER	<i>bla_{OXA-51}⁺; bla_{OXA-23}⁺</i>
Ab 120	15/03/2016	Sangue	Hepatite C	CM	Óbito	AMI, APS, CPM, CIP, IMP, MER	<i>bla_{OXA-51}⁺; bla_{OXA-23}⁺</i>

UTI, Unidade de Terapia Intensiva; ONCO, Oncologia; CM, Clínica Médica; AMI, amicacina; APS, ampicilina/sulbactam; CPM, cefepime; CIP, ciprofloxacina; IMP, imipenem; MER, meropenem; TIG, tigeciclina.

3.2 Avaliação da produção de Biofilme

As seis cepas clínicas de *A. baumannii* previamente selecionadas foram utilizadas para a realização dos ensaios de produção de biofilme. Como controle positivo foi utilizada a cepa *A. baumannii* ATCC 19606 e como controle negativo apenas o meio de cultura (caldo TSB) sem inóculo bacteriano. A pesquisa de biofilme foi realizada segundo o protocolo proposto por Rodríguez-Baño e colaboradores (2008) com algumas modificações, conforme descrito a seguir. Todos os experimentos foram repetidos em três ensaios independentes.

3.2.1 Preparação do inóculo bacteriano

Uma colônia bacteriana de cada cepa 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, 15 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 duas 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). E em seguida foram realizadas diluições seriadas e as suspensões celulares foram 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 foram inoculadas em três 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). E em seguida foram realizadas diluições seriadas e as suspensões celulares foram 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 oito poços da microplaca. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C sob agitação a 120 rpm. Os biofilmes foram lavados três 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 foram secas em posição invertida à temperatura ambiente. Em seguida, 200 µL de uma solução de cristal violeta 0,5% foram adicionados em cada poço por cinco minutos. Os poços foram lavados com água destilada estéril e secos à temperatura ambiente. 200 µL de solução de ácido acético 33% foram adicionados a cada poço para solubilizar o corante. A microplaca foi incubada por dez minutos, à temperatura ambiente. 100 µL da solução de cristal violeta solubilizado foram transferidos para nova placa e a absorbância foi avaliada em leitor a 560 nm com solução de ácido acético 33% como branco.

3.2.5 Classificação do biofilme

Após o experimento de quantificação da biomassa por cristal violeta, as amostras foram classificadas nas categorias de não produtor, fraco produtor, moderado produtor e forte produtor de biofilme, de acordo com os critérios descritos por Saxena e colaboradores (2014), com modificações (Tabela 2).

Tabela 2. Critérios para classificação da produção de biofilme

Valor médio da DO	Produção de Biofilme
$DO_i^1 \leq DO_c^2$	Não produtor/ Biomassa indetectável*
$DO_c < DO_i \leq 2 \times DO_c$	Fraco produtor
$2 \times DO_c < DO_i \leq 4 \times DO_c$	Moderado produtor
$4 \times DO_c < DO_i$	Forte produtor

Valor de *cut-off* da densidade ótica (DO): média da DO controle negativo + 3x desvio padrão; ¹DO_i da amostra; ²DO_c do controle negativo. *A biomassa pode não ter sido detectada por limitações técnicas (vide discussão).

3.3 Técnicas moleculares

3.3.1 Detecção dos genes de virulência pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para avaliar a presença dos genes de virulência *bfmS*, *bap*, *csuE*, *csuA*, *adeH*, *pgaA*, *abaI*, *ptk* e *plcD*, foi realizada a técnica de PCR convencional com *primers* consensos para cada gene. Os *primers* foram desenhados e validados *in silico*, para este estudo (Tabela 3). Foram utilizados reagentes para um volume final de reação de 25 µL, conforme descrito na tabela 4. Como controle positivo da reação foi utilizada a cepa *A. baumannii* ATCC 19606.

Tabela 3. Lista de primers para detecção dos genes de virulência utilizados nesse estudo

Gene	Sequência (5' – 3')	Temperatura de anelamento (°C)	Produto amplificado (pb)
<i>bfmS</i>	F: TGCCGTTAGAGCGCAAATC R: TTGCCATTTTCATCGCTTCCC	55	105
<i>bap</i>	F: ACCCAGGTTTGAATGATGGC R: TTGCTGGGCCTGATGTATTG	55	75
<i>csuE</i>	F: TCTTTTTAGCGGGCCTGATG R: TTTAACGGTGAGTCGGCTTG	55	99
<i>csuA</i>	F: GCGGGTGAAATCGGAGCTAA R: ACCCCTTTAAAAGCTGTGGT	50	146
<i>adeH</i>	F: AGCAAACCTCGTGGTGAATGG R: TTGCTGCCACCGCTTTTAG	55	106
<i>pgaA</i>	F: TTAGAGGGCGTTCAAAAGCG R: AGCAAACCTCGGCCTTTTTCG	55	137
<i>abaI</i>	F: TCAAATCCGCCTTCCTCTAGC R: TTGCGCCTTGTTCTCTTGC	52	98
<i>ptk</i>	F: AGTTGCACGTTTCGGTTAACC R: ACCTGCTCAGTTCGCAAAAG	55	127
<i>plcD</i>	F: TGTCATGTTGGTTGGAGCTG R: AACGGTGTTGTTGAGCACTG	55	113

