

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Análise da formação de biofilme por isolados clínicos e caracterização genotípica do gene *wspR* de *Acinetobacter* spp.

Christine Garcia Bierhals

Porto Alegre, Dezembro de 2010.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

Análise da formação de biofilme por isolados clínicos e caracterização genotípica do gene *wspR* de *Acinetobacter* spp.

Christine Garcia Bierhals

Trabalho de conclusão de curso

Prof. Dr. Jeverson Frazzon

Orientador

Profa. Dra. Ana Paula Guedes Frazzon

Co-orientadora

Porto Alegre, Dezembro de 2010.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul ao Centro de Biotecnologia e ao Departamento de Microbiologia, pela estrutura e por oportunizar a realização desta pesquisa.

Ao meu orientador Prof. Dr. Jeverson Frazzon e co-orientadora Profa. Dra. Ana Paula Guedes Frazzon, pela disponibilidade, confiança, credibilidade, paciência e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Giancarlo Pasquali, por disponibilizar o uso de seu laboratório.

A doutoranda Jozi Fagundes de Mello pela ajuda nos passos iniciais desse projeto.

Aos meus pais Renato e Maribel, por todo amor, incentivo, apoio, compreensão e confiança que depositam em mim.

Ao Gustavo, pelo carinho, por me apoiar, me ensinar, pelo auxílio nesse trabalho e por torcer pelo meu sucesso.

As minhas colegas e amigas de faculdade Anita e Jaqueline, por compartilharem seus conhecimentos em microbiologia.

As minhas amigas Gabriela e Rosele pelo incentivo e ajuda ao longo do curso de Farmácia.

RESUMO

Nas últimas décadas *Acinetobacter* spp. emergiu como um importante patógeno nosocomial oportunista que afeta principalmente indivíduos imunocomprometidos, causando infecções no trato respiratório, trato urinário e em feridas os quais podem eventualmente progredir para septicemia. Inúmeros surtos de infecções hospitalares envolvendo *Acinetobacter baumannii* multi-resistentes a antibióticos tem sido relatado em diversas partes do mundo. A habilidade potencial de *A. baumannii* formar biofilme pode explicar sua proeminente resistência a antibióticos e propriedades de sobrevivência no ambiente hospitalar e em aparelhos médicos. Analisando o genoma de *A. baumannii* foi verificado a presença da proteína WspR, uma diguanilato ciclase com domínio GGDEF, a qual forma um mensageiro secundário c-di-GMP que está envolvido no processo de formação de biofilme bacteriano e em mecanismos de virulência. No presente trabalho observamos que duas amostras clínicas de *Acinetobacter* spp. obtidas em hospitais da cidade de Porto Alegre, RS, foram capazes de formar biofilme em superfície plástica e ambas apresentam o gene *wspR*. Quando inoculados estaticamente em meio LB com crescentes concentrações de glicose por 24 horas a 37°C, a maior produção de biofilme (de moderadamente a fortes formadoras) ocorreu na maior suplementação de glicose (LB + 1% glicose). Estes resultados demonstram que as amostras clínicas de *Acinetobacter* spp. são capazes de formar biofilme e um possível indício que a mudança da vida planctônica para a vida séssil possa estar relacionada com a proteína WspR.

Palavras-chave: *Acinetobacter* spp., biofilme, glicose, WspR, c-di-GMP.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	3
RESUMO.....	4
SUMÁRIO.....	5
1. INTRODUÇÃO.....	7
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.	9
2.1 Identificação.....	9
2.2 Importância clínica.....	9
2.3 Fatores de virulência.....	13
2.3.1 Biofilme.....	14
2.4 Formação de biofilme por <i>Acinetobacter baumannii</i>	17
2.5 Regulação de biofilme em <i>Acinetobacter baumannii</i>	19
2.5.1 Proteína Bap.....	20
2.5.2 Proteína AbaI.....	20
2.5.3 Proteína Bla-PER1.....	21
2.5.4 Proteína OmpA.....	21
2.5.5 Proteína CsuABCDE.....	21
2.5.6 Proteína PgaABCD.....	22
2.5.7 Proteína Diguanilato Ciclase.	23
3. OBJETIVOS.....	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS.	26

4.1 Amostras bacterianas.....	26
4.2 Ensaio de biofilme em microplacas de poliestireno.	26
4.2.1 Suspensão bacteriana.....	26
4.2.2 Ensaio de biofilme.....	26
4.3 Identificação do gene <i>wspR</i>	27
4.3.1 Desenho dos primers.....	27
4.3.2 Extração de DNA.....	28
4.3.3 PCR.	28
4.3.4 Clonagem.....	28
4.3.5 Sequenciamento.....	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
5.1 Formação de biofilme.....	30
5.2 Análise genotípica de <i>wspR</i>	32
6. CONCLUSÃO.....	38
7. REFERÊNCIAS.....	39

1. INTRODUÇÃO

Acinetobacter spp. é um cocobacilo gram negativo, aeróbio estrito, não fermentador, oxidase negativo que nas últimas décadas tem emergido como um importante patógeno nosocomial (BERGOGNEBEREZIN E TOWNER, 1996; DIJKSHOORN *et al.*, 2007). Infecções hospitalares por *Acinetobacter* spp. envolvem principalmente o trato respiratório, trato urinário e feridas podendo progredir para septicemia. Nos últimos anos, tem sido reportado inúmeros surtos de infecções hospitalares envolvendo *Acinetobacter* spp. multi-resistentes a antibióticos em diversas partes do mundo (D'AREZZO *et al.*, 2009; DENT *et al.*, 2010; HO *et al.*, 2010; LIVERMORE *et al.*, 2010; ROSENTHAL *et al.*, 2010; WADL *et al.*, 2010) e em alguns destes lugares cepas pan-resistentes tem sido identificadas (VALENCIA *et al.*, 2009), sendo *Acinetobacter baumannii* a principal espécie associada. Esse patógeno atinge especialmente pacientes severamente doentes internados em UTIs. Possivelmente, as principais razões para a difusão e persistência dos surtos são a co-transmissão pelas mãos da equipe que entra em contato com pacientes colonizados (BARCHITTA *et al.*, 2009; KOHLENBERG *et al.*, 2009) e a contaminação do ambiente hospitalar (JOSEPH *et al.*, 2010). A sua alta capacidade de sobreviver na maioria das superfícies ambientais, inclusive em condições de seca (JAWAD *et al.*, 1998), tem aumentando as preocupações. (SCHRECKENBERGER *et al.*, 2007; DIJKSHOORN *et al.*, 2007)

A habilidade potencial de *A. baumannii* formar biofilme pode explicar sua proeminente resistência a antibióticos e propriedades de sobrevivência (TOMARAS *et al.*, 2003; LI *et al.*, 2007). É aparente que a habilidade desse patógeno em formar biofilme é multifatorial e diversa, assim como adaptável a natureza da superfície nas quais as células estão interagindo. (GADDY *et al.*, 2009) Os estudos sobre a formação de biofilme e sobre os genes envolvidos na regulação de biofilme em *A. baumannii* tem aumentado, mas ainda pouco é conhecido. As proteínas até então identificadas e relacionadas com a formação de biofilme em *A. baumannii* são: Bap, AbaI, Bla-_{PER1}, OmpA, CsuABCDE e PgaABCD. Analisando o genoma de *A. baumannii* foi verificado a presença do gene *wspR*. Sabe-se que WspR é umas das proteínas que influenciam a formação de biofilme em *Pseudomonas aeruginosa*. Quando fosforilada a enzima forma um mensageiro secundário c-di-GMP que interfere nas funções de virulência aguda e inibe várias formas de motilidade: controla a troca entre estilo de vida planctônico para a forma sésil em biofilme. (D'ARGENIO *et al.*, 2002; HENGGE, 2009)

No Brasil, desde a década de 90 tem sido reportada a presença de cepas de *Acinetobacter* spp. resistentes a antibióticos em hospitais. (SADER *et al.*,2001) Na cidade de Porto Alegre os primeiros relatos aconteceram em 2004 e até 2008 foi constatado um surto causado por *A. baumannii* resistente aos carbapenêmicos (BREIER, MARTINS, 2008). O objetivo desse trabalho foi avaliar a formação de biofilme em duas amostras clínicas obtidas em hospitais da cidade de Porto Alegre. Especificamente, realizar experimentos *in vitro* de formação de biofilme, bem como caracterizar genotipicamente o gene *wspR* como um fator envolvido no processo de formação de biofilme em *Acinetobacter* spp.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 IDENTIFICAÇÃO

O gênero *Acinetobacter* spp. é aeróbio estrito, Gram negativo, embora algumas vezes difícil de identificar, cocobacilo, não móvel, catalase positivo, oxidase negativo e não fermentativo. Cresce bem a temperaturas entre 20 a 35°C, pode crescer em meios laboratoriais comuns como ágar nutriente e ágar soja triptona sem necessidade da presença de fatores de crescimento. Cresce também em meio mineral simples contendo sais de amônia ou nitrato com uma única fonte de carbono e energia como acetato, lactato e piruvato. As colônias são lisas, às vezes mucóides, opacas, amarela pálida a branco acinzentadas em meio sólido, arredondadas e pequenas, possuem 1,0 a 1,5 por 1,5 a 2,5 μm na fase *log*, mas geralmente se tornam mais cocóide na fase estacionária. Ser oxidase negativo geralmente distingue *Acinetobacter* spp. de outras bactérias não fermentativas. (BERGOGNEBEREZIN E TOWNER, 1996; SCHRECKENBERGER *et al.*, 2007)

2.2 IMPORTÂNCIA CLÍNICA

No gênero *Acinetobacter* spp. há 25 genomoespécies (grupos com DNA homólogos), porém, somente 11 espécies foram nomeadas, entre elas o *A. baumannii*, mas testes bioquímicos e de crescimento tem sido publicados para pelo menos 19 espécies (SCHRECKENBERGER *et al.*, 2007). As espécies de *Acinetobacter* spp. estão amplamente distribuídas na natureza, podem formar parte da microbiota bacteriana da pele, há relatos que 25% de indivíduos saudáveis carregam *Acinetobacter* spp. em sua pele (SOMERVIL.DA E NOBLE, 1970). Foi encontrado na cavidade oral de adultos saudáveis (GRIFFITH *et al.*, 2006), mas a presença em pacientes não hospitalizados é normalmente baixa. *Acinetobacter* spp. é geralmente considerado não patogênico a indivíduos saudáveis, mas pode causar infecções em indivíduos debilitados. Algumas espécies de *Acinetobacter* spp. têm sido associadas em surtos de infecções hospitalares como *Acinetobacter* espécie genômica 3 e *Acinetobacter* espécie genômica 13TU (DIJKSHOORN *et al.*, 1993; DIJKSHOORNC *et al.*, 2007; TJERNBERG E URSING, 2007; WISPLINGHOFF *et al.*, 2008; VAN DEN BROEK *et al.*, 2009; PARK *et al.*, 2010), mas o *A. baumannii* é a principal espécie relacionada aos surtos (DONNARUMMA *et al.*, 2010).

A manifestação clínica mais relevante são as infecções respiratórias hospitalares causadas por *A. baumannii* em UTIs (unidades de tratamento intensivo). Cerca de 6% das pneumonias em hospitais são causadas por esse microrganismo. As infecções estão relacionadas a traqueotomias e a utilização de tubos endotraqueais e de ventilação mecânica (CARNEIRO *et al.*, 2010; JONES, 2010; MAGRET *et al.*, 2010). A pneumonia adquirida pela comunidade, fora do ambiente hospitalar, causada por *A. baumannii* é incomum, mas importante atingindo principalmente pacientes idosos com alguma doença crônica e em pacientes mais novos observou-se que o alcoolismo está associado às infecções (CHEN *et al.*, 2001; LEUNG *et al.*, 2006), havendo uma maior ocorrência em climas tropicais, em particular no sudeste da Ásia e Austrália tropical (ANSTEY *et al.*, 2002).

A. baumannii também pode causar bacteremia, meningites e infecções urinárias. Pacientes imunocomprometidos fazem parte do maior grupo de pacientes adultos que contraíram bacteremia por *A. baumannii*, com as maiores taxas de bacteremia hospitalar ocorrendo na segunda semana de hospitalização, principalmente, após procedimentos invasivos (JUNG *et al.*, 2010; LEE *et al.*, 2010). Cateteres intravasculares e do trato respiratório, doenças malignas, trauma, e queimaduras parecem estar entre os fatores de predisposição (CISNEROS E RODRIGUEZ-BANO, 2002; RESSNER *et al.*, 2008). Ainda há relatos de neonatos com baixo peso de nascimento, internados em UTIs que adquiriram infecção por *A. baumannii* resultando em bacteremia (BERNARDS *et al.*, 1997; LITZOW *et al.*, 2009; MADER *et al.*, 2010). Meningites secundárias causadas por *A. baumannii* são a forma predominante, especialmente após procedimentos neurocirúrgico ou traumatismo craniano (CHANG *et al.*, 2000; KIM *et al.*, 2009). Infecções urinárias, embora pouco freqüentes, podem ocorrer em pacientes idosos debilitados ou em pacientes confinados em UTIs, principalmente com cateteres urinários permanentes (BERGOGNEBEREZIN E TOWNER, 1996; TANKHIWALE *et al.*, 2004; ROSENTHAL *et al.*, 2010).

Livermore *et al.* (2010) constataram que o *A. baumannii* causou ou contribuiu para mortes em 18 das 84 infecções revisadas por eles. Apesar disso, há controvérsia se a mortalidade é aumentada pela infecção com *Acinetobacter* spp. visto que a maioria dos pacientes apresentavam quadros clínicos bastante graves e com pobres prognósticos de sobrevivência. Assim, acredita-se que as mortes observadas seriam causadas por sua doença basal preferencialmente, ao invés de uma conseqüente infecção com *A. baumannii*. Estas conclusões contraditórias mostram que o debate sobre o impacto clínico desse microrganismo

ainda esta em andamento (DIJKSHOORN *et al.*, 2007). Experimentalmente, infecções mistas combinadas com outras bactérias e *A. baumannii* são mais virulentas que infecções apenas por *A. baumannii* (OBANA Y, 1986). Entretanto, há fortes indícios, com o aumento de relatos de casos, que infecções por *A. baumannii* estão associadas diretamente com mortalidades, principalmente em paciente que apresentam bacteremia ou pneumonia variando de 1,8 a 23%, (SEIFERT *et al.*, 1995; CISNEROS *et al.*, 1996; DIJKSHOORN *et al.*, 2007; FALAGAS E KARVELI, 2007; DENT *et al.*, 2010), com uma maior taxa associada à falência de órgãos e com o aumento do tempo de permanência em UTIs (EBERLE *et al.*, 2010).

