

Paula Giarola Fragoso de Oliveira

**CARACTERIZAÇÃO DE *Pseudomonas* spp. ISOLADOS DE
PACIENTES, PROFISSIONAIS DA SAÚDE E AMBIENTE
HOSPITALAR**

Dissertação submetida ao Programa de
Programa de Pós-Graduação em
Farmácia da Universidade Federal de
Santa Catarina para a obtenção do
Grau de Mestre em Farmácia na área
de concentração de Análises Clínicas.
Orientadora: Prof^a. Dra. Thaís Cristine
Marques Sincero

Florianópolis, SC
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Oliveira, Paula Giarola Fragoso de
Caracterização de *Pseudomonas* spp. isolados de
pacientes, profissionais da saúde e ambiente
hospitalar / Paula Giarola Fragoso de Oliveira ;
orientadora, Thais Cristine Marques Sincero, 2018.
127 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis,
2018.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. *Pseudomonas aeruginosa*. 3.
Multidroga resistência. 4. Bombas de efluxo. 5.
Biofilme. I. Marques Sincero, Thais Cristine. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

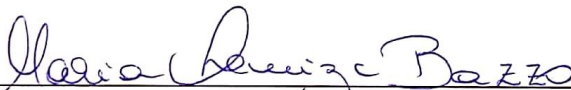
**“CARACTERIZAÇÃO DE Pseudomonas spp.
ISOLADOS DE PACIENTES, PROFISSIONAIS DA
SAÚDE E AMBIENTE HOSPITALAR”**

POR

Paula Giarola Fragoso de Oliveira

**Dissertação julgada e aprovada em
sua forma final pelo(a)
Orientador(a) e membros da
Banca Examinadora, composta
pelos Professores Doutores:**

Banca Examinadora:



Prof(a). Dr(a). Maria Luiza Bazzo (UFSC – Membro Titular)



Prof(a). Dr(a). Fabiana Botelho de Miranda Onofre (– Membro Titular)



Prof(a). Dr(a). Thais Cristine Marques Sincero (UFSC – Orientador(a))



**Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da
UFSC**

Florianópolis, 29 de março de 2018.

Dedico este trabalho:

Aos meus pais José Fragoso de Oliveira e Marli Aparecida Giarola Fragoso de Oliveira por terem me dado toda a estrutura moral e educacional que fazem de mim quem eu sou hoje;

A Orlando Martins e Natasha Giarola Fragoso de Oliveira, meus maiores incentivadores e parceiros, que em todos os momentos acreditaram em mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela determinação e perseverança em concretizar meus objetivos.

À minha família por ser a minha base, pelo apoio incondicional às minhas decisões, em especial a minha mãe, Marli Aparecida Giarola Fragoso de Oliveira, meu pai José Fragoso de Oliveira e aos meus irmãos Natasha Giarola Fragoso de Oliveira e João Pedro Fragoso de Oliveira.

Ao Orlando Martins, por todo o carinho, apoio, incentivo, compreensão e companheirismo durante todo esse percurso.

À Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, ao Curso de Pós-graduação em Farmácia – PGFAR, à Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior – CAPES pela estrutura e possibilidade para a realização deste estudo.

Aos professores do mestrado, em especial à minha orientadora Thaís Cristine Marques Sincero pela dedicação, paciência, sabedoria e especialmente pela humildade, o que a torna ainda mais admirável.

Às professoras doutoras, Maria Luiza Bazzo e Fabiana Botelho de Miranda Onofre pela disponibilidade em participar como membros da banca examinadora deste trabalho e pelas preciosas contribuições.

À professora doutora Fabienne Antunes Ferreira, pelos ensinamentos quanto à técnica de formação de biofilme.

Ainda mais uma vez às professoras doutoras Thaís Cristine Marques Sincero e Fabiana Botelho de Miranda Onofre, Chefes do Departamento de Análises Clínicas durante o período de decorrência deste trabalho.

Às professoras Doutoras Ana Carolina Rabello de Moraes e Helena Cristina Ferreira Franz, Supervisoras dos Laboratórios em que atuo como técnica de laboratório, pela compreensão, colaboração e flexibilização dos meus horários de trabalho.

À todas as monitoras da disciplina de Microbiologia Clínica pelo apoio e trabalho desenvolvido nos meus períodos de ausência.

Às meninas do laboratório MIMA, pela parceria, companheirismo e alto astral que fazem o nosso grupo de pesquisa ser único.