Tabela 4. Reagentes para realização da Reação em Cadeia da Polimerase

Reagentes	Volume	Concentração final
DNA ¹	-	-
<i>primer forward</i> (10 uM)	0,75 µL	0,3 µM
<i>primer reverse</i> (10 uM)	0,75 µL	0,3 µM
GoTaq® Green Master Mix, 2x	12,5 µL	1x
Água ultrapura autoclavada	q.s.p. 25 µL	n.a.

¹Parte de uma colônia bacteriana isolada.

A amplificação foi realizada no termociclador Eppendorf Mastercycler®, programado de acordo com as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por dois minutos; seguido de 30 ciclos com desnaturação a 95°C por 30 segundos; anelamento à temperatura específica de cada primer por um minuto, extensão a 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por cinco minutos.

A eletroforese correu a 90V por cerca de 40 minutos em gel de agarose 1,5%, no tampão de corrida TBE (Tris, Ácido bórico e EDTA) [0,5x]. O gel foi corado com 5 µL de SYBER® Safe (Applied Biosystems®) para cada 100 mL de tampão e fotografado utilizando o sistema de fotodocumentação L-Pix EX (Loccus Biotecnologia®).

3.4 Análise estatística

Para a avaliação do biofilme, 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%, considerando significativo $P < 0,05$. As análises foram realizadas utilizando-se o programa estatístico GraphPad Prism® 9.0 (San Diego, CA).

3.5 Comitê de Ética

Considerando que as amostras empregadas neste estudo fazem parte do acervo de culturas do Laboratório de Microbiologia Molecular (MICROMOL) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), a necessidade de aprovação pelo comitê de ética em pesquisa tornou-se dispensável.

4. RESULTADOS

Tanto para a avaliação fenotípica da formação de biofilme quanto para a detecção dos genes de virulência associados ao biofilme através da técnica de PCR convencional, foram selecionadas seis cepas clínicas de *A. baumannii*, isoladas de amostras de sangue de pacientes internados no HC-UFU, conforme apresentado na tabela 1. Todas as cepas exibiram resistência aos carbapenêmicos.

Para o ensaio de biofilme, no período de duas horas, observou-se que todas as cepas de *A. baumannii* avaliadas aderiram à superfície de poliestireno não modificada, com 66,6% (4/6) dos isolados apresentando taxas de adesão superiores e estatisticamente significativas em relação ao controle (Fig. 1A). Adicionalmente, apresentaram um número superior de células viáveis após 24 horas de incubação, quando comparadas ao ensaio de adesão (Fig. 1B). Todas as cepas exibiram um número significativamente menor 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 cepas Ab 78, Ab 106, Ab 114 e Ab 120 produziram uma quantidade significativamente menor de biomassa em comparação com o controle ($p < 0,05$) (Fig 1C).