O fato de *A. baumannii* classificar-se entre os patógenos causadores de infecções nosocomiais mais importantes, tanto em UTIs como fora delas é alarmante, pois demonstra o potencial desse patógeno em se tornar a maior causa de infecções associadas a hospitais, podendo-se expandir para a população de risco (FALAGAS E KARVELI, 2007). Os pacientes geralmente apresentam colonização da pele em surtos, possuindo um papel importante na contaminação das mãos da equipe hospitalar durante contatos triviais, e assim contribuindo com a difusão e persistência dos surtos pela co-transmissão entre os indivíduos (GETCHELLWHITE *et al.*, 1989; ROBERTS *et al.*, 2001; MARKOGIANNAKIS *et al.*, 2008; BARCHITTA *et al.*, 2009; KOHLENBERG *et al.*, 2009; JOSEPH *et al.*, 2010).

Foi observado que algumas linhagens possuem maior tendência em causar epidemia que outras (TURTON *et al.*, 2004) e que o número de microrganismos resistentes aos antimicrobianos usualmente utilizados vem aumentando. A introdução terapêutica de novos antibióticos de amplo espectro em hospitais durante os anos 70 foi seguida de uma alta incidência de bacilos gram negativos aeróbios estritos, incluindo *P. aeruginosa*, *Xanthomonas* e *Acinetobacter* spp., resistentes a antibióticos e o conseqüente envolvimento em infecções nosocomiais (BERGOGNEBEREZIN E TOWNER, 1996). Porém, a manifestação clínica mais notável do *Acinetobacter* spp. como um patógeno nosocomial emergiu em 1980 (DIJKSHOORN *et al.*, 2007). Desde então, numerosos estudos têm reportado a ocorrência de *A. baumannii* multiresistentes a drogas em todo mundo (D'AREZZO *et al.*, 2009; DENT *et al.*, 2010; HO *et al.*, 2010; KULAH *et al.*, 2010; LIVERMORE *et al.*, 2010; PEREZ *et al.*, 2010; WADL *et al.*, 2010) e em alguns lugares cepas pan-resistentes tem sido identificadas (VALENCIA *et al.*, 2009). Um consórcio internacional de controle de infecção hospitalar realizado com 173 UTIs participantes da América latina, Ásia, África e Europa demonstrou que o *A. baumannii* é um patógeno recorrente em diversas UTIs. Em média 50% dos isolados

apresentaram resistência aos antibióticos β -lactâmicos não clássicos carbapenêmicos: imipinem ou meropenem (ROSENTHAL *et al.*, 2010), os quais agem inibindo a síntese da parede celular e possuem um amplo espectro de atividade antimicrobiana (RANG *et al.* 2000).

No Brasil, de um total de 3.728 linhagens obtidas dos centros de saúde que participaram do Programa de Vigilância de Resistência Antimicrobiana (SENTRY) em 1997, 1998, e 1999, o *Acinetobacter* spp. foi o quinto gênero gram negativo mais freqüente isolado (6.7% dos isolados) e o terceiro patógeno mais comum isolado de pacientes internados com pneumonia (10.8% dos isolados) (SADER *et al.*,2001). De Janeiro de 2001 a dezembro de 2003 um total de 463 isolados de *Acinetobacter* spp. foram isolados de centros médicos da America Latina pelo SENTRY. Durante esse período um total de 33 isolados de *Acinetobacter* spp. mostraram resistência aos β -lactâmicos testados (SADER *et al.*, 2005). Segundo a secretaria municipal de saúde o primeiro caso de infecção por *A. baumannii* resistente aos carbapenêmicos em Porto Alegre ocorreu em 2004, desde então surtos envolvendo 16 hospitais e mais de 500 casos foram detectados de 2004 a 2008 (BREIER E MARTINS, 2008).

Clones de bactérias que já causaram infecções são linhagens geneticamente estáveis particularmente bem sucedidas no ambiente hospitalar. Até agora sua resistência a agentes antimicrobianos é a sua vantagem seletiva mais conhecida. A resistência a agentes antimicrobianos é mediada pelos mais significativos mecanismos que podem ocorrer em bactérias: modificações dos sítios alvos, inativação enzimática, efluxo ativo e diminuição do influxo de drogas (DIJKSHOORN *et al.*, 2007). Beta-lactamases são o grupo enzimático mais diverso associado a resistência microbiana, e mais de 50 enzimas diferentes, ou suas formas alélicas, foram identificadas em *A. baumannii*. A resistência a aminoglicosídeos tem sido atribuída a pelo menos, 9 enzimas distintas modificadas, as quais podem ser encontradas em diferentes combinações em algumas espécies (SEWARD *et al.*, 1998; DIJKSHOORN *et al.*, 2007; MONIRI *et al.*, 2010).

A habilidade desse microrganismo de adquirir multiresistência a antimicrobianos e sua alta capacidade de sobreviver na maioria das superfícies ambientais tem aumentando as preocupações sobre infecção nosocomial. Para contornar esses problemas, deve-se evitar a administração de antibióticos não necessários aos pacientes a fim de evitar a seleção de microrganismos resistentes e deve-se realizar a revisão das práticas de higiene das mãos da

equipe hospitalar, da descontaminação do ambiente e dos protocolos de limpeza (ROBERTS *et al.*, 2001; BARCHITTA *et al.*, 2009; VALENCIA *et al.*, 2009).

2.3 FATORES DE VIRULÊNCIA

Além da resistência a antibióticos, certas características intrínsecas do microrganismo aumentam a virulência das linhagens envolvidas nas infecções, estas características incluem: a presença de uma cápsula polissacarídica formada de L-ramanose, D-glicose, e D-manose o qual torna a superfície das linhagens mais hidrofílicas; a capacidade de adesão a células epiteliais humanas com a presença de fímbrias e/ ou cápsula polissacarídica e o papel tóxico do componente lipopolissacarídeo da parede celular pela presença de lipídio A. A produção de endotoxina *in vivo* é a possível responsável pelos sintomas da doença observados durante septicemia por *A. baumannii*. (SMITH *et al.*, 1990; ECHENIQUE *et al.*, 1992; ACTIS *et al.*, 1993; BERGOGNEBEREZIN E TOWNER, 1996; LEONE *et al.*, 2007).

O sequenciamento de *A. baumannii* revelou que este organismo adquiriu um número considerável de genes por transferência horizontal, que provavelmente desempenham um papel direto em sua virulência. Esse microrganismo possui 16 ilhas genômicas (Figura 1) que carregam os possíveis genes de virulência os quais estão associados com biogênese do envelope celular, resistência a antibióticos, biogênese de pilus e metabolismo lipídico (SMITH *et al.*, 2007). Resistência a dessecação, desinfetantes e a antibióticos é importante para a sobrevivência ambiental, assim como sua versatilidade metabólica que permite sobreviver em diversas condições ambientais (JAWAD *et al.*, 1998; DIJKSHOORN *et al.*, 2007; PEREZ *et al.*, 2007).

Sabe-se que *A. baumannii* pode sobreviver em condições adversas provavelmente pela habilidade dele crescer em várias temperaturas e pHs diferentes (JAWAD *et al.*, 1998). Em surtos tem sido isolado de vários locais no ambiente do paciente incluindo, cama, cortinas, mobília e equipamentos hospitalares (VAN DEN BROEK *et al.*, 2006; GETCHELLWHITE *et al.*, 1989; BARCHITTA *et al.*, 2009; KOHLENBERG *et al.*, 2009). Observou-se também que a limpeza e desinfecção dos quartos dos pacientes e de UTIs foi eficaz em interromper esses surtos. Isso indica a importância do ambiente hospitalar como um reservatório para *A. baumannii* (DIJKSHOORN *et al.*, 2007). Uma provável explicação para sua persistência e para a reincidência das infecções seja devido a sua capacidade de formar biofilme.

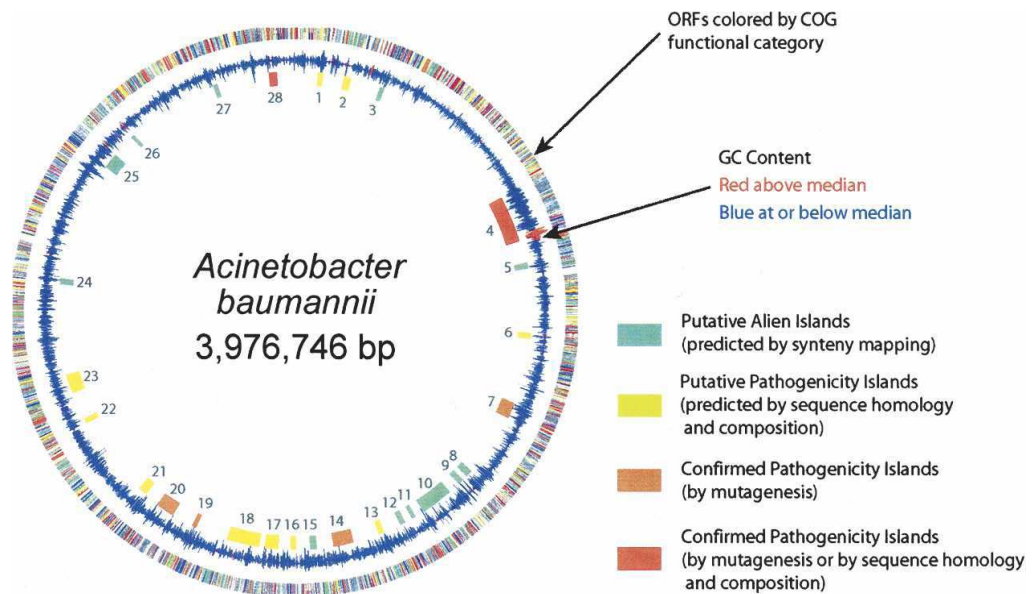


Figura 1. Mapa circular do genoma de *A. baumannii*. Adaptado de Smith, Gianoulis *et al.*, 2007.

O círculo externo mostra os genes diferenciados por cores (por sua categoria funcional) atribuídos pelo COG (clusters of orthologous groups). O círculo representa a porcentagem média G + C. As caixas em azul indicam pAs (supostas ilhas exógenas), as caixas vermelhas, amarelas e laranjas mostram as 16 ilhas genômicas que carregam os genes de virulência putativos. As amarelas indicam ilhas previstas por estarem envolvidas na patogenicidade através da homologia e diferenças de composição das seqüências, as vermelhas e laranjas indicam ilhas confirmadas estando envolvidas na patogenicidade pelos screens. As caixas e os círculos foram desenhados utilizando o programa GenomeViz (<http://www.uniklinikumgiessen.de/genoma/genomeviz/intro.html>).

2.3.1 BIOFILME

Biofilmes são populações bacterianas inclusas em uma matriz, aderidas umas as outras e/ou a superfícies ou interfaces (COSTERTON *et al.*, 1995), cujas células expressam genes em um padrão (SAUER *et al.*, 2002) que diferem profundamente do que quando em vida planctônica, dentre eles estão proteínas envolvidas no metabolismo, translação, transporte de membrana e/ou secreção regulação gênica (WHITELEY *et al.*, 2001; STOODLEY *et al.*, 2002). A comunicação célula-a-célula, ou *quorum sensing* (QS) permite as bactérias coordenarem suas atividades e agruparem-se em comunidades que trazem benefícios. Dentro de uma comunidade de biofilme, as bactérias são capazes de compartilhar os nutrientes e estão protegidas de fatores prejudiciais inerentes ao ambiente, como a dessecação, os antibióticos e o sistema imunológico do hospedeiro (TORTORA *et al.*, 2005).

As bactérias agrupadas em biofilme formam estruturas tipo pilares, com canais por onde a água pode transportar os nutrientes para seu interior e também por onde os resíduos saem, como um sistema circulatório primitivo, que demonstram um grande nível de diferenciação. Um biofilme geralmente é composto por uma camada de superfície de cerca de 10 µm de espessura, com pilares que se estendem em até 200 µm acima. A principal consequência da arquitetura é que a água pode fluir pelos canais e então entregar os nutrientes profundamente na comunidade complexa o que mantém as células individuais em condições ótimas de nutriente em muitos locais no biofilme. (STOODLEY *et al.*, 2002)

Condições externas desencadeiam alterações na expressão de um subconjunto de genes requeridos para a formação do biofilme. A formação de um biofilme por sua vez altera o microambiente de seus próprios habitantes os quais então levam a alterações adicionais na expressão gênica e posterior maturação do biofilme, e assim por diante. Mesmo bactérias em biofilme de única espécie são heterogêneas com respeito a expressão gênica. Isso devido a limitações de difusão transmitidos pelo biofilme, o que resulta em variação local do pH, disponibilidade de nutriente e oxigênio e concentrações de metabólitos bacterianos (JEFFERSON, 2004). O desenvolvimento do biofilme pode ser dividido em pelo menos 4 estágios: i) ligação reversível; ii) ligação irreversível; iii) maturação iv) desprendimento. As células que se desligam do biofilme retornam ao modo planctônico de crescimento, então fechando o ciclo de desenvolvimento do biofilme. Bactérias em cada estágio do biofilme são fisiologicamente distintas das células em outros estágios. Esses processos não são necessariamente sincronizados em todo biofilme, mas são geralmente localizados de modo que a qualquer momento uma pequena área na superfície pode conter biofilme em cada estágio de desenvolvimento. (STOODLEY *et al.*, 2002)

Durante esses estágios de adesão reversível as bactérias exibem alguns comportamentos espécie-específicos, antes que comecem a exsudar exopolissacarídeos e se aderir irreversivelmente (MARSHALL *et al.*, 1971). Microcolônias individuais podem se destacar da superfície ou podem dar origem a organismos planctônicos. Um meio de transição da ligação reversível para a irreversível é mediado por pili tipo IV. Motilidade por espasmos é a maneira de locomoção usada por *P. aeruginosa* na qual o pili tipo IV se estende e retrai, impulsionando assim a bactéria pela superfície. Trabalhando com *Staphylococcus epidermidis*, Gerke *et al.* (1998) mostraram que células aderentes produzem um polissacarídeo intracelular denominado adesina que liga as células e facilita a formação de

microcolônias, dando o suporte para a estrutura, contribuindo para posterior maturação do biofilme. A marca do biofilme bacteriano que segrega estas das bactérias que simplesmente se ligam a substratos é o fato destes biofilmes conterem substâncias poliméricas extracelulares (EPS) que circunda as bactérias residentes. O EPS microbiano é um polímero biossintético que pode ser altamente diverso na composição química e pode incluir proteínas substituíveis ou insubstituíveis, polissacarídeos, ácidos nucleicos, e fosfolipídeos (STOODLEY *et al.*, 2002). Ele pode conferir as bactérias resistência a forças de cisalhamento e fagocitose por células inflamatórias (JEFFERSON, 2004) e aumenta a resistência a antibióticos. Após a adesão irreversível ocorre a maturação do biofilme resultando na geração da arquitetura complexa, canais, poros, e redistribuição de bactérias longe do substrato (DAVIES *et al.*, 1998; STOODLEY *et al.*, 2002).