Às queridas amigas Daniela Tartari e Caetana Zamparette pela paciência, ensinamentos, parceria, auxílio e amizade construída ao longo destes dois anos.

À querida e nova amiga Camila Biazus Dalcin, pela companhia, parceria, positividade, bondade e fé que me auxiliaram no transcorrer dos meses de janeiro e fevereiro de 2018.

À amiga Giuliana Oliveira Ruas Costa, parceira de trabalho e de pesquisa por todo o apoio e auxílio.

À Manoela Müller de Oliveira, por todo o auxílio e dedicação.

À todos os meus amigos, presentes em meu coração, que sempre estão na torcida para que o melhor ocorra, e que mesmo sem saber, contribuem para a renovação de energia e forças, dando alento nas horas difíceis.

À equipe do Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia – LBMMS, pela parceria, auxílio e coleguismo.

À equipe do laboratório LAMEB pelo auxílio, atenção e gentileza.

À equipe da Neoprospecta, por possibilitar a realização deste projeto.

E finalmente a todos que contribuíram direta ou indiretamente com este trabalho.

A todos, minha profunda gratidão!

*“Só se pode alcançar um grande êxito
quando nos mantemos fiéis a nós
mesmos.”*

(Friedrich Nietzsche)

RESUMO

Pseudomonas spp. são bacilos Gram negativos não fermentadores ubiqüitários que possuem capacidade de produção de substâncias extracelulares, fatores de virulência, biofilmes, além de mecanismos de resistência intrínsecos e adquiridos a antimicrobianos. O principal representante deste gênero é *Pseudomonas aeruginosa*, um patógeno oportunista que apresenta resistência a diversos antimicrobianos, capaz de causar graves infecções nosocomiais agudas e crônicas. A taxa de mortalidade e morbidade associada a *P. aeruginosa* é elevada, o que a torna um grave problema para o sistema de saúde mundial. Entre os mecanismos de resistência em *P. aeruginosa*, destacam-se as bombas de efluxo MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN e MexXY-OprM. Produzidas intrinsecamente, estas estruturas podem ser superexpressas devido a mutações genéticas, que acarretam aumento da resistência a antimicrobianos. Outro fator importante para a sobrevivência e permanência deste gênero é a formação de biofilmes, estruturas polissacarídicas ou proteicas que conferem à bactéria proteção e aderência em superfícies inertes ou vivas. Neste estudo foi analisado o perfil de resistência de 52 isolados de *Pseudomonas* spp. em um Hospital Universitário (HU-UFSC, Florianópolis/SC, Brasil), coletados entre março e outubro de 2015, de profissionais da saúde, pacientes e superfícies com alto contato de cinco alas do hospital: emergência (EMG), Unidade de terapia intensiva (UTI), Centro cirúrgico (CC), Clínica cirúrgica (CR1) e Clínica médica I (CMI). A identificação e o TSA (Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos) foram determinados pelo sistema eletrônico de identificação microbiana (Vitek2®; bioMérieux). Para os isolados de *P. aeruginosa* com perfil de resistência, o TSA foi confirmado pelo método de disco difusão. 61,5% dos resultados do TSA obtido pelo Vitek2® foi condizente com o método de disco difusão. Para estes isolados, determinou-se a concentração inibitória mínima (CIM) pelo método de microdiluição em caldo na ausência e na presença do inibidor de efluxo PAbetaN para todos os isolados resistentes a cefepime, ciprofloxacino, gentamicina, imipenem e polimixina B. Ocorreu redução significativa da resistência em todos os isolados quando expostos ao inibidor de bomba de efluxo. De acordo com o tipo de resistência apresentada, pôde-se deduzir quais bombas de efluxo poderiam estar envolvidas no processo de resistência, visto que alguns antimicrobianos são específicos. O teste de formação de biofilme foi realizado com todas as amostras e mostrou que cerca de 38,5% dos

isolados de *Pseudomonas* spp. eram de moderada a fortemente formadoras de biofilmes e dentre estas, 70% provinham de pacientes. Verificou-se que na maioria dos casos, a resistência estava associada à capacidade de formação de biofilme, já que algumas amostras que exibiam um perfil de forte resistência também foram fortemente formadoras de biofilme. Esse fato pode ser explicado pela ação das bombas de efluxo MexAB-OprM e MexCD-OprJ no sistema sinalizador que leva à formação de biofilme. Entretanto, amostras resistentes a imipenem (substrato da bomba MexEF-OprN, que prejudica a formação de biofilme) não foram formadoras de biofilme. Estes resultados evidenciam que o mecanismo de resistência, composto por sistemas de efluxo, está correlacionado e interfere na formação de biofilme.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*. Multidroga resistência. Bombas de efluxo. Biofilme.