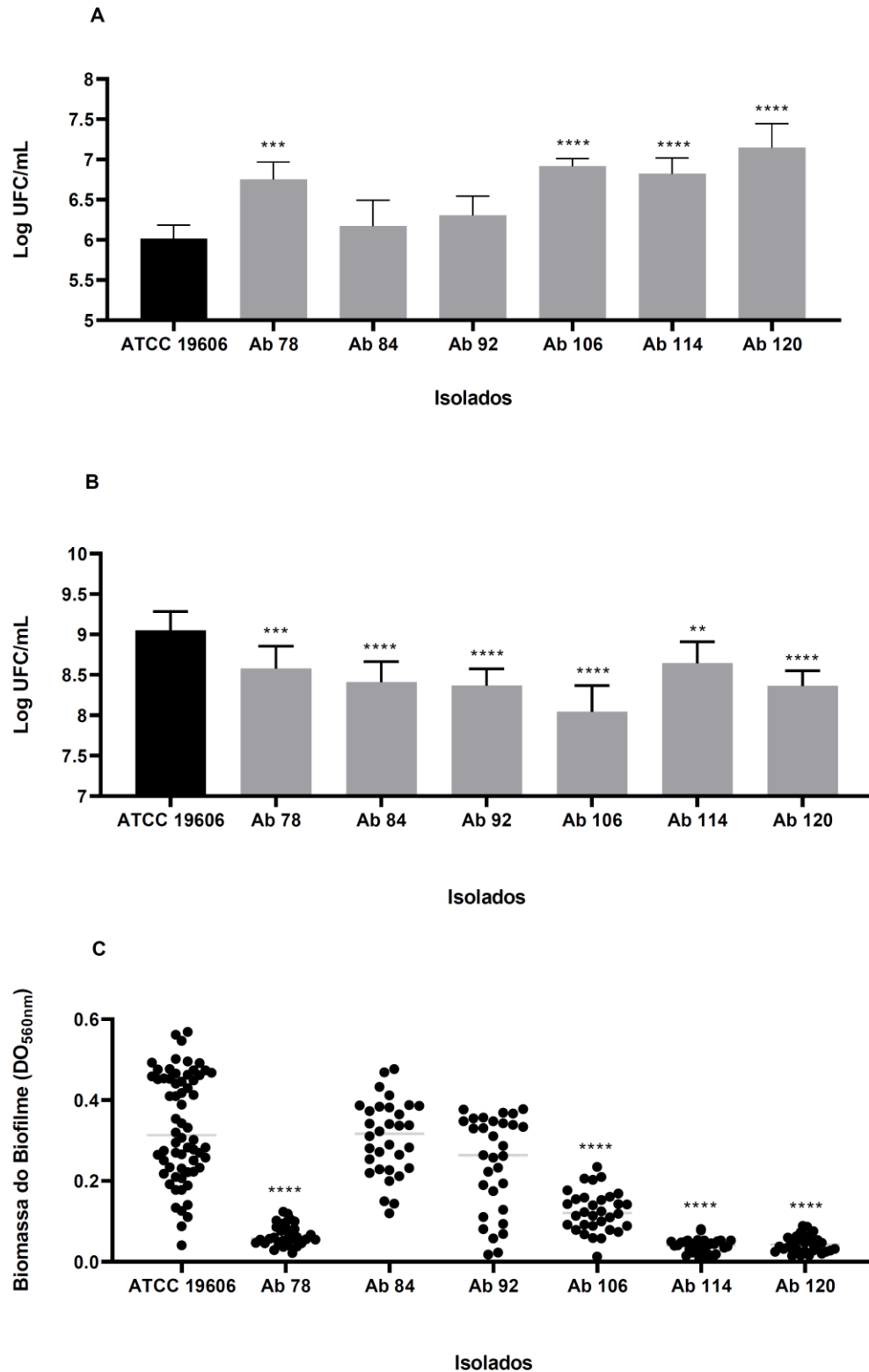


Figura 1. Avaliação do número de células aderidas, formação de biofilme e biomassa em 6 isolados clínicos de *A. baumannii*. (A) Número de células aderidas em placas de poliestireno após 2 h de contato; (B) Concentração celular do biofilme; (C) Biomassa do biofilme expressa como densidade óptica do cristal violeta (DO_{560nm}). Resultados representam médias com desvio padrão (barras de erro) de três experimentos independentes. ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$, **** $p < 0,00001$, no teste de Kruskal-Wallis e comparação múltipla de Dunn. *A. baumannii* ATCC 19606 foi utilizado como controle.

A média da densidade da biomassa do biofilme das cepas de *A. baumannii* foi de $0,16 \pm 0,06$. A produção de biofilme, avaliada pelo método quantitativo, revelou que um isolado (16,6%; 1/6) foi classificado como moderado produtor de biofilme, assim como o controle ATCC 19606, dois (33,3%; 2/6) foram considerados fraco produtores, e três isolados (50%; 3/6) não-produtores de biofilme (Tabela 5).

A amplificação dos genes de virulência (*bfmS*, *bap*, *csuE*, *csuA*, *adeH*, *pgaA*, *abaI*, *ptk* e *plcD*) indicou que todos os seis isolados clínicos de *A. baumannii* carregavam pelo menos sete desses genes relacionados à formação de biofilme (Tabela 5). Os genes mais prevalentes foram *bfmS*, *csuE*, *ptk* e *plcD*, presente em todas as cepas. A ocorrência dos genes *bap*, *csuA*, *adeH*, *pgaA* e *abaI* foi de 66,6% (4/6), 83,3% (5/6), 83,3% (5/6), 66,6% (4/6) e 16,6% (1/6), respectivamente. Observou-se a coexistência de até oito genes em um mesmo isolado, como notado na cepa Ab 92, e sete genes nos demais isolados.

Não foi encontrada relação entre a habilidade de produção de biofilme, o perfil de resistência, e a presença dos genes de virulência associados ao biofilme.