Biofilmes se desenvolvem preferencialmente em superfícies inertes, ou em tecidos mortos (COSTERTON *et al.*, 1978), mas estes também podem se formar em tecidos vivos. Organismos em biofilme podem suportar privação de nutrientes, mudanças de pH, radicais de oxigênio, desinfetantes e antibióticos melhor que os organismos planctônicos e também são resistentes a fagocitose (STOODLEY *et al.*, 2002). A natureza crônica de certas infecções é devido ao desenvolvimento de um biofilme resistente (JEFFERSON, 2004). Os microrganismos em biofilme são provavelmente mil vezes mais resistentes a microbicidas. Os especialistas do centro de controle de prevenção de doenças dos EUA (CDC - Centers for Disease Control and Prevention) estimam que 65% das infecções bacterianas envolvam biofilme. A maioria das infecções hospitalares está provavelmente relacionada a biofilmes em cateteres venosos. De fato, os biofilmes se formam em quase todos os dispositivos médicos de uso interno. Tecidos obtidos de infecções crônicas não relacionadas a aparelhos médicos também mostraram a presença de biofilme bacteriano cercado por uma matriz de exopolissacarídeo (COSTERTON *et al.*, 1999).

As células bacterianas sésseis liberam antígenos e estimulam a produção de anticorpo, mas os anticorpos não são eficientes em matar as bactérias no biofilme (COCHRANE *et al.*, 1988) mesmo em indivíduos com excelente reação imunológica celular e humoral, infecções por biofilme são raramente resolvidas pelas defesas do hospedeiro. A terapia antimicrobiana reverte os sintomas causados pelas células planctônicas liberadas do biofilme, mas falha em erradicar o biofilme. Por essa razão infecções causadas por biofilme geralmente mostram

sintomas recorrentes, após ciclos de terapia com antibiótico, até que a população séssil seja cirurgicamente removida do corpo. (COSTERTON *et al.*, 1999)

2.4 FORMAÇÃO DE BIOFILME POR *ACINETOBACTER BAUMANNII*.

A habilidade potencial de *A. baumannii* formar biofilme pode explicar sua proeminente resistência a antibióticos e propriedades de sobrevivência. Essa possibilidade é suportada por um número pequeno de publicações as quais mostraram que isolados clínico dessa bactéria são capazes de se aderir e formar estruturas de biofilme em superfícies abióticas como vidro e (VIDAL, 1996) plástico (TOMARAS *et al.*, 2003; LI *et al.*, 2007) havendo uma ligação entre a formação de biofilme e a capacidade de se aderir a células epiteliais humanas. (LEE *et al.*, 2006; LEE *et al.*, 2008; GADDY *et al.*, 2009) A formação de biofilme pode servir como um importante mecanismo de patogenicidade durante infecções urinárias, cateteres-associadas, bacteremia, e pneumonia hospitalar em pacientes com ventiladores mecânicos. Um estudo realizado por Rodríguez-Baño *et al.* (2008), embora limitado pelo baixo número de casos, sugeriu que o biofilme tem um papel na patogenicidade de algumas infecções associadas a aparelhos (cateter de Foley, cateteres venosos, desvio do fluido cerebrospinal). Contudo, pouco é conhecido sobre a formação de biofilme em *A. baumannii*.

Tomaras *et al* (2003) realizaram a caracterização inicial da estrutura do biofilme formada pelo *A. baumannii* sobre diferentes condições de culturas. Concluíram que *A. baumannii* forma biofilme em superfícies hidrofóbicas (plásticos) e hidrofílicas (vidro), cresce em diferentes condições de temperatura e produz cápsula de exopolissacarídeos. As análises quantitativas mostraram que o grupo de células se ligou ao poliestireno e polipropileno similarmente, mas sua ligação ao borosilicato foi significativamente reduzida. Culturas agitadas também reduziram a quantidade de células ligadas à superfície, quando comparadas com as não agitadas. A formação do biofilme foi mais eficiente a 30°C do que a 37°C. A incubação em meio mínimo com quelante de ferro resultou em um acréscimo na produção de biofilme. Os dados do estudo suportam a hipótese que *A. baumannii* produz exopolissacarídeos, que são parte da estrutura celular formada por essa bactéria quando cresce ligada a superfícies plásticas. Aglomerados mais densos foram observados na superfície líquido-ar. (TOMARAS *et al.*, 2003)

Formação de biofilme em instrumentos médicos, como tubos endotraqueais ou cateteres intravasculares, fornece um nicho para a bactéria provavelmente, a partir dos quais elas podem colonizar pacientes e dar origem a infecções sangüíneas ou do trato respiratório. (DIJKSHOORN *et al.*, 2007) Tem sido observado também que isolados clínicos de *A. baumannii* tem a habilidade de sobreviver longos períodos de tempo em condições altamente dissecadas em superfícies abióticas (GADDY E ACTIS, 2009) e possuem a capacidade de sobreviver em ambiente hospitalar por longos períodos de tempo resistindo a desinfecção (RAJAMOHAN *et al.*, 2009). King *et al.* (2009) encontraram uma associação entre alta produção de biofilme e resistência sérica. Parece haver alguma interação entre esses fatores de virulência: talvez a resistência sérica possa ajudar a bactéria a formar quantidade de biofilme abundante, uma vez que sobrevive na presença da resposta imune do hospedeiro; ou através das substâncias secretadas para formar biofilme que podem contribuir para resistência sérica.

Mecanismos da resistência a antibióticos do biofilme bacteriano: 1) o EPS do biofilme pode agir como um adsorvente, reduzindo a quantidade de antibiótico; 2) a estrutura do biofilme age como uma barreira de penetração; 3) o biofilme bacteriano aumenta a expressão das bombas de efluxo; 4) a presença de uma subpopulação bacteriana dormente e agrupada a qual é protegida da morte induzida por antibióticos. Shin *et al* (2008) demonstraram que isolados clínicos de *A. baumannii* multiresistentes apresentam uma alta capacidade para formar biofilme e Rao *et al.* (2008) encontrou uma associação significativa entre multiresistência e biofilme. Então, as funções da estrutura do biofilme formada por essa bactéria envolvem sua habilidade de resistir a terapias antimicrobianas assim como outros estresses ambientais como desidratação e disponibilidade limitada de nutrientes (GADDY E ACTIS, 2009). Li *et al.* (2007) constataram um significativo decréscimo na formação de biofilme em linhagens resistentes a colistina o que beneficiará a situação clínica, considerando que o biofilme de *A. baumannii* está relacionado com decréscimo na suscetibilidade a antibióticos. Outro estudo mostrou que biocidas induzem a formação de biofilme de isolados clínicos em concentrações subinibitórias, o que levanta uma preocupação sobre o uso inapropriado de biocidas/desinfetantes e também a persistência de *A. baumannii* através da indução de biofilme (RAJAMOHAN *et al.*, 2009).

Produção de biofilme pelo *A. baumannii* é considerada o principal fator responsável pelo aumento da virulência em infecções mistas, embora nenhuma correlação foi achada entre a quantidade de filme e o grau de virulência. Algumas pesquisas não acharam correlação entre

a habilidade de formar biofilme e o tipo molecular, resistência a carbapenêmicos e ciprofloxacino ou sítios de isolamento das linhagens clínicas cultivadas de pacientes hospitalizados (RODRIGUEZ-BANO *et al.*, 2008; WROBLEWSKA *et al.*, 2008). Há dados que apontam que os maiores produtores de biofilme foram sensíveis a muitos antibióticos e parecem ser menos epidêmicos, enquanto linhagens mais resistentes a drogas produziram pouca quantidade de biofilme. Outros estudos não acharam correlação da produção de biofilme com a gravidade da doença, somente observou-se um aumento na produção de biofilme com o tempo de infecção no paciente (WROBLEWSKA *et al.*, 2008; KING *et al.*, 2009). Uma possível explicação é que isolados formadores de biofilme não são tão dependentes como os não formadores de biofilmes de genes e mecanismos de resistência a antibióticos, visto que o próprio biofilme possui capacidade de proteger as células da ação antimicrobiana, e características epidêmicas para sobrevivência no ambiente hospitalar (RODRIGUEZ-BANO *et al.*, 2008).

É aparente que a habilidade desse patógeno de formar biofilme é multifatorial e diversa assim como adaptável a natureza da superfície nas quais as células estão interagindo. Similarmente relevante é a produção de fatores bacterianos que também determinam o resultado dessa interação quando tipos particulares de superfícies bióticas estão envolvidos. A elucidação dessas interações complexas é importante, não apenas para entender melhor a patobiologia do *A. baumannii*, mas também para identificação de novos alvos para futuras estratégias antimicrobianas (GADDY *et al.*, 2009).

2.5 REGULAÇÃO DE BIOFILME EM *ACINETOBACTER BAUMANNII*.

Há muitos fatores que controlam a formação de biofilme em *A. baumannii* que precisam ser elucidados, até o momento pouco é sabido sobre os mecanismos envolvidos na regulação da produção do biofilme. As proteínas até o momento identificadas são: Bap, AbaI, Bla_{PER1}, OmpA, CsuABCDE, PgaABCD e Proteína Diguanilato Ciclase.

Shin *et al* (2009) investigaram as proteínas diferencialmente expressas por *A. baumannii* cultivado em condições planctônicas e de biofilme. As proteínas significativamente mais expressas em células de biofilme foram a NAD-linked malatodesidrogenase (MDH), proteína receptora de membrana externa envolvida no transporte de ferro (TonB-dependente), a PER-1 e a enzima tipo I aminoglicosideo acetiltransferase (6') que são responsáveis pela resistência a antibióticos e também foram altamente induzidas durante a cultura de biofilme.

Exodeoxiribonuclease III, codificada pelo gene *xth* de *A. baumannii*. Nas células de biofilme, as proteínas relacionadas à sinalização mais expressas foram: Aldo/ceto redutase, uma histidina quinase sensora que é parte de um sistema de transdução de sinal com dois componentes (TCSTS). Identificaram também as proteínas expressas somente nas células do biofilme dentre elas estão a UDP-galactose 4-epimerase (GalE), a enzima GidA, N-acetilmuramoil-L-alanina amidase, e a proteína diguanilato ciclase (fosfodiesterase) que contém um domínio EAL (associado com atividade fosfodiesterase do c-di-GMP), um domínio GGDEF (associado com atividade diguanilato ciclase c-di-GMP sintetizadora), e um domínio PAS que age como sensor de luz, oxigênio, redox (GALPERIN, 2004; SHIN *et al.*, 2009).

2.5.1 Proteína Bap

Membros da família Bap são definidos como proteínas de alto peso molecular que estão presentes na superfície da bactéria e conferem a ela a habilidade de formar biofilme. Loehfelm *et al* (2008) identificaram um gene codificando um homólogo da Bap em *A baumannii* 307-0294. A comparação quantitativa da formação de biofilme por um mutante Bap-deficiente e uma bactéria tipo selvagem demonstrou que os mutantes são incapazes de sustentar o volume e a espessura do biofilme. Bap tem uma estrutura predita similar a adesinas bacterianas e pode funcionar como uma adesina intercelular de maneira que suporta a estrutura madura do biofilme.

2.5.2 Proteína AbaI

As bactérias estão de fato frequentemente envolvidas em atividades coordenadas em um grupo, e muitas bactérias gram negativas produzem lactonas N-acil homoserinas (AHSLs) como moléculas sinalizadoras no sistema regulatório *quorum sensing* (BASSLER, 1999; GONZALEZ *et al.*, 2009). O gene para uma sintase autoindutora designado *abaI* de uma linhagem de *A. baumannii* M2, foi clonado e caracterizado no estudo que demonstrou que ele direciona a produção de sinais de uma lactona acil-homoserina (AHL). A AbaI sintase autoindutora foi requerida para o desenvolvimento normal de biofilme, sua inativação resultou em um decréscimo de até 40% da produção de biofilme, sugerindo que as vias de *quorum sensing* *abaI*-diretas são requeridas para os estágios tardios da maturação do biofilme (NIU *et al.*, 2008).

2.5.3 Proteína Bla_{PER1}

PER-1 é uma betalactamase de espectro estendido (ESBL) tipo classe A, a qual é responsável pela resistência de bactérias gram negativas a antibióticos beta-lactâmicos de espectro estendido. Em um estudo com 23 isolados clínicos multiresistentes de *A. baumannii* demonstrou que os isolados que continham *bla_{PER-1}* mostraram uma capacidade significativamente maior para a aderência em células epiteliais e formação de biofilme, quando comparados com isolados sem o gene *bla_{PER-1}* (LEE *et al.*, 2008). Baseado nesse dado é possível especular que a aquisição do gene *bla_{PER-1}* além de conferir resistência a antibióticos em *A. baumannii* também aumenta a habilidade de formar biofilme, podendo ser considerado um importante gene de virulência para essa espécie.