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF *Pseudomonas* spp. ISOLATED OF PATIENTS, PROFESSIONALS OF HEALTH AND HOSPITAL ENVIRONMENT

Pseudomonas spp. are ubiquitous non-fermenting Gram negative bacilli that have capacity to produce extracellular substances, virulence factors, biofilms, as well as intrinsic resistance mechanisms and acquired antimicrobial. The main representative of this genus is *Pseudomonas aeruginosa*, an opportunistic pathogen that is resistant to several antimicrobials, capable of causing severe acute and chronic nosocomial infections. The mortality rate and morbidity associated with *P. aeruginosa* is high, which makes it a serious problem for the world health system. Among the mechanisms of resistance in *P. aeruginosa*, we can highlight the efflux pumps MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN and MexXY-OprM. Produced intrinsically, these structures can be overexpressed due to genetic mutations, which results in increased antimicrobial resistance. Another important factor for the survival and permanence of the genus is the formation of biofilms, polysaccharide or protein structures that protect the bacteria and provide adhesion on inert or living surfaces. In this study, was analyzed the resistance profile of 52 isolated *P. aeruginosa* at a University Hospital (HU-UFSC, Florianópolis / SC, Brazil), collected between March and October 2015, from health professionals, patients and high contact surfaces of (EMI), Intensive Care Unit (ICU), Surgical Center (CC), Surgical Clinic (CR1) and Medical Clinic I (CMI). Identification and TSA (Antimicrobial Susceptibility Test) were determined by the electronic microbial identification system (Vitek2®; bioMérieux). Regarding the isolated of *P. aeruginosa* with resistance profile, the TSA was confirmed by the disc diffusion method. 61.5% of the TSA results obtained by Vitek2® were consistent with the diffusion disc method. For these isolated, the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by the broth microdilution method in the absence and presence of PA β N effluent inhibitor for all isolated resistant to cefepime, ciprofloxacin, gentamicin, imipenem and polymyxin B. There was a significant reduction of resistance in all isolated when exposed to the efflux inhibitor. According to the type of resistance presented, it was possible to deduce which efflux pumps could be involved in the resistance process, since some antimicrobials are specific. The biofilm formation test was performed

with all samples and showed that about 38.5% of the isolates of *Pseudomonas* spp. were moderate to strongly biofilm-forming, and 70% of these were from patients were from moderate to strongly biofilm forming. Among that samples, 70% came from patients. It was found that in most cases, resistance was associated with the biofilm formation capacity, since some samples that exhibiting a strong resistance profile were also strongly biofilm forming. This fact can be explained by the action of efflux pumps MexAB-OprM and MexCD-OprJ in the signaling system that leads to biofilm formation. However, samples resistant to imipenem (substrate of the MexEF-OprN pump, which impairs biofilm formation) were not biofilm forming. These results show that the mechanism of resistance formed by efflux systems are correlated and interfere in biofilm formation.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*. Multidrug resistant. Efflux Pump. Biofilm.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Distribuição geográfica das taxas de prevalência de <i>P. aeruginosa</i> resistentes aos carbapenêmicos | 29 |
| Figura 2 - Classificação dos beta-lactâmicos utilizados em infecções causadas por <i>P. aeruginosa</i> | 30 |
| Figura 3 - Mecanismos intrínsecos, adquiridos e adaptativos conferem resistência a antimicrobianos em <i>P. aeruginosa</i> | 31 |
| Figura 4 - Estrutura cristalográfica de bombas de efluxo da família RND expressas em <i>P. aeruginosa</i> | 34 |
| Figura 5 - Mecanismo de regulação de MexAB-OprM..... | 36 |
| Figura 6 - Mecanismo de regulação dos sistemas de efluxo MexCD-OprJ, MexEF-OprN e MexXY-OprM..... | 38 |
| Figura 7 - Inibidor de efluxo PAbetaN..... | 39 |
| Figura 8 - Representação da proteína de membrana externa em bactérias Gram negativas..... | 40 |
| Figura 9 - Etapas do processo de formação do biofilme | 49 |
| Figura 10 - Mecanismo de ação do sistema Quorum Sensing (QS) em <i>P. aeruginosa</i> | 52 |
| Figura 11 - Processo regulatório da formação de biofilme em <i>P. aeruginosa</i> | 58 |
| Figura 12 - Esquema representativo da influência das bombas de efluxo na formação de biofilme..... | 59 |
| Figura 13 - Características das amostras de <i>Pseudomonas</i> spp. incluídas no estudo | 64 |
| Figura 14 - Fluxograma de estudo..... | 69 |
| Figura 15 - Realização do TSA pelo método de disco difusão | 74 |