Tabela 5. Produção de biofilme, multirresistência e presença de genes de virulência associados ao biofilme em cepas clínicas de *A. baumannii*

Cepas	DO ¹	Produção de biofilme	Fenótipo de Resistência	Genes								
				<i>bfmS</i>	<i>bap</i>	<i>csuE</i>	<i>csuA</i>	<i>adeH</i>	<i>pgaA</i>	<i>abaI</i>	<i>ptk</i>	<i>plcD</i>
ATCC 19606 (controle)	0,33	Moderado	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ab 78	0,07	Não produtor	Não-MDR ²	+	+	+	+	-	+	-	+	+
Ab 84	0,31	Moderado	MDR	+	-	+	+	+	+	-	+	+
Ab 92	0,24	Fraco	Não-MDR	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Ab 106	0,12	Fraco	XDR ³	+	-	+	-	+	+	+	+	+
Ab 114	0,04	Não produtor	MDR	+	+	+	+	+	-	-	+	+
Ab 120	0,04	Não produtor	MDR	+	+	+	+	+	-	-	+	+

¹Média da densidade óptica; ²MDR: *multidrug-resistance*, multirresistente; ³XDR: *extensively drug-resistant*, extensivamente resistente. + (detecção do gene). - (gene não detectado).

5. DISCUSSÃO

A. baumannii é um patógeno nosocomial que causa infecções graves, especialmente em pacientes críticos, e a disseminação de cepas MDR desse microrganismo é motivo de preocupação global (HARDING; HENNON; FELDMAN, 2018). A Organização Mundial da Saúde (OMS), no ano de 2017, 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).

Além da resistência aos carbapenêmicos identificada em todas as cepas analisadas neste estudo, o que representa um desafio significativo no tratamento de infecções causadas por este patógeno, a presença de fatores de virulência, como a habilidade de formar biofilme, associado à sua capacidade de persistir em ambientes hospitalares e dispositivos médicos, pode desempenhar um papel crucial na emergência e propagação de fenótipos multirresistentes no ambiente hospitalar (VUOTTO et al., 2014; BADAVE; KULKARNI, 2015; DUARTE et al., 2016). Neste estudo, ao avaliar a capacidade de formação de biofilme de isolados de *A. baumannii in vitro*, constatamos que 50% dos isolados foram capazes de formar biofilme. Foram encontrados em outros estudos, taxas de formação de biofilme superiores, variando de 55 a 75% (SANCHEZ et al., 2013; DUARTE et al., 2016; CASTILHO et al., 2017).

Todos os isolados testados têm a capacidade de aderir à superfície de poliestireno não modificada, passo considerado essencial, e apresentam número considerável de células viáveis 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; ZOBOK; MEYER, 2017).

As cepas Ab 78, Ab 114 e Ab 120 foram caracterizadas como não-produtoras de biofilme, sugerindo possíveis inadequações na técnica de coloração, especialmente durante a etapa de lavagem do cristal violeta. Essa etapa, destinada a remover fragmentos de células mortas e células não aderidas, pode inadvertidamente deslocar e remover algumas células bacterianas sésseis, comprometendo a precisão dos resultados (AZEREDO et al., 2016). Além disso, o contato da amostra com uma interface ar-líquido durante a lavagem pode resultar no desprendimento de um número imprevisível de microrganismos aderidos, podendo subestimar

ou superestimar os resultados (GÓMEZ-SUÁREZ; BUSSCHER, VAN DER MEI, 2001; AZEREDO et al., 2016).

A avaliação convencional da produção de biofilme, realizada apenas por meio do ensaio de cristal violeta, não é isenta de falhas e é limitada, pois fornece estimativa da biomassa e é pouco reprodutível devido às variações nas etapas de lavagem. O presente estudo, além de realizar esse método, também quantificou o número de células viáveis no biofilme, evidenciando que todos os isolados apresentaram uma quantidade considerável de células após 24 horas de incubação. Alternativas, como o uso de resazurina e safranina, que são corantes não tóxicos e mais reprodutíveis, têm sido utilizados em outros estudos com bons resultados, embora sua aplicação neste trabalho tenha sido inviável devido a restrições técnico-financeiras (AZEREDO et al., 2016; OMMEN; ZOBK; MEYER, 2017).

Quando se discute a relação entre os fenótipos de resistência a antibióticos e a formação de biofilme em *A. baumannii*, o assunto permanece controverso. Estudos prévios demonstraram uma correlação positiva entre o fenótipo MDR e a capacidade de produção de biofilme (GURUNG et al., 2013; SANCHEZ et al., 2013; YANG et al., 2019, ROY et al., 2022). No entanto, nossos resultados contradizem essa associação, indicando que não há relação entre a formação de biofilme e a multirresistência nas cepas clínicas avaliadas neste estudo, corroborando com resultados de outras pesquisas (DE CAMPOS et al., 2016; THUMMEEPK et al., 2016; ROY et al., 2022).