2.5.4 Proteína OmpA

O trabalho de Gaddy *et al* (2009) mostra que uma proteína maior da membrana externa A (OmpA) tem um papel parcial na formação de biofilme em plástico e que é absolutamente requerida para a ligação a células epiteliais, processos que são independentes da produção do *csuA/BABCDE* pili mediado. OmpA provou ser essencial para a habilidade do *A. baumannii* se ligar a superfícies bióticas assim como aquelas representadas em células epiteliais alveolares humanas. OmpA tem também um papel na produção de compostos citotóxicos desconhecidos que demonstraram ser sensíveis ao calor e a protease (GADDY *et al.*, 2009).

2.5.5 Proteínas *CsuABCDE*

Através de uma análise genética e molecular do *A. baumannii* linhagem 19606 Dorsey *et al.* (2002) identificaram dois genes, *csuE* e *csuB*, na mesma região cromossômica, os quais sugeriam uma organização potencialmente similar aquela descrita para *Vibrio parahaemolyticus csuABCDE* locus. Inserções nos genes *csuB*- e *csuE*-like, os quais afetaram em diferentes graus a expressão da ligação e funções do biofilme, indica que a *A. baumannii* contem o locus *csuABCDE*. O papel desse predito locus é suportado pelo fato de que os produtos da translação previstos para os genes *csuC* e *csuD* são altamente relacionados a proteínas da membrana externa chaperonas e *usher assembly*. Esse tipo de sistema de secreção de proteínas, o qual foi descrita para outra bactéria esta envolvida na reunião de uma

variedade de estruturas de superfície que tem um papel na interação entre células bacterianas e superfícies abióticas e bióticas.

Tomaras *et al* (2003) confirmaram a presença da estrutura pili-like em *A. baumannii*, sabe-se que a motilidade celular mediada por apêndices como flagelo e pili ou a ação da dos glicopeptideolipídios é requerida para formação de biofilme por bactérias como *P. aeruginosa* (O'toole e Kolter, 1998). A motilidade por contração e deslizamento tem sido observada quando alguns isolados foram testados em meio semi-sólido. Esse trabalho provou que a presença de estruturas pili-like na superfície do *A. baumannii* é essencial para os primeiros passos para o processo que gera a formação de estruturas de biofilme em superfícies plásticas. Comprovaram que a expressão de *csuC* e *csuE*, o qual pertence a um grupamento de genes relacionados com o locus bacteriano que codifica a produção de pili, sua secreção e funções, são requeridos nos primeiros passos do processo que leva a formação de biofilme.

Uma histidina quinase sensora é parte de um sistema de transdução de sinal com dois componentes (TCSTS) sendo uma interface de comunicação onipresente distribuído em bactérias. TSCSTS permite respostas adaptativas a uma ampla variedade de estímulos ambientais (Shin *et al.*, 2009). Tomaras *et al.* (2008) caracterizaram um TCSTS de *A. baumannii* ATCC19606, a qual foi nomeado operon *bfmRS*, no qual *bfmS* codifica uma kinase sensora e *bfmR* codifica um regulador de resposta e concluíram que esses genes controlam a expressão do operon *csu* e a montagem do pili, controlando assim a formação de biofilme e a morfologia celular. A expressão do *csuAB* aparentemente codifica a maioria da subunidade do pili produzido por esse sistema integrado. Entretanto, os sinais ambientais ou sinais que esse sistema sensor reconhece e os genes alvos que ele controla, em adição ao *csu*, ainda esta indefinido.

2.5.6 Proteínas PgaABCD

Um dos polissacarídeos importantes que compõe a matriz do biofilme é o poli-beta-N-acetilglucosamina (PNAG). Em adição ao seu papel na superfície e da aderência célula-a-célula, PNAG é um importante fator de virulência e protege a bactéria contra as defesas inatas do hospedeiro. Estudos genéticos e bioquímicos demonstraram que o locus *pgaABCD* de *A. baumannii* codifica proteínas para a síntese de PNAG nesse organismo e que esses genes estão presentes em 30 isolados clínicos, a maioria dos quais produz polissacarídeo PNAG detectável. De todas as moléculas diferentes identificadas como componentes de biofilme,

PNAG é talvez uma das mais importantes e o fator amplamente conservado por diferentes espécies bacterianas. PNAG é fundamental para manter a integridade do biofilme de *A. baumannii*. (CHOI *et al.*, 2009)

2.5.7 Proteína Diguanylate Ciclase

A diguanylate ciclase (DGC's) produz a molécula de c-di-GMP a partir de dois GTPs e fosfodiesterases específicas (PDEs) quebram essa molécula em 5'-fosfoguanilil-(3'-5')-guanosina (pGpG) que é posteriormente separado em duas moléculas de GMP (HENGGE, 2009). O c-di-GMP (dímero de monofosfato cíclico de guanosina) é uma molécula solúvel que funciona como um mensageiro secundário em bactérias. Em geral, c-di-GMP estimula a biossíntese de adesinas e substância de exopolissacarídeos da matriz (SPIERS *et al.*, 2003) em biofilmes, interfere nas funções de virulência aguda e inibe várias formas de motilidade: controla a troca entre estilo de vida planctônico móvel e o biofilme sésil da bactéria (D'ARGENIO *et al.*, 2002). A atividade DGC esta associada com o domínio GGDEF e a atividade PDE c-di-GMP específica esta associada com os domínios EAL ou HD-GYP. Muitas das proteínas com esses domínios contem hélices transmembranas, que em bactérias Gram negativas pode localizar os sítios sensores no periplasma. Sinais percebidos incluem oxigênio e condições redox, luz, falta de nutrientes e varias substâncias extracelulares como antibióticos poliaminas ou moléculas de sinalização intracelular. Estes sinais são percebidos, por exemplo, por um domínio PAS flavina-associado (HENGGE, 2009).

O largo número de proteínas com domínios GGDEF e EAL em uma única espécie tem sido enigmático. Em geral, bactérias Gram-negativas tem mais dessas proteínas que as Gram-positivas, e as Gram-negativas exibem uma ampla variedade de proteínas com domínio GGDEF e EAL. As proteínas podem ter um domínio GGDEF, um domínio EAL ou dois domínios (HENGGE, 2009). Essas proteínas estão sendo identificadas, assim como os fatores que as regulam. Um estudo mostrou que a *P. aeruginosa* possui um sistema de transdução de sinal Wsp que é predito ativar a proteína WspR, uma proteína resposta reguladora com domínio GGDEF, por fosforilação (GOYMER *et al.*, 2006; GUVENER E HARWOOD, 2007).

O c-di-GMP tem emergido como mensageiro secundário de bactérias que esta universalmente envolvida na decisão molecular entre o estilo de vida bacteriano móvel-planctônico e sedentário. A notável multiplicidade de DGCs, PDEs c-di-GMP e

componentes associados a ligação do c-di-GMP uma única espécie, especialmente em Proteobacteria, permite uma pletera de sinais a serem integrados e muitos processos alvos serem regulados. Quatro tipos de proteínas efetoras c-di-GMP são conhecidas. A família de proteínas PilZ representa a classe melhor estudada. (HENGGE, 2009)

Amikam *et al.* (2006) identificaram o domínio PilZ indicando que esse domínio é parte das proteínas ligadoras de c-di-GMP (AMIKAM E GALPERIN, 2006). As proteínas PilZ-like estudadas até agora parecem ser ativas pelo c-di-GMP e funcionam por interações proteína-proteína, sendo que suas funções podem ser negativa ou positivamente controladas. A ligação afeta a motilidade em enterobactéria, pela atividade flagelar de *E. coli* e *Salmonella* spp, a motilidade por contração de *P. aeruginosa* (RYJENKOV *et al.*, 2006), a produção de exopolissacarídeo alginato em *Pseudomonas* sp. (MERIGHI *et al.*, 2007), a expressão de genes de virulência em *Vibrio cholerae* (PRATT *et al.*, 2007) e a síntese de celulose de varias bactérias Gram negativas (HENGGE, 2009).

Evidências indicam que bactérias Gram negativas podem responder a aminoglicosídeos por formar biofilme resistente a antibióticos. Em *P. aeruginosa* essa resposta do biofilme requer o produto do gene *arr* que atua como um regulador que altera os níveis de c-di-GMP por possuir uma fosfodiesterase interna da membrana (EAL). Baseado nos resultados foi proposto que a tobramicina, mesmo direta ou indiretamente, aumenta a atividade da fosfodiesterase do domínio citoplasmático EAL da Arr levando a inativação do c-di-GMP e aumentando a formação de biofilme. É possível que a tobramicina e Arr estejam regulando a formação de biofilme por alterar os apêndices da superfície como pili e flagelo (HOFFMAN *et al.*, 2005). Assim, o c-di GMP pode estar envolvido também com fatores de resistência a antibióticos.

3. OBJETIVO

Avaliar a capacidade de formação de biofilme de duas amostras clínicas obtidas em hospitais da cidade de Porto Alegre, realizando experimentos *in vitro* em placas de poliestireno testando diferentes concentrações de glicose no meio de cultura.

Caracterizar a presença do gene *wspR* como um fator envolvido no processo de formação de biofilme em *Acinetobacter* spp. pela amplificação do gene utilizando a técnica de PCR e posterior clonagem do produto da amplificação em vetor de expressão.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS BACTERIANAS

As duas cepas de *Acinetobacter* spp. (amostra 1 e amostra 2) testadas para a formação de biofilme e as três cepas utilizadas para identificação da presença do gene *wspR*, foram cedidas pelos hospitais de Porto Alegre HPS (amostra 1 e 1.2) e HCPA (amostra 2).

Para análise da morfologia e confirmação da pureza das culturas, estas foram crescidas em meio MacConkey por 24 horas a 37°C. Foram feitos os testes com meio TSI, de catalase e de oxidase. A pureza das cepas foi confirmada pela característica morfológica no meio sólido e pelos resultados dos testes verificados.

Para as análises de biofilme uma cepa de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 foi usada como controle positivo por ser caracterizada como um microrganismo forte formador de biofilme.

4.2 ENSAIO DE BIOFILME EM MICROPLACAS DE POLIESTIRENO

4.2.1 SUSPENSÃO BACTERIANA

As cepas de *Acinetobacter* spp. e do controle positivo foram inoculadas em meio LB sólido e incubadas a 37°C por 48 horas. Após este período procedeu-se a padronização dos inóculos de acordo com o protocolo de detecção de biofilme em microplaca pelo método de cristal violeta (Schmidt, 2009). As colônias crescidas nas placas de LB foram transferidas para a solução salina até turvação de 0,5 de acordo com a Escala Mac Farland (1×10^8 UFC/mL). Assim foi determinada a suspensão bacteriana inicial para cada cepa teste.

4.2.2 ENSAIO DE BIOFILME

O protocolo utilizado para os testes de formação de biofilme *in vitro* foi o descrito por Schmidt (2009) com adaptações. Para este teste foram utilizados as placas de microtitulação de poliestireno com 96 poços (8x12) estéreis permitindo oito repetições para cada condição (concentração de glicose) testada.

Após a preparação e padronização das suspensões bacterianas, 20 µL de cada suspensão foram transferidos para os poços das microplacas junto com alíquotas de 180 µL de caldo LB suplementado com 0,25%, 0,75%, 0,50%, 0,75% e 1% de glicose e com LB sem suplemento de glicose, cada meio foi testado em oito repetições para cada amostra. Foram inoculados 20 µL de *S. epidermidis* ATCC 35984, forte formador de biofilme, em 180 µL dos meios de culturas testados como controle positivo. Foi utilizado como controle negativo o mesmo volume dos meios de cultura, porém ausente de inóculo microbiano. As microplacas foram incubadas por 24 horas. Após este período, foram descartados os conteúdos dos poços com as células planctônicas e foram lavadas três vezes com 200 µL de salina estéril. Após a retirada do excesso de solução salina foram adicionados 150 µL de metanol, por 20 minutos, para a fixação do biofilme e então as microplacas foram secas “overnight”. A seguir, os poços foram corados com solução de Cristal Violeta 0,5% por 15 minutos, a temperatura ambiente, lavados com água e levemente secos a temperatura ambiente com papel absorvente para a adição de 150 µL de etanol 95% por 30 minutos.

A densidade óptica (DO) dos biofilmes bacterianos aderidos e corados foi lida com o auxílio de um leitor automatizado de Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) em comprimento de onda de 450 nm.

Todas as cepas foram separadas em categorias usando a DO dos biofilmes bacterianos, como descrito anteriormente por Christensen et al. (1985) e adaptado por Marinho (2009) com 99% de significância. As amostras foram classificadas como: não formador de biofilme, fraco formador de biofilme, moderado formador de biofilme e forte formador de biofilme.

4.3 IDENTIFICAÇÃO DO GENE *wspR*

4.3.1 DESENHO DOS PRIMERS

Para a montagem dos primers do gene *wspR* foi realizada uma busca no banco de dados NCBI e escolhido a sequência genômica, com 1230 pares de base, *wspR* - putative two-component response regulator (GeneID:4919481) de uma linhagem de *A. baumannii* ATCC 17978. Ao início da sequência do primer *forward* foi adicionado um sítio de restrição para a enzima de restrição *NdeI* e ao início do primer *reverse* foi adicionado um sítio de restrição para a enzima de restrição *BamHI*, para posterior clonagem em vetor de expressão.