| | |
|---|-----|
| Figura 16 - Gráfico da CIM de todas as amostras com e sem inibidor por antimicrobiano (continua) | 87 |
| Figura 17 - Gráfico da CIM de todas as amostras com e sem inibidor por antimicrobiano | 89 |
| Figura 18 - Distribuição dos isolados por grupos quanto à formação de biofilme | 92 |
| Figura 19- Resultado representativo para os ensaios de formação de biofilmes realizados para <i>P. aeruginosa</i> , <i>P. fluorescens</i> e <i>S. aureus</i> .. | 102 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|---|-----|
| Quadro 1 - Relação das bombas de efluxo descritas em <i>P. aeruginosa</i> e de seus antimicrobianos substratos..... | 35 |
| Quadro 2 - Recomendação de Antimicrobianos para realização de TSA em <i>Pseudomonas</i> spp. | 45 |
| Quadro 3 - Caracterização dos isolados selecionados de <i>Pseudomonas</i> spp. | 66 |
| Quadro 4 - Pontos de corte padronizados pelo BrCast e CLSI para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 71 |
| Quadro 5 - Concentrações dos antimicrobianos utilizadas na diluição seriada em µg/mL..... | 75 |
| Quadro 6 - Teste de Susceptibilidade aos Antimicrobianos (TSA) determinado por disco difusão | 80 |
| Quadro 7 - Resultados das CIMs e das CBMs nos isolados de <i>P. aeruginosa</i> | 83 |
| Quadro 8- Comparação entre CIM, disco difusão e ViteK2 para os antimicrobianos cefepime, ciprofloxacino, gentamicina e imipenem ... | 85 |
| Quadro 9 - Resultados da análise da formação de biofilme, espécie, perfil de resistência e local de coleta dos isolados..... | 90 |
| Quadro 10 - Iniciadores selecionados para a realização da análise de expressão gênica..... | 101 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3OC12-HSL - N-3-oxododecanoil- L-homoserina lactona
ABC-ATP - Superfamília de Cassetes de ligação de ATP
AHL - Acil-homoserina lactona
AMB - L-2-amino-4-metoxi-trans-3- ácido butenóico
AMI - amicacina
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHI - Infusão de cérebro e coração
CAZ - ceftazidima
CBM - concentração bactericida mínima
CC - Centro cirúrgico
CCCP - carbonil cianida m-clorofenilhidrazona
c-di-GMP - bis-(3'-5')-cíclico-dimérico-guanosina monofosfato
MIC - Concentração Inibitória Mínima
CIP - ciprofloxacino
CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute* (Instituto de Normas Laboratoriais e Clínicas)
COM - cefepime
CIM - concentração inibitória mínima
CMI - Clínica Médica I
CRI - Clínica cirurgia I
CTX-M - beta-lactamase do tipo CTX-M
DO - densidade ótica
EDTA - Ácido Etilenodiamino tetra-acético
EMG - Emergência
EPS - Substâncias Poliméricas Extracelulares
ESBL - beta-lactamases de espectro estendido
ExoS - exoenzima S
ExoT - exoenzima T
ExoU - exoenzima U
GEN - gentamicina
GES - beta-lactamase do tipo GES
GIM - *Germany imipenemase*
HAIMP - *Healthcare Associated Infections Microbiome Project* (Projeto Microbioma de Infecções Associadas à Assistência à Saúde)
HU/UFSC - Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago
IMP - imipenemase
IPM - imipenem
IRAS - Infecções relacionadas à assistência à saúde