Estudos anteriores também apresentaram uma frequência elevada desses genes, como o *csuE*, identificado em 100% dos isolados examinados por Zeighami e colaboradores (2019) e em 85% dos avaliados por Silva e colaboradores (2021). Além disso, os genes *bfmS* e *ptk* foram identificados em 92% e 95% dos isolados estudados por Zeighami e colaboradores (2019), respectivamente. O gene *plcD* foi identificado em 100% dos isolados estudados por Zhu e colaboradores (2022), assim como em nosso estudo. A presença dos genes *csuA* (83,3%) e *adeH* (83,3%) em nosso trabalho corrobora com resultados semelhantes aos estudos prévios de Li e colaboradores (2021) e Zhu e colaboradores (2022). Por outro lado, a ocorrência dos genes *pgaA* (66,6%) e *abaI* (16,6%) é significativamente inferior aos resultados encontrados em outros trabalhos (LI et al., 2021; ZHU et al., 2022). Além disso, o gene *bap* (66,6%) demonstrou uma prevalência similar àquela observada por Thummeepak e colaboradores (2016).

Sabe-se que certos genes de virulência desempenham um papel crucial na formação de biofilme em *A. baumannii*. O gene *bap* codifica uma proteína de alto peso molecular, que desempenha um papel fundamental nas interações entre células, além de ser essencial para a formação e maturação do biofilme em diversas superfícies, como polipropileno, poliestireno e

titânio (LASA; PENADÉS, et al., 2006). A presença desse gene em isolados capazes de formar o biofilme é recorrente em diversos estudos, sendo identificado em 100% dos isolados avaliados por Silva e colaboradores (2021) e em 92% dos estudados por Fallah e colaboradores (2017), levando os autores a considerarem que o gene *bap* é um componente-chave para a formação do biofilme. De forma divergente, tanto Thummeepak e colaboradores (2016) quanto nosso estudo não encontraram a presença desse gene em todos os isolados capazes de produzir biofilme.

Ao avaliarmos a presença dos genes *csuE* e *csuA*, notamos que ambos apresentaram alta ocorrência nos isolados, mesmo naqueles classificados como não produtores de biofilme. A presença do gene *csuE* foi detectada em todos os isolados, enquanto o *csuA* foi identificado em 83,3% deles, resultados congruentes com achados anteriores em estudos similares (ZEIGHAMI et al., 2019; SILVA et al., 2021; ZHU et al., 2022). Esses genes são considerados essenciais para a fixação das bactérias em superfícies abióticas, pois medeiam a montagem do pili, o que leva à formação de microcolônias e ao desenvolvimento do biofilme (TOMARAS et al., 2003).

Em *A. baumannii*, o *quorum sensing* é controlado pelo sistema de dois componentes *abaI/abaR* (OH; HAN, 2020). Ao analisarmos a presença do gene *abaI* em nossos isolados, observamos uma incidência relativamente baixa (16,6%). Acredita-se que a presença desse gene potencialize a capacidade de *A. baumannii* em formar biofilme em superfícies abióticas, resultando em uma estrutura mais robusta e em maior produção de polissacarídeos extracelulares (EPS), o que, por sua vez, aumenta a resistência aos antibióticos (ROY et al., 2022). Nossos resultados contrariam essa observação, uma vez que o isolado Ab 106 foi classificado como produtor fraco de biofilme, além de ser a única cepa XDR do estudo. A ocorrência desse gene em outros trabalhos é mais elevada, sendo identificado em 100% e 70,2% dos isolados em pesquisas conduzidas por Zhu e colaboradores (2022) e Li e colaboradores (2021), respectivamente.

O gene *bfmS* faz parte um sistema de regulação de dois componentes (BfmRS), envolvido em diversas vias metabólicas em *A. baumannii*, e está fortemente associado à formação e manutenção do biofilme (PEREZ MORA et al., 2023). Em nosso estudo, não encontramos relação entre a presença do gene *bfmS* e a formação de biofilme. No entanto, é importante destacar que trabalhos anteriores, como o conduzido por Liou e colaboradores (2014), demonstraram que mutações nesse gene podem resultar na redução da formação de biofilme e na diminuição da aderência das células a superfícies abióticas. Essa hipótese poderia corroborar com os nossos resultados, visto que, mesmo sendo todos os isolados positivos para o gene, 3 foram considerados não produtores e 2 foram classificados como produtores fracos de biofilme.