4.3.2 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração do DNA das três amostras, duas do Hospital de Pronto Socorro de Porto Alegre (Amostra 1 e amostra 1.2) e uma amostra do Hospital de Clinicas de Porto Alegre (Amostra 2), foi feita Segundo o protocolo de extração de DNA: fenol-clorofórmio Fredricks e Relman (1998) modificado. Uma alíquota de 5 ml de cultura sob crescimento a 37°C *overnight* em caldo LB foi centrifugada por 5min a 6000 rotações por minuto (rpm), o sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado com tampão TE-1X (Tris 10 mM, EDTA 1 mM – pH7,8) e ressuscitado com o mesmo tampão; Foi adicionado TE⁵N (TE-5X + NaCl), 10% do volume de SDS e Proteinase K [20 mg/ml]; Incubou-se, em banho, por 1h a 37°C; Adicionou-se NaCl 5 M e fenol-clorofórmio (1:1), centrifugou-se 15 min a 14000 rpm e coletou-se a fase aquosa e colocando-a em um outro eppendorf; depois foi adicionado clorofórmio-alcoolisoamílico (9:1) na fase aquosa, centrifugou-se 15 min a 14000 rpm e coletou-se a fase aquosa, colocando-a em um outro eppendorf ; foi adicionado etanol 100% a fase aquosa coletada. A amostra foi incubada por 1h a -20°C; Centrifugou-se por 15 min a 13.000rpm e desprezou-se o sobrenadante; O pellet foi ressuscitado em TE-1X.

4.3.3 PCR

A identificação do gene *wspR* foi realizada pela técnica de PCR com os primers desenhados, utilizando a enzima *Taq* DNA polimerase (CBIot), com o auxílio de um termociclador. Após, 10 µl da reação foram aplicadas em gel de agarose 1%, juntamente com um marcador de peso molecular de 1 Kb (Fermentas).

4.3.4 CLONAGEM DO GENE *wspR*

Para a clonagem do gene *wspR* foi realizado uma reação de PCR com a amostra 1 utilizando a DNA polimerase *Taq platinum* (Invitrogen) e o fragmento foi ligado à um vetor de expressão, o plasmídeo pCR-Blunt (Invitrogen), utilizando a enzima T4 DNA ligase (Promega). O plasmídeo foi inserido por choque térmico na linhagem bacteriana de *E. coli* Top10, a qual foi semeada em meio seletivo sólido LB com kanamicina (50 µg/ml), *overnight* a 37°C. A colônia crescida foi inoculada em 5mL de meio LB líquido *overnight* a 37°C e depois foi realizado uma extração plasmidial (miniprep) por lise alcalina e purificação em coluna (Plasmid Miniprep - Invitrogen).

Para a comprovação da clonagem os plasmídeos foram digeridos *overnight* a 37°C com as enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI*, que clivam o DNA alvo nos sítios de restrição 5' CA*TATG 3' e 5'G*GATCC 3', respectivamente.

4.3.5 SEQUENCIAMENTO

Foi feito o sequenciamento para verificação do grau de homologia do gene clonado com o gene de referência *wspR* - *putative two-component response regulator* (GeneID:4919481) de *A. baumannii* ATCC 17978. A qualidade do sequenciamento foi confirmada pelo programa BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>), e o grau de homologia foi analisado por alinhamento de seqüências utilizando o programa EBI-clustalW2 (*European Bioinformatics Institute* – www.ebi.ac.uk) e NCBI-BLAST (*National Center for Biotechnology Information* – www.ncbi.nlm.nih.gov).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras 1 e 2 cresceram em meio sólido MacConkey e as colônias observadas possuíam as seguintes características morfológicas: lisas, mucóides, opacas, levemente rosadas e arredondadas. Nos testes bioquímicos elas foram catalase positiva, oxidase negativa e não fermentadoras, assim sendo caracterizadas como pertencentes ao gênero *Acinetobacter* spp. (SCHRECKENBERGER *et al.*, 2007)

5.1 Formação de biofilme

Ambas as cepas produziram biofilme em 24 h a 37°C em meio LB (Figura 2) sem agitação em microplacas de ELISA. As amostras produziram maior volume de biofilme com o aumento da concentração de glicose no meio (gráfico 1). Quando testadas em LB suplementado com 1% de glicose a amostra 1 foi forte formadora e a amostra 2 foi moderadamente formadora de biofilme; enquanto que em LB sem suplemento de glicose a amostra 1 foi moderadamente produtora de biofilme e a amostra 2 foi fraca produtora. Indicando assim, que a formação de biofilme, pelas cepas hospitalares de *Acinetobacter* spp. testadas, está diretamente relacionada com a presença de glicose do meio. Esse resultado vai ao encontro do fato constatado por Lee *et al* (2008) de que isolados clínicos de *A. baumannii* multiresistentes possuem grande habilidade para formar biofilme, mas contraria o fato de que a formação de biofilme ocorre em maior grau quando o *A. baumannii* está em meio mínimo de crescimento (TOMARAS *et al.*, 2003). A capacidade das linhagens clínicas testadas de formar biofilme em superfície plástica é preocupante, pois o poliestireno é um polímero comumente usado na fabricação de vários aparelhos médicos; assim como um aumento da quantidade de biofilme em maiores concentrações de glicose, pois pode favorecer a formação de biofilme em dispositivos médicos ou tecidos do hospedeiro visto que o sangue e urina possuem uma considerável concentração de glicose.

Além disso, a habilidade potencial de *A. baumannii* formar biofilme pode explicar sua proeminente resistência a antibióticos e propriedades de sobrevivência no ambiente hospitalar. A formação de biofilme por linhagens hospitalares é um fator preocupante, pois favorece a persistência no ambiente hospitalar, visto que biofilme podem suportar privação de nutrientes, mudanças de pH, radicais de oxigênio, desinfetantes (JEFFERSON, 2004; RAJAMOHAN *et al.*, 2009), assim como aumenta a resistência a antibióticos. A maioria das infecções hospitalares está provavelmente relacionada a biofilmes em cateteres médicos, na verdade, os

biofilmes se formam em quase todos os dispositivos médicos de uso interno (TORTORA *et al.*, 2005). O biofilme pode resistir a forças de cisalhamento e fagocitose por células inflamatórias (JEFFERSON, 2004), também há uma ligação entre a formação de biofilme e a capacidade de se aderir a células epiteliais humanas (LEE *et al.*, 2006; LEE *et al.*, 2008; GADDY *et al.*, 2009), um importante fator de patogenicidade.

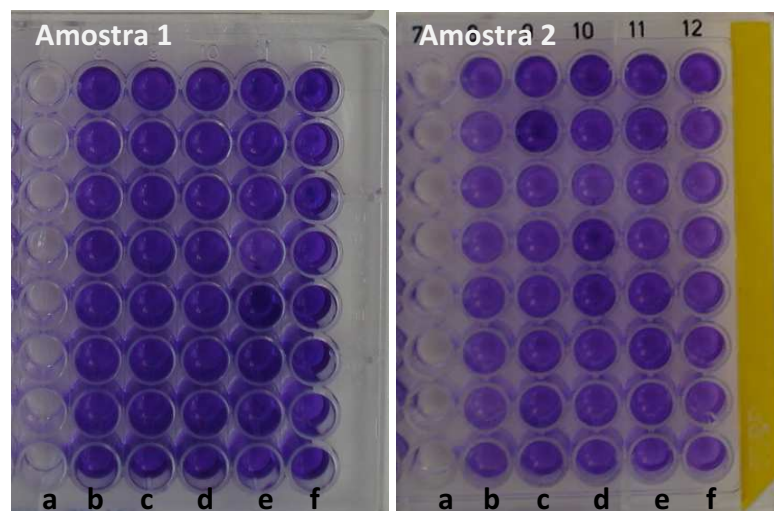


Figura 2. Análise da formação de biofilme pela Amostra 1, corresponde a linhagem isolada do HPS, e amostra 2, corresponde a linhagem isolada do HCPA. Para as análises foram realizadas oito repetições para cada condição testado. Cada coluna a partir da esquerda para direita corresponde, respectivamente ao branco (a) e aos meios de cultura LB (b), LB suplementado com 0,25% de glicose (c), com 0,50% de glicose (d), com 0,75% de glicose (e), e com 1,0% de glicose (f).

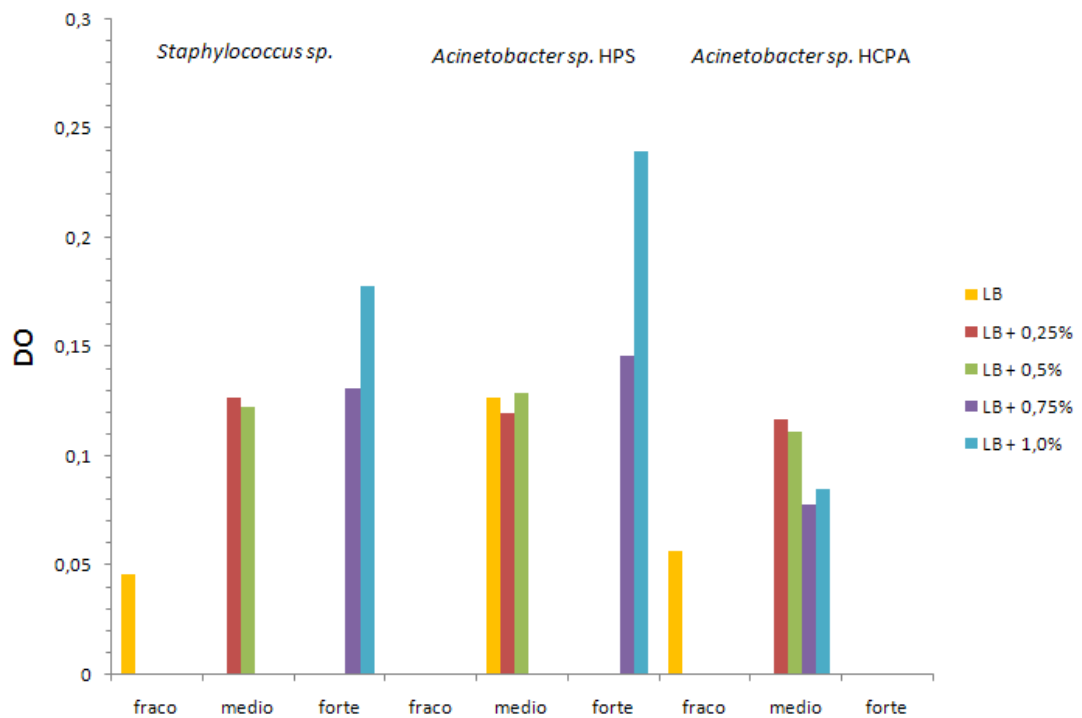


Gráfico 1.: Análise da formação de biofilme pela amostra 1 (*Acinetobacter* sp. HPS) e pela amostra 2 (*Acinetobacter* sp. HCPA). Os resultados foram comparados com o padrão *Staphylococcus epidermidis*, em função da densidade óptica observada para cada meio de cultura testado: LB, LB + 0,25% de glicose, LB + 0,50% de glicose, LB + 0,75% de glicose, LB + 1,0% de glicose.

5.2 Análise genotípica do gene *wspR*

Pela análise da reação de PCR com os primers montados (Tabela 1) foi identificado a presença do gene *wspR* nas 3 amostras de *Acinetobacter spp.* testadas (Figura 3), indicando que esse gene é provavelmente bem conservado entre as linhagens patogênicas de *Acinetobacter spp.* Podemos deduzir que, assim como para *P. aeruginosa*, é um gene amplamente distribuído nesse gênero também. A proteína WspR é uma proteína resposta reguladora com domínio GGDEF, que quando ativada por fosforilação, forma um mensageiro secundário c-di-GMP (GOYMER *et al.*, 2006; GUVENER E HARWOOD, 2007). O c-di-GMP se liga a outras proteínas, como a proteínas PilZ-like, regulando-as positiva ou negativamente (HENGGE, 2009) afetando a atividade flagelar ou a motilidade por contração como em *P. aeruginosa* (RYJENKOV *et al.*, 2006), a produção de exopolissacarídeo alginato em *P. aeruginosa* (MERIGHI *et al.*, 2007), a expressão de genes de virulência em *Vibrio cholerae* (PRATT *et al.*, 2007) e a síntese de celulose de varias bactérias Gram negativas. É

assim, considerada uma proteína relacionada com a formação de biofilme e patogenicidade de microrganismos, podendo ser um alvo para futuros fármacos no tratamento de infecções com *Acinetobacter spp.*

Primer Forward	5' (<i>NdeI</i>)	CCACA TATG ATG AAG TTG CAA GGT TCC AAT 3'
Primer Reverse	5' (<i>BamHI</i>)	CCAG GATCC TTA AGT TAG ATC TAC AAT TTG 3'

Tabela 1: Primers *forward* e *reverse*. Na posição 5' da seqüência do primer *forward* foi adicionado um sítio de restrição para a enzima de restrição *NdeI* e na posição 5' do primer *reverse* foi adicionado um sítio de restrição para a enzima *BamHI*.

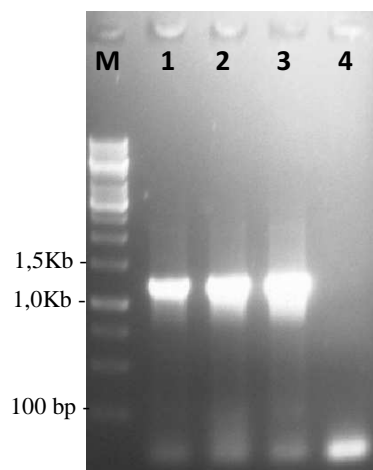


Figura 3.: Gel agarose 1% corado com brometo de etídio e visualizado em luz UV. Marcador de peso molecular (1Kb invitrogen) (M); amostra 1 (1) amostra 1.2 (2) amostra 2 (3) e controle negativo (4), indicando a presença do gene *wspR* (1230pb) nas amostras analisadas.