KPC - *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase
MATE - Família de extrusão de compostos tóxicos e multidrogas
MBL - Metallo-beta-lactamases
MDR - Multidroga resistência
MER - meropenem
MFS - Superfamília de facilitadores principais
NARST - Vigilância Nacional da Resistência Antimicrobiana - Tailândia
NDM - Metallo-beta-lactamase de Nova Deli
OXA - Oxacilinases
P. - *Pseudomonas*
PAbetaN - Fenilalanina-arginina beta-naftilamida
PCP - Pentaclorofenol
PCR - Reação em cadeia da polimerase
PDR - pandroga resistente
PPT - piperacilina/tazobactam
QS - Quorum Sensing
REP-PCR - PCR do Elemento Repetitivo Palindrômico
RND - *Resistance-nodulation-cell division*
SHV - *Sulphydryl Variable*
SMR - Família de baixa resistência a multidrogas
SPM - São Paulo metallo-beta-lactamase
T2SS - Sistema de secreção tipo II
T3SS - Sistema de secreção tipo III
T4P - pili tipo IV
TEM - beta-lactamase do tipo Temoniera
TSA - Teste de Susceptibilidade aos Antimicrobianos
UTI - Unidade de terapia intensiva
VIM - *Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase*
XDR - Extensivamente Resistente a Medicamentos

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA | 23 |
| 2 REVISÃO DA LITERATURA | 27 |
| 2.1 EPIDEMIOLOGIA | 27 |
| 2.2 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA | 29 |
| 2.2.1 Sistemas de efluxo..... | 32 |
| 2.2.2 Proteínas de membrana externa | 40 |
| 2.2.3 Enzimas beta-lactamases | 41 |
| 2.2.3.1 AmpC | 41 |
| 2.2.3.2 Beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) | 41 |
| 2.2.3.3 Carbapenemases | 43 |
| 2.3 TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS (TSA) | 44 |
| 2.4 CLASSIFICAÇÃO DE ISOLADOS RESISTENTES | 46 |
| 2.5 FATORES DE VIRULÊNCIA RELACIONADOS À RESISTÊNCIA BACTERIANA..... | 47 |
| 2.6 FORMAÇÃO DE BIOFILME | 48 |
| 2.6.1 Formação de biofilme por isolados não mucoides | 54 |
| 2.6.2 Formação de Biofilme por isolados mucoides..... | 56 |
| 3 OBJETIVOS | 61 |
| 3.1 OBJETIVO GERAL | 61 |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 61 |
| 4 METODOLOGIA | 63 |
| 4.1 ASPECTOS ÉTICOS | 63 |
| 4.2 OBTENÇÃO E SELEÇÃO DAS AMOSTRAS | 63 |
| 4.3 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS (TSA) POR DISCO DIFUSÃO..... | 69 |
| 4.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)..... | 74 |

| | |
|--|------------|
| 4.5 TESTES FENOTÍPICOS COM INIBIDOR DE EFLUXO FENILALANINA-ARGININA BETA-NAFTILAMIDA (PAbetaN) | 76 |
| 4.6 ANÁLISE DA FORMAÇÃO DE BIOFILME | 77 |
| 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA | 78 |
| 5 RESULTADOS | 79 |
| 5.1 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS (TSA) | 79 |
| 5.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA | 82 |
| 5.3 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE BOMBAS DE EFLUXO | 87 |
| 5.4 ANÁLISE DA FORMAÇÃO DE BIOFILME | 89 |
| 6 DISCUSSÃO | 95 |
| 6.1 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS (TSA) | 95 |
| 6.2 DETERMINAÇÃO DA CIM NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DO INIBIDOR DE EFLUXO PAbetaN | 98 |
| 6.3 CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME DOS ISOLADOS | 101 |
| 7 CONCLUSÕES | 107 |
| 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 109 |
| 9 PERSPECTIVAS | 111 |
| REFERÊNCIAS | 113 |
| APÊNDICE A – Iniciadores utilizados na reação de PCR para o gene <i>mcr-1</i> | 133 |
| APÊNDICE B – Documento de aprovação do projeto pelo comitê de ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Catarina | 135 |

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O gênero *Pseudomonas*, composto por bacilos Gram negativos não fermentadores, foi descrito em 1894 e possui mais de 200 espécies catalogadas. Devido ao seu rápido crescimento e capacidade adaptativa (oxidativa, nutricional e estresse externo), este gênero é um dos mais diversos e ubiqüitários, compondo parte da microbiota comunitária. A capacidade deste gênero de utilizar diversos compostos orgânicos como fontes de carbono, bem como a sobrevivência na ausência de nutrientes tem sido atribuída a sua versatilidade genética, que promove uma atividade metabólica diferenciada e permite a este gênero adaptar-se e colonizar uma ampla variedade de nichos ecológicos (IGBINOSA et al., 2012). Estas bactérias podem ser encontradas em ambientes naturais como solo e água e ainda, artificiais ligados aos ambientes hospitalares, tais como: bancadas, pisos, instalações e equipamentos médicos, ventiladores mecânicos, cateteres, lentes de contato, entre outros (LYCZAK; CANNON; PIER, 2000; GELLATLY; HANCOCK, 2013; SAMONIS et al., 2014; LUCZKIEWICZ et al., 2015).