Outro fator essencial para a virulência em *A. baumannii* é a presença da cápsula, sendo o gene *ptk* um dos elementos essenciais na sua biossíntese (MENDES et al., 2023). Segundo Zeighami e colaboradores (2019), acredita-se que esse gene desempenha um papel significativo na formação de biofilme em isolados que apresentam multirresistência, e a presença dessa proteína contribuiria para a formação de um biofilme forte. Em nosso trabalho, apesar de todos os isolados apresentarem o gene, não conseguimos relacionar esse resultado com a formação fenotípica de biofilme.

Adicionalmente, outros genes importantes como *plcD*, que codifica fosfolipase com atividade lipolítica e que desempenha um papel crucial no processo de invasão celular por *A. baumannii*, e o gene *pgaA*, que faz parte do locus *pgaABCD* e que codifica proteínas envolvidas na síntese de poli- β -(1,6)-N-acetilglicosamina (PNAG), um dos principais componentes da matriz extracelular, também são essenciais para a formação e manutenção do biofilme (CHOI et al., 2009). Também, o gene *adeH*, que faz parte do operon *adeFGH*, codifica uma bomba de efluxo multidroga e está envolvido na síntese e transporte de moléculas auto indutoras (EZE; CHENIA; ZOWALATY, 2018; ZHU et al., 2022). Neste estudo, observou-se que as taxas de detecção de *adeH* e *plcD* foram altas, presentes em 83,3% dos isolados e 100%, respectivamente, assim como observado no trabalho de Zhu e colaboradores (2022). Em relação à detecção do gene *pgaA* (66,6%), percebeu-se que foi inferior em comparação com outros estudos (SOUZA, 2022; ZHU et al., 2022).

Ao analisarmos os resultados da PCR em associação à classificação do biofilme, observamos que apesar de todos os 6 isolados clínicos de *A. baumannii* carregarem ao menos sete desses genes, nenhum deles foi classificado como forte produtor de biofilme. Essa desconexão entre a presença genética e a expressão fenotípica pode ser influenciada por uma variedade de fatores, como a regulação negativa de genes, a influência do ambiente, ou até mesmo mutações específicas que afetam a função desses genes (LIOU et al., 2014; ROY et al., 2022). Além de realizar a quantificação da biomassa do biofilme por uma técnica diferente do ensaio do cristal violeta, o uso de ferramentas moleculares, como a PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) e o sequenciamento do genoma completo, poderiam contribuir para comprovar a regulação negativa ou a presença de mutações que poderiam estar impactando na modulação desses resultados.

As conclusões desta pesquisa, embora baseadas em um número limitado de cepas avaliadas, levantam questões sobre os mecanismos pelos quais os microrganismos mantêm um equilíbrio entre a formação de biofilme, a resistência a antibióticos e o *fitness* bacteriano, podendo impactar significativamente em sua aptidão biológica, bem como em sua capacidade

de sobrevivência e competitividade em ambientes hostis. Aprofundar a análise dos elementos genéticos móveis e dos mecanismos de regulação gênica é crucial para aprimorar a compreensão desses fenômenos.

6. CONCLUSÃO

- Todos os isolados de *A. baumannii* testados têm a capacidade de aderir à superfície de poliestireno não modificada, e apresentam número considerável de células viáveis após 24 horas de incubação, independente do perfil de resistência;
- Um isolado foi classificado como moderado produtor de biofilme, dois foram considerados fraco produtores, e três isolados não-produtores de biofilme;
- Em relação à presença dos genes de virulência associados ao biofilme, observou-se que os genes *bfmS*, *csuE*, *ptk* e *plcD* foram os mais prevalentes, estando presentes em todas as cepas analisadas neste trabalho;
- Não foi possível estabelecer uma relação entre a formação de biofilme, o perfil de resistência das bactérias analisadas e a presença ou ausência dos genes de virulência testados.