Foi feita a reação de PCR com a DNA polimerase *Taq platinum* da amostra 1. O amplicon do gene *wspR* foi ligado ao vetor de clonagem pCR-Blunt e transformado por choque térmico em *E. coli* TOP10. Após, os plasmídeos foram extraídos por lise alcalina e digeridos com as enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI*, que digeriram o DNA plasmidial em seus respectivos sítios de restrição, previamente inseridos nos primers de amplificação do gene de interesse (tabela 1). O vetor recombinante pCR-Blunt::*wspR* contendo o gene de interesse foi confirmado pela verificação do fragmento do gene *wspR* de tamanho correto

(1.2Kb) (Figura 4). Posteriormente, o *wspR* será ligado a um vetor de expressão para futuras análises da proteína WspR de *Acinetobacter spp.*

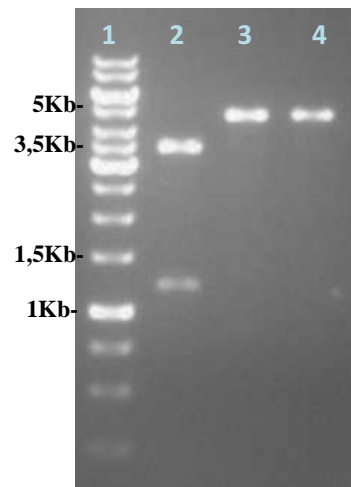


Figura 4.: Gel agarose 1% corado com brometo de etídio e visualizado em luz UV. Marcador de peso molecular (1Kb invitrogen) (1), pCRBlunt::*wspR* clivado com as enzimas de restrição *NdeI* e *BamHI* (2) onde podemos observar os fragmentos de DNA de tamanho 1,2 Kb referente ao gene *wspR* e de 3,5 Kb referente ao plasmídeo; pCRBlunt::*wspR* clivado com a enzima de restrição *NdeI* (3) e pCRBlunt::*wspR* clivado com a enzima de restrição *BamHI* (4) ambas clivagens geraram um fragmento de DNA de 5 Kb indicando a ligação do gene com o plasmídeo.

O plasmídeo foi seqüenciado para verificação do grau de homologia do gene clonado com o gene de referência *wspR* - putative two-component response regulator (GeneID:4919481) de *A. baumannii* ATCC 17978. O grau de homologia foi analisado pelo programa EBI- clustal W. Pela análise podemos afirmar que o gene clonado é o *wspR* de *Acinetobacter spp.*

Alinhamento do fragmento seqüenciado (reverse) com o gene *wspR* de *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 reverse translated:

CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment

```

ACTGene317_001          -----ATTCTTCATTCAA-GCATTTTGATATTGATTGCGGCCATT 39
atcc_revtanslated      TTAAGTTAGATCTACAATTTGTTCTTCATTCAAAGCAATTTGATATTGATTGCGGCCATT 60
                        *****  *** *****

ACTGene317              TGTTTTTGCCTGATAGAGCGCATGATCAGCAGACTAACAAAAGCAGAAATTGAATCATT 99
atcc_revtanslated      TGTTTTTGCCTGATAGAGCGCATGATCAGCAGACTAACAAAAGCAGAAATTGAATCATT 120
                        *****

ACTGene317              TAAACGTGGAATTGTGGTCGCCACGCCAACACTAATAGTTACGTATGGTGAAACACTACT 159
atcc_revtanslated      TAAACGTGGAATTGTGGTCGCCACGCCAACACTAATAGTTACGTATGGTGAAACACTACT 180
                        *****

```

ACTGene317 ACATGGATGAACAATAGCAATTTTCTTAATTGCATTCATTAATCTTTTCGGCCTGAATTTT 219
atcc_revtanslated ACATGGATGAACAATAGCAATTTTCTTAATTGCATTCATTAATCTTTTCGGCCTGAATTTT 240

ACTGene317 GGCTTGTGTGCATTTGTCATTGGGAACAGAAGTAAGAATTCCTCACCGCCATAACGGGC 279
atcc_revtanslated GGCTTGTGTGCATTTGTCATTGGGAATAGAAGTAAGAATTCCTCACCGCCATAACGGGC 300

ACTGene317 AACCAAATCGCCACTACGAGCAGCAATGAGGAAATTGCAGTCGCAATATCCTTTAAACA 339
atcc_revtanslated AACCAAATCGCCACTACGAGCAGCAATGAGGAAATTGCAGTCGCAATATCCTTTAAACA 360

ACTGene317 CTGATCACCCCTTGAGATGGCCTAAGCTATCGTTATATGGTTTAAAGAAGTCGATATCAAC 399
atcc_revtanslated CTGATCACCCCTTGAGATGGCCTAAGCTATCGTTATATGGTTTAAAGAAGTCGATATCAAC 420

ACTGene317 CATCATAATAGTAAGAGGAGTCTCATGGCGTAATGCGCGTCGCCATTCAATATCAAGTGT 459
atcc_revtanslated CATCATAATAGTAAGAGGAGTCTCATGGCGTAATGCGCGTCGCCATTCAATATCAAGTGT 480

ACTGene317 TTCATCAAGATAACGTCGGTTAGCAAGCCCGGTTAAAGCATCTTGTTGAGAAAGCAGTGA 519
atcc_revtanslated TTCATCAAGATAACGTCGGTTAGCAAGCCCGGTTAAAGCATCTTGTTGAGAAAGCAGTGA 540

ACTGene317 CAGTTGTGAGCTTGTTGCATGAGTTCAATACGGTTGAGCTCAATCATAACAGTTTGTAA 579
atcc_revtanslated CAGTTGTGAGCTTGTTGCATAAGTTCAATACGATTGAGCTCAATCATAACAGTTTGTAA 600

ACTGene317 ATAGTTTTCACGGTGCTGACGATCCGTAGCATAGGCAAGGGTCATGCCTAAGAACTACT 639
atcc_revtanslated ATAGTTTTCACGGTGCTGACGATCCGTAGCATAGGCAAGGGTCATGCCTAAGAACTACT 660

ACTGene317 AAACGTATATGTACGGTTCAAGAAAGTCCAGTCTATGTCTCCGTTCAAATAGGTGCTTAC 699
atcc_revtanslated AAACGTATATGTACGGTTCAAGAAAGTCCAGTCTATGTCTCCGTTCAAATAGGTGCTTAC 720
***** **

ACTGene317 CAAA-TACCAATAAGACCGCCGACCAA----- 726
atcc_revtanslated CAAAATAACCAATAAGACCGCCGACCCATCCTGCAATAATGGCAGTATAAAAACGCATGCC 780

ACTGene317 -----
atcc_revtanslated TACCGCACCATAGATAATCACAATGGCATAACATCATTGCAGCATGAAAAAGTACATTATC 840

ACTGene317 -----
atcc_revtanslated TTGGCCATTTTCTAAAACGTTAATTAAGATAAATGTTATGGCAACGGCAGCGGAAGAACC 900

ACTGene317 -----
atcc_revtanslated AATTCCGACATAATAATCAAACCACTGATTTAATTTTAAATAAATGATAAAATCCAGGC 960

ACTGene317 -----
atcc_revtanslated GATTAATAAATATATGCCTACCAAGAATAATAGCTTAACCAGGATAAAACTTGTTCGGT 1020

ACTGene317 -----
atcc_revtanslated TGGTAAACTTGGTATATACCAAAGCTTAAAAATAAATAAATAAATAAATAAATAGGTGC 1080

ACTGene317 -----
atcc_revtanslated TCTATAGCGAAACTCATAGGCTGCACCATTTTGATATTGAAAACGATATATCGTTTCAAG 1140

ACTGene317 -----
atcc_revtanslated TTGCTTTGGAAACCATACGAAATTTAATCCGCGTGTGGTTAATAAATCTATTTGTTCCCTG 1200

ACTGene317 -----
atcc_revtanslated TCCCAATATATTGGAACCTTGCAACTTCAT 1230

Alinhamento do fragmento seqüenciado (forward) com o gene *wspR* de *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978:

CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment

```

ACTGene317_002      -----GTATTGGGACAGGAACAA-TAGATTATTAACCACACGC 38
atcc                ATGAAGTTGCAAGGTTC AATATATTGGGACAGGAACAAATAGATTATTAACCACACGC 60
                    *****

ACTGene317_002      GGATTAAATTTTCGTATGGTTTCCAAAGCAACTTGAAACGATATATCGTTTCAATATCAA 98
atcc                GGATTAAATTTTCGTATGGTTTCCAAAGCAACTTGAAACGATATATCGTTTCAATATCAA 120
                    *****

ACTGene317_002      AATGGTGCAGCCTATGAGTTTCGCATAGAGCACCTATTATTTAATATTATATTTATTT 158
atcc                AATGGTGCAGCCTATGAGTTTCGCATAGAGCACCTATTATTTAATATTATATTTATTT 180
                    *****

ACTGene317_002      TTAAGCTTTGGTATATACCAAGTTTACCAACCGAACAAGTTTATCCTGGTTAAGCTAT 218
atcc                TTAAGCTTTGGTATATACCAAGTTTACCAACCGAACAAGTTTATCCTGGTTAAGCTAT 240
                    *****

ACTGene317_002      TATTCTTGGGTAGGCATAATGTTTTAATCGCCTGGATTTTATCATTATTAAAAAATTA 278
atcc                TATTCTTGGGTAGGCATAATGTTTTAATCGCCTGGATTTTATCATTATTAAAAAATTA 300
                    *****

ACTGene317_002      AATCAGTGGTTTGATTATTATGTGCGCATTGGTCTTCCGCTGCCGTTGCCATAACATTT 338
atcc                AATCAGTGGTTTGATTATTATGTGCGGAATTGGTCTTCCGCTGCCGTTGCCATAACATTT 360
                    *****

ACTGene317_002      ATTTTAATTAACGTTT TAGAAAATGGCCAAGATAATGTACTTTTTCATGCAGCAATGATG 398
atcc                ATCTTAATTAACGTTT TAGAAAATGGCCAAGATAATGTACTTTTTCATGCAGCAATGATG 420
                    ** *****

ACTGene317_002      TATGCCATTGTGATTATCTATGGTGCAGGTAGGCATGCGTTTTTATACTGCCATTATTGCA 458
atcc                TATGCCATTGTGATTATCTATGGTGCAGGTAGGCATGCGTTTTTATACTGCCATTATTGCA 480
                    *****

ACTGene317_002      GGATGGGTCGCGGCTCTTATGGTATTTTGGTAAGCACCTATTTGAACGGAGACATAGAC 518
atcc                GGATGGGTCGCGGCTCTTATGGTATTTTGGTAAGTACCTATTTGAACGGAGACATAGAC 540
                    *****

ACTGene317_002      TGGACTTCTTGAACCGTACATATACGTTTAGTAGTTTCTTAGGCATGACCCCTGCCTAT 578
atcc                TGGACCTTCTTGAACCGTACATATACGTTTAGTAGTTTCTTAGGCATGACCCCTGCCTAT 600
                    *****

ACTGene317_002      GCTACGGATCGTCAGCACCGTGAAAACATTTACAAAACGTATGATTGAGCTCAACCGT 638
atcc                GCTACGGATCGTCAGCACCGTGAAAACATTTACAAAACGTATGATTGAGCTCAACCGT 660
                    *****

ACTGene317_002      ATTGAACTCATGCAACAAGCTCAACAACGTGCTACTGCTTTCTCAACAAGATGCTTTAAC 698
atcc                ATTGAACTTATGCAACAAGCTCAACAACGTGCTACTGCTTTCTCAACAAGATGCTTTAAC 720
                    *****

ACTGene317_002      GGGCTTG----- 705
atcc                GGACTTGCTAACCGAGTTATCTTGATGAAACACTTGATAATGAATGGCGACGCGCATT 780
                    ** ****

ACTGene317_002      -----
atcc                CGCCATGAGACTCCTCTTACTATTATGATGGTTGATATCGACTTCTTTAAACCATATAAC 840

ACTGene317_002      -----
atcc                GATAGCTTAGGCCATCTCAAGGTGATCAGTGTTTAAAAGATATTGCGACTGCAATTTCC 900

ACTGene317_002      -----
atcc                TCAATGCTGCTCGTAGTGGCGATTGTTGCCCCTTATGGCGGTGAAGAATCTTACTT 960

ACTGene317_002      -----
atcc                CTATTCCCAATGACAAATGCACAACAAGCCAAAATTCAGGCCGAAAGATTAAATGAATGCA 1020

```

```
ACTGene317_002 -----  
atcc ATTAAGAAAATTGCTATTGTTCCATCCATGTAAGTAGTGTTCACCATACGTAACCATTAGT 1080  
  
ACTGene317_002 -----  
atcc GTTGGCGTGGCGACCACAATTCCACGTTTAAATGATTCAATTTCTGCTTTTGTAGTCGT 1140  
  
ACTGene317_002 -----  
atcc GCTGATCATGCGCTCTATCAGGCAAAAACAAATGGCCGCAATCAATATCAAATTGCTTTG 1200  
  
ACTGene317_002 -----  
atcc AATGAAGAACAAATTGTAGATCTAACTTAA 1230
```

6. CONCLUSÃO

As duas amostras clínicas de pacientes hospitalizados na cidade de Porto Alegre mostraram-se eficazes formadoras de biofilme em microplacas de ELISA à temperatura de 37°C durante 24 horas em meio LB. A glicose adicionada ao meio de cultura LB em crescentes concentrações influenciou positivamente a formação de biofilme. O aumento da produção de biofilme pelas duas amostras testadas foi diretamente proporcional ao aumento de glicose no meio, onde a maior produção ocorreu com a suplementação de 1% de glicose ao LB. Houve uma variação entre as amostras testadas quanto ao grau de formação de biofilme; a amostra 1 foi forte formadora de biofilme enquanto que a amostra 2 foi apenas moderadamente formadora. Deste modo, a formação de biofilme pode estar relacionada com a patogenicidade de *Acinetobacter* spp., principalmente na contaminação do ambiente hospitalar e de dispositivos médicos além de ter demonstrado capacidade de formar biofilme em condições similares as encontradas nos tecidos dos hospedeiros.

As amostras testadas possuem o gene *wspR*, o qual pode estar envolvido na formação do biofilme por *Acinetobacter* spp. A proteína WspR, uma diguanilato ciclase, possui um domínio GGDEF e quando sinalizada pode ser capaz de formar o mensageiro secundário c-di-GMP, o qual regula genes e proteínas modificando os maquinários celulares fazendo com que a bactéria passe da vida planctônica para a vida séssil. Sendo assim, um interessante alvo para novas terapias antimicrobianas combinadas, visto o aumento de resistência desse microrganismo aos antibióticos convencionalmente utilizados e sua capacidade de formar biofilme.

7. REFERÊNCIAS

ACTIS, L. A., TOLMASKY ME, CROSA LM, CROSA JH. Effect of iron-limiting conditions on growth of clinical isolates of *Acinetobacter-baumannii*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 31, n. 10, p. 2812-2815, 1993.