Algumas características, frequentemente associadas às espécies de *Pseudomonas* podem ser utilizadas em laboratórios clínicos para auxiliar na identificação deste gênero, tais como, oxidase positivas, negativas para formação de gás a partir de glicose, citrato positivas, negativas para produção de indol e beta-hemolíticas em ágar sangue. Também secretam pioverdina ou compostos similares que atuam como sideróforos em condições de crescimento em que o ferro é um fator limitante (GARRITY, 1984; MURRAY et al, 2007). Podem crescer em meios relativamente simples às custas de compostos orgânicos e podem ainda crescer em baixas temperaturas. A melhor temperatura para o crescimento deste gênero é 28°C. Em algumas espécies, a temperatura máxima de crescimento é de 45°C, sendo estas consideradas termófilas. Tais características adaptáveis a uma variedade de condições físicas contribuem para sua presença em ambientes diversos (PALLERONI, 2005; MURRAY et al, 2007).

Pseudomonas spp. produzem substâncias extracelulares que promovem maior adaptação, capacidade de sobrevivência em condições de anóxia e fatores de virulência, além de mecanismos intrínsecos e adquiridos que favorecem a resistência a agentes antimicrobianos. Estas características fazem com que o gênero possa apresentar patogenicidade, podendo infectar nematódeos, leveduras, insetos (JAWETZ, MELNICK, ADALBERG'S., 2016; LAVOIE et al., 2011), plantas (*P. syringae*, *P.*

savastanoi e *P. pseudoalcaligenes*), animais e humanos (*P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. stutzeri* e *P. anguilliseptica*) (LUCZKIEWICZ et al., 2015). Sabe-se que outras espécies de *Pseudomonas* podem causar infecções em humanos, contudo, informações sobre resistência a antimicrobianos em outras espécies do gênero *Pseudomonas* são escassas, principalmente para os isolados ambientais.

Algumas espécies deste gênero possuem marcante capacidade de resistirem a desinfetantes, característica responsável, em parte, por seu papel nas infecções hospitalares. Uma importante característica deste gênero é a capacidade de formação de biofilmes, que fornece a estas bactérias a habilidade de crescer em ambientes inóspitos como resíduos de sabão, alguns tipos de pomadas, torneiras, água utilizada para diálise, cateteres, entre outros locais que favorecem sua persistência em ambientes hospitalares (VAZ-MOREIRA; NUNES; MANAIA, 2012; MADIGAN, 2015).

A espécie *P. aeruginosa* é a principal representante deste gênero; é um patógeno oportunista e um dos principais agentes causadores de infecções nosocomiais agudas e crônicas de difícil tratamento. Segundo Lister, Wolter e Hanson (2009) essa espécie pode apresentar mecanismos de resistência intrínsecos (redução de porinas de membrana externa, aumento cromossomal de produção de beta-lactamases e aumento da atividade de bombas de efluxo) e adquiridos (transferência de genes de resistência por plasmídeos e mutações cromossomais).

A espécie *P. aeruginosa* é frequentemente isolada em pacientes imunocomprometidos expostos a procedimentos invasivos, terapia com imunossupressores, pacientes transplantados e outros cuidados intensivos. Dentre as principais doenças causadas por este patógeno estão sepse, pneumonia, infecções do trato urinário e de tecidos moles. Esse patógeno possui particular importância por ser a principal causa de mortalidade e morbidade em pacientes com fibrose cística (HONG et al., 2015; MORADALI; GHODS; REHM, 2017).

O genoma *Pseudomonas* é constituído por um cromossomo circular, considerado um dos maiores entre bactérias com cerca de 6,3 Mb (STOVER et al., 2000). O genoma dos isolados de *P. aeruginosa* apresenta cerca de 90% de conservação, sendo que essa característica favorece a conservação dos genes de virulência, o que sugere que a patogenicidade desta bactéria esteja relacionada a um conjunto de mecanismos genéticos altamente conservados (WOLFGANG et al., 2003).