7. REFERÊNCIAS

- AZEREDO, J. et al. Critical review on biofilm methods. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 43, n. 3, p. 313–351, 2016. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2016.1208146>
- BADAVE, G. K.; KULKARNI, D. Biofilm producing multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*: An emerging challenge. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 9, n. 1, p. DC08-DC10, 2015. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2015/11014.5398>
- CASTILHO, S. R. A. et al. *Acinetobacter baumannii* strains isolated from patients in intensive care units in Goiânia, Brazil: Molecular and drug susceptibility profiles. **PLoS ONE**, v. 12, n. 5, 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176790>
- CAVALCANTE, E. F. O. et al. Implementação dos núcleos de segurança do paciente e as infecções relacionadas à assistência à saúde. **Revista Gaúcha de Enfermagem** [online], v.40, n.SPE, p. e20180306, 2019. <https://doi.org/10.1590/1983>
- CHOI, A. H. K. et al. The pgaABCD locus of *Acinetobacter baumannii* encodes the production of poly- β -1-6-N-acetylglucosamine, which is critical for biofilm formation. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 19, p. 5953–5963, 2009. <https://doi.org/10.1128/JB.00647-09>
- CHOUDHARY, M.; SHRIVASTAVA, R.; VASHISTT, J. *Acinetobacter baumannii* Biofilm Formation: Association with Antimicrobial Resistance and Prolonged Survival under Desiccation. **Current Microbiology**, v. 79, n. 12, p. 1–9, 2022. <https://doi.org/10.1007/S00284-022-03071-5/METRICS>
- DE CAMPOS, P. A. et al. Multidrug Resistance Related to Biofilm Formation in *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* Clinical Strains from Different Pulsotypes. **Current Microbiology**, v. 72, n. 5, p. 617–627, 2016. <https://doi.org/10.1007/s00284-016-0996-x>
- DIJKSHOORN, L.; NEMEC, A.; SEIFERT, H. An increasing threat in hospitals: multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. **Nature Reviews Microbiology**, v.5, n.12, p.939-951, 2007. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1789>
- 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. <https://doi.org/10.1016/J>.
- EZE, E. C., CHENIA, H. Y., & el ZOWALATY, M. E. *Acinetobacter baumannii* biofilms: Effects of physicochemical factors, virulence, antibiotic resistance determinants, gene regulation, and future antimicrobial treatments. **In Infection and Drug Resistance**. v.11, p. 2277–2299; 2018. <https://doi.org/10.2147/IDR.S169894>
- FALLAH, A. et al. Frequency of *bap* and *cpaA* virulence genes in drug resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* and their role in biofilm formation. **Iranian Journal of**

Basic Medical Sciences, v. 20, n. 8, p. 849–855, 2017.

<https://doi.org/10.22038/ijbms.2017.9105>

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology** **2010 8:9**, v. 8, n. 9, p. 623–633, 2010. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>

GADDY, J. A.; ACTIS, L. A. Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. **Future Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 273–278, 2009. <https://doi.org/10.2217/fmb.09.5>

GEDEFIE, A. et al. *Acinetobacter baumannii* biofilm formation and its role in disease pathogenesis: A review. **Infection and Drug Resistance**. v.14, p. 3711–3719; 2021. <https://doi.org/10.2147/IDR.S332051>

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. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.6.2531-2537.2001>

GURUNG, J. et al. Association of biofilm production with multidrug resistance among clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* from intensive care unit. **Indian Journal of Critical Care Medicine**, v. 17, n. 4, p. 214–218, 2013. <https://doi.org/10.4103/0972-5229.118416>

HAMIDIAN, M.; NIGRO, S. J. Emergence, molecular mechanisms and global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Microbial Genomics**, v. 16, n. 2, p. 91–102, 2018. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000306>

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. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.148>

HUA, M. et al. The novel outer membrane protein from OprD/Occ family is associated with hypervirulence of carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* ST2/KL22. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 1–11, 2021. <https://doi.org/10.1080/21505594.2020.1856560>

IBRAHIM, S. et al. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* as an emerging concern in hospitals. **Molecular Biology Reports**, v.48, n.10, p.6987-6998, 2021. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06690-6>

KHAN, H. A.; BAIG, F. K.; MEHBOOB, R. Nosocomial infections: Epidemiology, prevention, control and surveillance. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 5, p. 478–482, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2017.01.019>

KYRIAKIDIS, I. et al. *Acinetobacter baumannii* Antibiotic Resistance Mechanisms. **Pathogens**, v.10, n.3, p.373, 2021. <https://doi.org/10.3390/pathogens10030373>

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. <https://doi.org/10.1067/mic.2001.115674>

LASA, I.; PENADÉS, J. R. Bap: A family of surface proteins involved in biofilm formation. **Research in Microbiology**, v. 157, n. 2, p. 99–107, 2006.
<https://doi.org/10.1016/j.resmic.2005.11.003>

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, p.55, 2017. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00055>

LEONCIO, J. M. et al. Impact of healthcare-associated infections on the hospitalization costs of children. **Revista da Escola de Enfermagem**, v. 53, 2019.
<https://doi.org/10.1590/S1980-220X2018016303486>

LEWIS, K. Riddle of biofilm resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 4, p. 999–1007, 2021. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.4.999-1007.2001>

LI, Z. et al. Phenotypic and Genotypic Characteristics of Biofilm Formation in Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Infection and Drug Resistance**, v. 14, p. 2613–2624, 2021. <https://doi.org/10.2147/IDR.S310081>

LIU, M. L. et al. The sensor kinase BfmS mediates virulence in *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 47, n. 4, p. 275–281, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.jmii.2012.12.004>