AMIKAM, D.; GALPERIN, M. Y. PilZ domain is part of the bacterial c-di-GMP binding protein. **Bioinformatics**, v. 22, n. 1, p. 3-6, 2006.

ANSTEY, N. M., CURRIE BJ, HASSELL M, PALMER D, DWYER B, SEIFERT H. Community-acquired bacteremic *Acinetobacter pneumonia* in tropical Australia is caused by diverse strains of *Acinetobacter baumannii*, with carriage in the throat in at-risk groups. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 685-686, 2002.

BARCITTA, M., CIPRESSO R, GIAQUINTA L, ROMEO MA, DENARO C, PENNISI C, AGODI A. Acquisition and spread of *Acinetobacter baumannii* and *Stenotrophomonas maltophilia* in intensive care patients. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 212, n. 3, p. 330-337, 2009.

BASSLER, B. L. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, n. 6, p. 582-587, 1999.

BERGOGNEBEREZIN, E.; TOWNER, K. J. *Acinetobacter* spp, as nosocomial pathogens: Microbiological, clinical, and epidemiological features. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9, n. 2, p. 148+, 1996.

BERK, S. L.; MCCABE, W. R. Meningitis caused by *acinetobacter-calcoaceticus* var *anitratu*s - a specific hazard in neurosurgical patients. **Archives of Neurology**, v. 38, n. 2, p. 95-98, 1981.

BERNARDS, A. T., DE BEAUFORT AJ, DIJKSHOORN L, VAN BOVEN CP. Outbreak of septicaemia in neonates caused by *Acinetobacter junii* investigated by amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) and four typing methods. **Journal of Hospital Infection**, v. 35, n. 2, p. 129-140, 1997.

BOUVET, P. J. M.; GRIMONT, P. A. D. Taxonomy of the genus acinetobacter with the recognition of *Acinetobacter-baumannii* sp-nov, *Acinetobacter-haemolyticus* sp-nov, *Acinetobacter-johnsonii* sp-nov, and *Acinetobacter-junii* sp-nov and emended descriptions of *Acinetobacter-calcoaceticus* and *Acinetobacter-lwoffii*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 36, n. 2, p. 228-240, 1986.

CARNEIRO, M., BARBOSA PI, VESPERO EC, TANITA MT, CARRILHO CM, PERUGINI M, SARIDAKIS HO, POSSUELO LG, RENNER JD, VALIM AR, TOGNIN MC, MARTINS AF, BARTH AL. Carbapenem-resistant OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* isolates causing ventilator-associated pneumonia. **American Journal of Infection Control**, v. 38, n. 8, p. 667-669, 2010.

CHANG, W. N., LU CH, HUANG CR, CHUANG YC. Community-acquired *Acinetobacter meningitis* in adults. **Infection**, v. 28, n. 6, p. 395-397, 2000.

CHEN, M. Z., HSUEH PR, LEE LN, YU CJ, YANG PC, LUH KT. Severe community-acquired pneumonia due to *Acinetobacter baumannii*. **Chest**, v. 120, n. 4, p. 1072-1077, 2001.

CHOI, A. H. SLAMTI L, AVCI FY, PIER GB, MAIRA-LITRÁN T. The pgaABCD Locus of *Acinetobacter baumannii* Encodes the Production of Poly-beta-1-6-N-Acetylglucosamine, Which Is Critical for Biofilm Formation. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 19, p. 5953-5963, 2009.

CISNEROS, J. M., REYES MJ, PACHÓN J, BECERRIL B, CABALLERO FJ, GARCÍA-GARMENDÍA JL, ORTIZ C, COBACHO AR. Bacteremia due to *Acinetobacter baumannii* epidemiology, clinical findings, and prognostic features. **Clinical Infectious Diseases**, v. 22, n. 6, p. 1026-1032, 1996.

CISNEROS, J. M.; RODRIGUEZ-BANO, J. Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical features and treatment. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 8, n. 11, p. 687-693, 2002.

COCHRANE, D. M. BROWN MR, ANWAR H, WELLER PH, LAM K, COSTERTON JW. Antibody-response to pseudomonas-aeruginosa surface protein antigens in a rat model of chronic lung infection. **Journal of Medical Microbiology**, v. 27, n. 4, p. 255-261, 1988.

COSTERTON, J. W., GEESEY GG, CHENG KJ. How bacteria stick. **Scientific American**, v. 238, n. 1, p. 86-&, 1978.

_____. Microbial biofilms. **Annual Review of Microbiology**, v. 49, p. 711-745, 1995.

_____. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, 1999.

D'AREZZO, S. CAPONE A, PETROSILLO N, VISCA P; GRAB, BALLARDINI M, BARTOLINI S, BORDI E, DI STEFANO A, GALIÈ M, MINNITI R, MELEDANDRI M, PACCIANI L, PARISI G, PRIGNANO G, SANTINI C, VALMARIN M, VENDITTI M, ZIANTONI S.. Epidemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* related to European clonal types I and II in Rome (Italy). **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, n. 4, p. 347-357, 2009.

D'ARGENIO, D. A. CALFEE MW, RAINEY PB, PESCI EC. Autolysis and autoaggregation in *Pseudomonas aeruginosa* colony morphology mutants. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 23, p. 6481-6489, 2002.

DAVIES, D. G. PARSEK MR, PEARSON JP, IGLEWSKI BH, COSTERTON JW, GREENBERG EP. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. **Science**, v. 280, n. 5361, p. 295-298, 1998.

DENT, L. L., MARSHALL DR, PRATAP S, HULETTE RB. Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*: a descriptive study in a city hospital. **Bmc Infectious Diseases**, v. 10, 2010.

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.

_____. Endemic acinetobacter in intensive-care units - epidemiology and clinical impact. **Journal of Clinical Pathology**, v. 46, n. 6, p. 533-536, 1993.

DONNARUMMA, F. SERGI S, INDORATO C, MASTROMEI G, MONNANNI R, NICOLETTI P, PECILE P, CECCONI D, MANNINO R, BENCINI S, FANCI R, BOSI A, CASALONE E. Molecular Characterization of Acinetobacter Isolates Collected in Intensive Care Units of Six Hospitals in Florence, Italy, during a 3-Year Surveillance Program: a Population Structure Analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 1297-1304, 2010.

DORSEY, C. W., TOMARAS, A.P., ACTIS, L.A. Genetic and phenotypic analysis of Acinetobacter baumannii insertion derivatives generated with a transposome system. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 12, p. 6353-6360, 2002.

EBERLE, B. M., SCHNÜRIGER B, PUTTY B, BARMPPARAS G, KOBAYASHI L, INABA K, BELZBERG H, DEMETRIADES D. The impact of Acinetobacter baumannii infections on outcome in trauma patients: A matched cohort study. **Critical Care Medicine**, v. 38, n. 11, p. 2133-2138, 2010.

ECHENIQUE, J. R. ARIENTI H, TOLMASKY ME, READ RR, STANELONI RJ, CROSA JH, ACTIS LA. characterization of a high-affinity iron transport-system in acinetobacter-baumannii. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 23, p. 7670-7679, 1992.

FALAGAS, M. E.; KARVELI, E. A. The changing global epidemiology of Acinetobacter baumannii infections: a development with major public health implications. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 13, n. 2, p. 117-119, 2007.

GADDY, J. A.; ACTIS, L. A. Regulation of Acinetobacter baumannii biofilm formation. **Future Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 273-278, 2009.

GADDY, J. A. TOMARAS AP, ACTIS LA. The Acinetobacter baumannii 19606 OmpA Protein Plays a Role in Biofilm Formation on Abiotic Surfaces and in the Interaction of This Pathogen with Eukaryotic Cells. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 8, p. 3150-3160, 2009.

GARCIA-GARMENDIA, J. L. ORTIZ-LEYBA C, GARNACHO-MONTERO J, JIMÉNEZ-JIMÉNEZ FJ, PÉREZ-PAREDES C, BARRERO-ALMODÓVAR AE, GILI-MINER M. Risk factors for *Acinetobacter baumannii* nosocomial bacteremia in critically ill patients: A cohort study. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, n. 7, p. 939-946, 2001.

GERKE, C. KRAFT A, SÜSSMUTH R, SCHWEITZER O, GÖTZ F. Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 29, p. 18586-18593, 1998.

GETCHELLWHITE, S. I.; DONOWITZ LG, GRÖSCHEL DH.. The inanimate environment of an intensive-care unit as a potential source of nosocomial bacteria - evidence for long survival of *Acinetobacter calcoaceticus*. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 10, n. 9, p. 402-407, 1989.

GLEW, R. H.; MOELLERING RC JR, KUNZ LJ. Infections with *Acinetobacter calcoaceticus* (*herellea-vaginicola*) - clinical and laboratory studies. **Medicine**, v. 56, n. 2, p. 79-97, 1977.

GONZALEZ, R. H., DIJKSHOORN L, VAN DEN BARSELAAR M, NUDEL C. Quorum sensing signal profile of *Acinetobacter* strains from nosocomial and environmental sources. **Revista Argentina De Microbiologia**, v. 41, n. 2, p. 73-78, 2009.

GOYMER, P. KAHN SG, MALONE JG, GEHRIG SM, SPIERS AJ, RAINEY PB. Adaptive divergence in experimental populations of *Pseudomonas fluorescens*. II. Role of the GGDEF regulator WspR in evolution and development of the wrinkly spreader phenotype. **Genetics**, v. 173, n. 2, p. 515-526, 2006.

GRIFFITH, M. E. CEREMUGA JM, ELLIS MW, GUYMON CH, HOSPENTHAL DR, MURRAY CK. *Acinetobacter* skin colonization of US army soldiers. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 27, n. 7, p. 659-661, 2006.

GUVENER, Z. T.; HARWOOD, C. S. Subcellular location characteristics of the *Pseudomonas aeruginosa* GGDEF protein, WspR, indicate that it produces cyclic-di-GMP in response to growth on surfaces. **Molecular Microbiology**, v. 66, n. 6, p. 1459-1473, 2007.

HENGGE, R. Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 263-273, 2009.

HO, P. L.; HO AY, CHOW KH, LAI EL, CHING P, SETO WH. Epidemiology and clonality of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* from a healthcare region in Hong Kong. **Journal of Hospital Infection**, v. 74, n. 4, p. 358-364, 2010.

HOFFMAN, L. R.; D'ARGENIO DA, MACCOSS MJ, ZHANG Z, JONES RA, MILLER SI. Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. **Nature**, v. 436, n. 7054, p. 1171-1175, 2005.

JAWAD, A. SEIFERT H, SNELLING AM, HERITAGE J, HAWKEY PM. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces: Comparison of outbreak and sporadic isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 7, p. 1938-1941, 1998.

JEFFERSON, K. K. What drives bacteria to produce a biofilm? **Fems Microbiology Letters**, v. 236, n. 2, p. 163-173, 2004.

JONES, R. N. Microbial Etiologies of Hospital-Acquired Bacterial Pneumonia and Ventilator-Associated Bacterial Pneumonia. **Clinical Infectious Diseases**, v. 51, p. S81-S87, 2010.

JOSEPH NM, SISTLA S, DUTTA TK, BADHE AS, RASITHA D, PARIJA SC. Role of intensive care unit environment and health-care workers in transmission of ventilator-associated pneumonia. **J Infect Dev Ctries**. Jun 3;4(5):282-91. 2010.

JUNG, J. Y.; PARK MS, KIM SE, PARK BH, SON JY, KIM EY, LIM JE, LEE SK, LEE SH, LEE KJ, KANG YA, KIM SK, CHANG J, KIM YS. Risk factors for multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* bacteremia in patients with colonization in the intensive care unit. **Bmc Infectious Diseases**, v. 10, 2010.

JUNI, E. Genetics and physiology of acinetobacter. **Annual Review of Microbiology**, v. 32, p. 349-371, 1978.

KAPLAN, N.; ROSENBERG E, JANN B, JANN K. Structural studies of the capsular polysaccharide of acinetobacter-calcoaceticus BD4. **European Journal of Biochemistry**, v. 152, n. 2, p. 453-458, 1985.

KIM, B. N. PELEG AY, LODISE TP, LIPMAN J, LI J, NATION R, PATERSON DL. Management of meningitis due to antibiotic-resistant Acinetobacter species. **Lancet Infectious Diseases**, v. 9, n. 4, p. 245-255, 2009.

KING, L. B.; SWIATLO E, SWIATLO A, MCDANIEL LS. Serum resistance and biofilm formation in clinical isolates of Acinetobacter baumannii. **Fems Immunology and Medical Microbiology**, v. 55, n. 3, p. 414-421, 2009.

KOHLBERG, A.; BRÜMMER S, HIGGINS PG, SOHR D, PIENING BC, DE GRAHL C, HALLE E, RÜDEN H, SEIFERT H. Outbreak of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii carrying the carbapenemase OXA-23 in a German university medical centre. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, n. 11, p. 1499-1507, 2009.

KULAH, C.; MOOIJ MJ, COMERT F, AKTAS E, CELEBI G, OZLU N, RIJNSBURGER MC, SAVELKOUL PH. Characterisation of carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii outbreak strains producing OXA-58 in Turkey. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 36, n. 2, p. 114-118, 2010.

LEE, H. W.; KOH YM, KIM J, LEE JC, LEE YC, SEOL SY, CHO DT, KIM J. Capacity of multidrug-resistant clinical isolates of Acinetobacter baumannii to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, n. 1, p. 49-54, 2008.

LEE, J. C.; KOERTEN H, VAN DEN BROEK P, BEEKHUIZEN H, WOLTERBEEK R, VAN DEN BARSELAAR M, VAN DER REIJDEN T, VAN DER MEER J, VAN DE GEVEL J, DIJKSHOORN L. Adherence of Acinetobacter baumannii strains to human bronchial epithelial cells. **Research in Microbiology**, v. 157, n. 4, p. 360-366, 2006.