Devido à importância desses agentes patogênicos para o sistema de saúde, faz-se necessário uma melhor avaliação dos mecanismos de resistência e de virulência dos isolados que circulam no ambiente hospitalar. Neste estudo foi realizada a avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos de isolados de *Pseudomonas* spp. obtidos de pacientes, profissionais da saúde e superfícies de alto contato do ambiente hospitalar, bem como a padronização e a avaliação de testes fenotípicos para detecção de bombas de efluxo em *P. aeruginosa* e a avaliação da capacidade de formação de biofilmes em todas as espécies encontradas. Sendo assim, um maior conhecimento a respeito destas bactérias favorecerá a rápida implementação de medidas de controle de disseminação, bem como de um tratamento empírico mais assertivo, gerando a redução de custos, tempo de internação e aumento da sobrevivência dos pacientes.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Nesta seção serão revisados aspectos relevantes para melhor compreensão da multirresistência aos antimicrobianos em *P. aeruginosa*.

2.1 EPIDEMIOLOGIA

P. aeruginosa tem sido a causa de surtos nosocomiais em todo o mundo, inclusive no Brasil, onde a multidroga resistência (MDR)¹ é comum nesta espécie (ROSSI, 2011). Em 2013, nos Estados Unidos da América, cerca de 51.000 infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) foram atribuídas a *P. aeruginosa*, sendo que destas, 6.000 (13%) foram causadas por isolados MDR multirresistentes, acarretando 440 mortes (CDC, 2013). Estudos apontam que cerca de 10% a 15% das IRAS são causadas por *P. aeruginosa* (GRISHIN et al., 2015). Um estudo realizado em um hospital universitário público no Paraná entre 2007 e 2009 detectou um total de 75 isolados de *P. aeruginosa*, sendo a maior frequência em pacientes do sexo masculino (62,7%), principalmente em pacientes acima de 60 anos (54,7%), e em UTIs (41,4%). Entre os 75 isolados, 54,6% eram multirresistentes (SIQUEIRA et al., 2013).

Em outro estudo realizado por Figueiredo e colaboradores (2007), com amostras provenientes do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco, foi demonstrado uma elevada prevalência de isolados MDR. Dentre estes, 49,7% de *P. aeruginosa* resistentes a três antimicrobianos ou mais e 28%, resistentes a seis ou mais antimicrobianos. Recente estudo em um hospital de Juíz de Fora (Minas Gerais), mostrou que a taxa de mortalidade associada à infecção ou colonização por este patógeno foi de 47,3% (DIAS et al., 2017).

Em ambiente hospitalar, *P. aeruginosa* é uma importante causa de infecções adquiridas na unidade de terapia intensiva (UTI). Uma pesquisa realizada entre 303 pacientes internados em UTIs de 28 de hospitais do estado de Minas Gerais revela que 14,3% das infecções relacionadas ao ambiente hospitalar são causadas por *P. aeruginosa*, especialmente em unidades de terapia intensiva (ALVES BRAGA et al.,

¹ “Multidroga resistência (*Multidrug-resistant* - MDR): não suscetível a no mínimo um antimicrobiano em três ou mais classes”. MAGIORAKOS, A. P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R. B., et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect, v.18, n.3, p.268-81, 2012.

2018). Estes patógenos têm se tornado mais resistentes em um curto período de tempo, devido aos diversos mecanismos de resistência que podem possuir ou adquirir.

Os resultados de um estudo de vigilância realizado na China ratificam a gravidade deste quadro: 7,5% de *P. aeruginosa* no estudo foram resistentes a todos os antimicrobianos testados e, portanto, sem tratamento antibacteriano disponível. Na Europa, foi identificada uma diferença significativa na resistência aos carbapenêmicos entre os países, variando de 3% na Holanda e superiores a 50% na Romênia e Grécia em 2011 (THEURETZBACHER, 2013).