MEA, H. J.; YONG, P. V. C.; WONG, E. H. An overview of *Acinetobacter baumannii* pathogenesis: Motility, adherence and biofilm formation. **Microbiological Research**, v. 247, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126722>

MENDES, S. G. et al. Co-regulation of biofilm formation and antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: from mechanisms to therapeutic strategies. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 42, n. 12, p. 1405–1423, 2023.
<https://doi.org/10.1007/s10096-023-04677-8>

OH, M. H.; HAN, K. AbaR is a LuxR type regulator essential for motility and the formation of biofilm and pellicle in *Acinetobacter baumannii*. **Genes & genomics**, v. 42, n. 11, p. 1339–1346, 2020. <https://doi.org/10.1007/S13258-020-01005-8>

OMMEN, P.; ZOBEK, N.; MEYER, R. L. 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. <https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2017.08.003>

PEREZ MORA, B. et al. BfmRS encodes a regulatory system involved in light signal transduction modulating motility and desiccation tolerance in the human pathogen *Acinetobacter baumannii*. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, 2023.
<https://doi.org/10.1038/s41598-022-26314-8>

RAMIREZ, M.S.; BONOMO, R.A.; TOLMASKY, M.E. Carbapenemases: Transforming *Acinetobacter baumannii* into a Yet More Dangerous Menace. **Biomolecules**, v.10, n.5, p.720, 2020. <https://doi.org/10.3390/biom10050720>

RODRÍGUEZ-BAÑO J. et al. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*: associated features and clinical implications. **Clinical Microbiology and Infection**, v.14, n.3, p.276-278, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01916.x>

ROY, S. et al. Convergence of Biofilm Formation and Antibiotic Resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Infection. Frontiers in Medicine**, v. 9, 2022. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.793615>

SANCHEZ, C. J. et al. Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, 2013. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-47>

SAXENA, S. et al. Comparative Study of Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Patients of Lower Respiratory Tract Infection. **J Clin Diagn Res**. v.8, n. 5, p.09-11, 2014. DOI: <https://doi.org/10.7860/JCDR/2014/7808.4330>

SILVA, L. et al. The success of particular *Acinetobacter baumannii* clones: Accumulating resistance and virulence inside a sugary shield. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.76, n. 2, p. 305–311, 2021. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa453>

SOUZA, Paula Araújo de. **Sequenciamento genômico e análise filogenética de cepas de *Acinetobacter baumannii*: uma abordagem comparativa** .2022. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) –Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2022. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/60067>. Acesso em 17 abr. 2024.

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. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.270>

TIKU, V. *Acinetobacter baumannii*: Virulence Strategies and Host Defense Mechanisms. **DNA and Cell Biology**, v.41, n.1, p.43-48, 2022. <https://doi.org/10.1089/dna.2021.0588>

TOMARAS, A. P. et al. Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: Involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. **Microbiology**, v. 149, n. 12, p. 3473–3484, 2003. <https://doi.org/10.1099/MIC.0.26541-0/CITE/REFWORKS>

UPMANYU, K.; HAQ, Q. M. R.; SINGH, R. **Factors mediating *Acinetobacter baumannii* biofilm formation: Opportunities for developing therapeutics**. **Current Research in Microbial Sciences**, n. 3, p. 100-131, 2022. <https://doi.org/10.1016/J.CRMICR.2022.100131>

URZEDO, J. E. et al. High mortality by nosocomial infections caused by carbapenem resistant *P. aeruginosa* in a referral hospital in Brazil: Facing the perfect storm. **Journal of Medical Microbiology**, v. 69, n. 12, p. 1388–1397, 2020. <https://doi.org/10.1099/JMM.0.001273/CITE/REFWORKS>

VUOTTO, C. et al. Antibiotic resistance related to biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae*. **Pathogens**, v. 3, n. 3, p. 743–758, 2014. <https://doi.org/10.3390/pathogens3030743>

WHO. World Health Organization.2017. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>.

Acesso em Acesso em: 8 abr. 2024.

YANG, C. H. et al. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*: Genotype-phenotype correlation. **Molecules**, v. 24, n. 10, 2019. <https://doi.org/10.3390/molecules24101849>

YOON, E.J.; COURVALIN, P.; GRILLOT-COURVALIN, C. RND-type efflux pumps in multidrug resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*: major role of AdeABC overexpression and AdeRS mutations. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.57, n.7, p.2989-2995, 2013. <https://doi.org/10.1128/AAC.02556-12>

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, 2019. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4272-0>

ZHU, Y. et al. Insight into carbapenem resistance and virulence of *Acinetobacter baumannii* from a children's medical centre in eastern China. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 21, n. 1, 2022. <https://doi.org/10.1186/s12941-022-00536-0>