LEE, N. Y.; CHANG TC, WU CJ, CHANG CM, LEE HC, CHEN PL, LEE CC, KO NY, KO WC. Clinical manifestations, antimicrobial therapy, and prognostic factors of monomicrobial *Acinetobacter baumannii* complex bacteremia. **Journal of Infection**, v. 61, n. 3, p. 219-227, 2010.

LEONE, S.; STURIALE L, PESSIONE E, MAZZOLI R, GIUNTA C, LANZETTA R, GAROZZO D, MOLINARO A, PARRILLI M. Detailed characterization of the lipid A fraction from the nonpathogen *Acinetobacter radioresistens* strain S13. **Journal of Lipid Research**, v. 48, n. 5, p. 1045-1051, 2007.

LEUNG, A. S.; CHU CM, TSANG KY, LO FH, LO KF, HO PL. Fulminant community-acquired *Acinetobacter baumannii* pneumonia as a distinct clinical syndrome. **Chest**, v. 129, n. 1, p. 102-109, 2006.

LI, J.; NATION RL, OWEN RJ, WONG S, SPELMAN D, FRANKLIN C. Antibigrams of multidrug-resistant clinical *Acinetobacter baumannii*: Promising therapeutic options for treatment of infection with colistin-resistant strains. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, p. 594-598, 2007.

LITZOW, J. M.; GILL CJ, MANTARING JB, FOX MP, MACLEOD WB, MENDOZA M, MENDOZA S, SCOBIE R, HUSKINS CW, GOLDMAN DA, HAMER DH. High Frequency of Multidrug-Resistant Gram-Negative Rods in 2 Neonatal Intensive Care Units in the Philippines. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 30, n. 6, p. 543-549, 2009.

LIVERMORE, D. M.; HILL RL, THOMSON H, CHARLETT A, TURTON JF, PIKE R, PATEL BC, MANUEL R, GILLESPIE S, BALAKRISHNAN I, BARRETT SP, CUMBERLAND N, TWAGIRA M; C-MRAB STUDY GROUP. Antimicrobial treatment and clinical outcome for infections with carbapenem-and multiply-resistant *Acinetobacter baumannii* around London. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 35, n. 1, p. 19-24, 2010.

LOEHFELM, T. W.; LUKE NR, CAMPAGNARI AA. Identification and characterization of an *Acinetobacter baumannii* biofilm-associated protein. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 3, p. 1036-1044, 2008.

MADER, K. TERHES G, HAJDÚ E, URBÁN E, SÓKI J, MAGYAR T, MÁRIALIGETI K, KATONA M, NAGY E, TÚRI S. Outbreak of septicemic cases caused by *Acinetobacter ursingii* in a neonatal intensive care unit. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, n. 5, p. 338-340, 2010.

MAGRET, M. AMAYA-VILLAR R, GARNACHO J, LISBOA T, DÍAZ E, DEWAELE J, DEJA M, MANNO E, RELLO J. Ventilator-Associated Pneumonia in Trauma Patients Is Associated With Lower Mortality: Results From EU-VAP Study. **Journal of Trauma-Injury Infection and Critical Care**, v. 69, n. 4, p. 849-854, 2010.

MARKOGIANNAKIS, A. *et al.* Cross-transmission of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal strains causing episodes of sepsis in a trauma intensive care unit. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 29, n. 5, p. 410-417, 2008.

MERIGHI, M. LEE VT, HYODO M, HAYAKAWA Y, LORY S. The second messenger bis-(3'-5')-cyclic-GMP and its PilZ domain-containing receptor Alg44 are required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. **Molecular Microbiology**, v. 65, n. 4, p. 876-895, 2007.

MONIRI, R. *et al.* Molecular Epidemiology of Aminoglycosides Resistance in *Acinetobacter* Spp. with Emergence of Multidrug-Resistant Strains. **Iranian Journal of Public Health**, v. 39, n. 2, p. 63-68, 2010.

NIU, C. CLEMMER KM, BONOMO RA, RATHER PN. Isolation and characterization of an autoinducer synthase from *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 9, p. 3386-3392, 2008.

O'TOOLE, G. A.; KOLTER, R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **Molecular Microbiology**, v. 30, n. 2, p. 295-304, 1998.

OBANA, Y. Pathogenic significance of *acinetobacter-calcoaceticus* - analysis of experimental-infection in mice. **Microbiology and Immunology**, v. 30, n. 7, p. 645-657, 1986.

PARK, Y. K. *et al.* A Single Clone of *Acinetobacter baumannii*, ST22, Is Responsible for High Antimicrobial Resistance Rates of *Acinetobacter Spp.* Isolates That Cause Bacteremia and Urinary Tract Infections in Korea. **Microbial Drug Resistance**, v. 16, n. 2, p. 143-149, 2010.

PEREZ, F.; ENDIMIANI A, RAY AJ, DECKER BK, WALLACE CJ, HUJER KM, ECKER DJ, ADAMS MD, TOLTZIS P, DUL MJ, WINDAU A, BAJAKSOUZIAN S, JACOBS MR, SALATA RA, BONOMO RA. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* across a hospital system: impact of post-acute care facilities on dissemination. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 8, p. 1807-1818, 2010.

_____. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, p. 3471-3484, 2007.

PRATT, J. T. TAMAYO R, TISCHLER AD, CAMILLI A. PilZ domain proteins bind cyclic diguanylate and regulate diverse processes in *Vibrio cholerae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 17, p. 12860-12870, 2007.

RAHBAR, M. MEHRGAN H, ALIAKBARI NH. Prevalence of antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii* in a 1000-bed tertiary care hospital in Tehran, Iran. **Indian Journal of Pathology and Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 290-293, 2010.

RANG, H.P.; DELE, M.M.; RITTER, J.M. *Farmacologia*. 4ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A, 2000. p. 583

RAJAMOHAN, G. SRINIVASAN VB, GEBREYES WA. Biocide-tolerant multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical strains are associated with higher biofilm formation. **Journal of Hospital Infection**, v. 73, n. 3, p. 287-289, 2009.

RAO, R.S. KARTHIKA RU, SINGH SP, SHASHIKALA P, KANUNGO R, JAYACHANDRAN S, PRASHANTH K. Correlation between biofilm production and multiple drug resistance in imipenem resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 26, n. 4, p. 333-337, 2008.

RESSNER, R. A.; MURRAY CK, GRIFFITH ME, RASNAKE MS, HOSPENTHAL DR, WOLF SE. Outcomes of bacteremia in burn patients involved in combat operations overseas. **Journal of the American College of Surgeons**, v. 206, n. 3, p. 439-444, 2008.

ROBERTS, S. A. FINDLAY R, LANG SD. Investigation of an outbreak of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* in an intensive care burns unit. **Journal of Hospital Infection**, v. 48, n. 3, p. 228-232, 2001.

RODRIGUEZ-BANO, J.; MARTÍ S, SOTO S, FERNÁNDEZ-CUENCA F, CISNEROS JM, PACHÓN J, PASCUAL A, MARTÍNEZ-MARTÍNEZ L, MCQUEARY C, ACTIS LA, VILA J. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*: associated features and clinical implications. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, n. 3, p. 276-278, 2008.

ROSENBERG, E. *et al.* Capsular polysaccharides interfere with adherence of *acinetobacter-calcoaceticus* to hydrocarbon. **Fems Microbiology Letters**, v. 17, n. 1-3, p. 157-160, 1983.

ROSENBERG, M. BAYER EA, DELAREA J, ROSENBERG E. Role of thin fimbriae in adherence and growth of *acinetobacter-calcoaceticus* rag-1 on hexadecane. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 929-937, 1982.

ROSENTHAL, S.; TAGER, I. B. Prevalence of gram-negative rods in normal pharyngeal flora. **Annals of Internal Medicine**, v. 83, n. 3, p. 355-357, 1975.

ROSENTHAL, V. D. *et al.* International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) report, data summary for 2003-2008, issued June 2009. **American Journal of Infection Control**, v. 38, n. 2, p. 95-U31, 2010.

RYJENKOV, D. A. SIMM R, RÖMLING U, GOMELSKY M. The PilZ domain is a receptor for the second messenger c-di-GMP - The PilZ domain protein YcgR controls motility in enterobacteria. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 41, p. 30310-30314, 2006.

SADER H.S. GALES AC, PFALLER MA, MENDES RE, ZOCCOLI C, BARTH A, JONES RN. Pathogen frequency and resistance patterns in brazilian hospitals: summary of results

from three years of the SENTRY antimicrobial surveillance program. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.5, n.4, 2001.

SADERA H.S. CASTANHEIRA M, MENDES RE, TOLEMAN M, WALSH TR, JONES RN. Dissemination and diversity of metallo- β -lactamases in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 25, p. 57–61, 2005.

SAUER, K. CAMPER AK, EHRLICH GD, COSTERTON JW, DAVIES DG. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 4, p. 1140-1154, 2002.

SCHRECKENBERGER, P.C.; DANESHVAR, M.I.; HOLLIS, D.G. *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Chryseobacterium*, *Moraxella*, and Other Nonfermentative Gram-Negative Rods. In: MURRAY, P.R; BARON, E.J.; JORGENSEN, J.H.; LANDRY M.L.; PFALLER M.A. (Ed). **Manual of Clinical Microbiology**. 9 Ed. Vol. 2. Washington, D.C.: ASM Press, 2007. P.770-774.

SEIFERT, H. STRATE A, PULVERER G. Nosocomial bacteremia due to *acinetobacter-baumannii* - clinical-features, epidemiology, and predictors of mortality. **Medicine**, v. 74, n. 6, p. 340-349, 1995.

SEWARD, R. J. LAMBERT T, TOWNER KJ. Molecular epidemiology of aminoglycoside resistance in *Acinetobacter* spp. **Journal of Medical Microbiology**, v. 47, n. 5, p. 455-462, 1998.

SHIN, J. H. LEE HW, KIM SM, KIM J. Proteomic Analysis of *Acinetobacter baumannii* in Biofilm and Planktonic Growth Mode. **Journal of Microbiology**, v. 47, n. 6, p. 728-735, 2009.

SMITH, A. W. FREEMAN S, MINETT WG, LAMBERT PA. Characterization of a siderophore from *acinetobacter-calcoaceticus*. **Fems Microbiology Letters**, v. 70, n. 1, p. 29-32, 1990.

SMITH, M. G. GIANOULIS TA, PUKATZKI S, MEKALANOS JJ, ORNSTON LN, GERSTEIN M, SNYDER M. New insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenesis revealed by high-density pyrosequencing and transposon mutagenesis. **Genes & Development**, v. 21, p. 601-614, 2007.

SOMERVIL.DA; NOBLE, W. C. A note on gram negative bacilli of human skin. **European Journal of Clinical and Biological Research**, v. 15, n. 6, p. 669-&, 1970.

SPIERS, A. J. BOHANNON J, GEHRIG SM, RAINEY PB. Biofilm formation at the air-liquid interface by the *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkly spreader requires an acetylated form of cellulose. **Molecular Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 15-27, 2003.

STOODLEY, P. SAUER K, DAVIES DG, COSTERTON JW. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Review of Microbiology**, v. 56, p. 187-209, 2002.

TANKHIWALE, S. S. JALGAONKAR SV, AHAMAD S, HASSANI U. Evaluation of extended spectrum beta lactamase in urinary isolates. **Indian Journal of Medical Research**, v. 120, n. 6, p. 553-556, 2004.

TJERNBERG, I.; URSING, J. Clinical studies of *Acinetobacter* classified by DNA-DNA hybridization. **Apmis**, v. 115, n. 5, p. 646-656, 2007.

TOMARAS, A. P. DORSEY CW, EDELMANN RE, ACTIS LA. Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. **Microbiology-Sgm**, v. 149, p. 3473-3484, 2003.

_____. Characterization of a two-component regulatory system from *Acinetobacter baumannii* that controls biofilm formation and cellular morphology. **Microbiology-Sgm**, v. 154, p. 3398-3409, 2008.

TURTON, J. F. KAUFMANN ME, WARNER M, COELHO J, DIJKSHOORN L, VAN DER REIJDEN T, PITT TL. A prevalent, multiresistant clone of *Acinetobacter baumannii* in Southeast England. **Journal of Hospital Infection**, v. 58, n. 3, p. 170-179, 2004.

VALENCIA, R. ARROYO LA, CONDE M, ALDANA JM, TORRES MJ, FERNÁNDEZ-CUENCA F, GARNACHO-MONTERO J, CISNEROS JM, ORTÍZ C, PACHÓN J, AZNAR J. 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. 257-263, 2009.

VAN DEN BROEK, P. J. ARENDS J, BERNARDS AT, DE BRAUWER E, MASCINI EM, VAN DER REIJDEN TJ, SPANJAARD L, THEWESSEN EA, VAN DER ZEE A, VAN ZEIJL JH, DIJKSHOORN L. Epidemiology of multiple *Acinetobacter* outbreaks in The Netherlands during the period 1999-2001. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 12, n. 9, p. 837-843, 2006.

_____. Endemic and Epidemic *Acinetobacter* Species in a University Hospital: an 8-Year Survey. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 11, p. 3593-3599, 2009.

WADL, M. HECKENBACH K, NOLL I, ZIESING S, PFISTER W, BEER J, SCHUBERT S, ECKMANNS T. Increasing Occurrence of Multidrug-Resistance in *Acinetobacter baumannii* Isolates From Four German University Hospitals, 2002-2006. **Infection**, v. 38, n. 1, p. 47-51, 2010.

WHITELEY, M. BANGERA MG, BUMGARNER RE, PARSEK MR, TEITZEL GM, LORY S, GREENBERG EP. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Nature**, v. 413, n. 6858, p. 860-864, 2001.

WISPLINGHOFF, H. HIPPLER C, BARTUAL SG, HAEFS C, STEFANIK D, HIGGINS PG, SEIFERT H. Molecular epidemiology of clinical *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genomic species 13TU isolates using a multilocus sequencing typing scheme. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, n. 7, p. 708-715, 2008.

WROBLEWSKA, M. M. SAWICKA-GRZELAK A, MARCHEL H, LUCZAK M, SIVAN A. Biofilm production by clinical strains of *Acinetobacter baumannii* isolated from patients hospitalized in two tertiary care hospitals. **Fems Immunology and Medical Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 140-144, 2008.