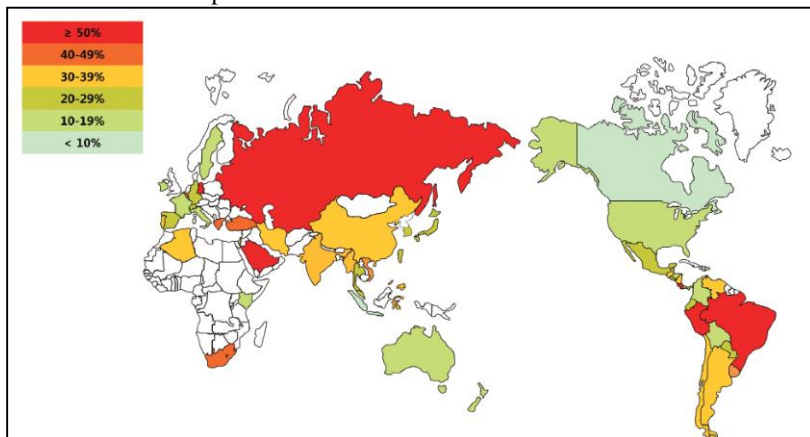
Os carbapenêmicos são amplamente utilizados na terapia empírica ou direcionada em infecções onde há a suspeita de que o agente etiológico seja *P. aeruginosa*, visto que essa bactéria é intrinsecamente resistente a diversos antimicrobianos. Contudo, dados recentes da Vigilância Nacional da Resistência Antimicrobiana (NARST) na Tailândia, revelaram aumento da incidência de *P. aeruginosa* resistente a carbapenêmicos de aproximadamente 15% do total de infecções entre 2000 e 2005, para 30% entre 2009 e 2013 neste país. Diante disso, a ocorrência de infecções por *P. aeruginosa* XDR (*Extensively drug-resistant*)² tornou-se uma preocupação para o sistema de saúde mundial (PALAVUTITOTAI et al., 2018).

As taxas de resistência aos carbapenêmicos no Canadá (3,3%) e na República Dominicana (imipenem e meropenem, ambos 8%), ambos com índices inferiores a 10%, sendo, portanto, considerados os melhores resultados entre todos os países (HONG et al., 2015). Contudo, em muitos países ocorreu um aumento significativo na incidência de *P. aeruginosa* resistente a carbapenêmicos variando de 10% para 50% (HONG et al., 2015). Índices no Brasil, Peru, Costa Rica, Rússia, Grécia, Polônia, Irã e Arábia Saudita foram superiores a 50% em todos os medicamentos da classe de carbapenêmicos (imipenem, meropenem, doripenem, ertapenem), representados na Figura 1. As taxas de resistência na Rússia, Sudoeste da Ásia e América do Sul são altas o suficiente para que *P.*

² “Resistência estendida (*Extensively drug-resistant* - XDR): não suscetível a pelo menos um antimicrobiano em todas as classes, exceto duas ou menos classes”. MAGIORAKOS, A. P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R. B., et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*, v.18, n.3, p.268-81, 2012.

aeruginosa resistentes aos carbapenêmicos sejam consideradas um grave problema de saúde pública (HONG et al., 2015).

Figura 1 - Distribuição geográfica das taxas de prevalência de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos



Legenda: A maioria dos isolados foi coletada de 2009 a 2011 com as seguintes exceções: Chile (2005), Quênia (2006 a 2007) e África do Sul (2006). As áreas coloridas brancas indicam que não houve dados publicados disponíveis para essa região.

Fonte: HONG et al., 2015.

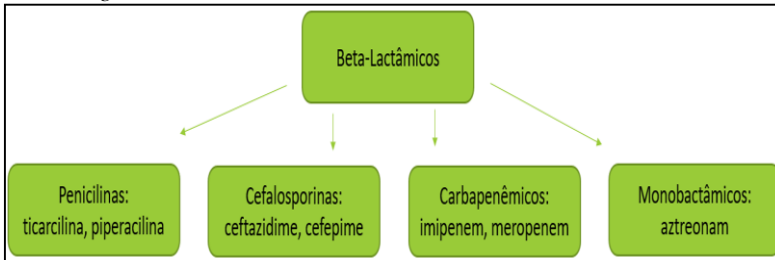
2.2 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA

A partir da segunda metade do século XX ocorreu a inserção massiva de agentes antimicrobianos no tratamento de doenças infecciosas, o que reduziu significativamente complicações e mortes no âmbito mundial (KATTAN; VILLEGAS; QUINN, 2008). Contudo, a detecção das beta-lactamases, tanto em bactérias Gram-positivas quanto em Gram-negativas, é relatada desde o início dos anos 1940, antes do uso generalizado da penicilina no mundo todo (Abraam & Chain, 1940; Kirby, 1944). Os antimicrobianos beta-lactâmicos em geral são bem tolerados e consistem nos antimicrobianos mais prescritos atualmente (BUSH; BRADFORD, 2016).

Antimicrobianos beta-lactâmicos, incluindo penicilinas (ticarcilina, piperacilina), cefalosporinas (ceftazidima e cefepime), carbapenêmicos (imipenem, meropenem) e monobactâmicos (aztreonam)

são comumente utilizados nos tratamentos e infecções causadas por *P. aeruginosa*, como ilustrado na Figura 2 (POOLE, 2011).

Figura 2 - Classificação dos beta-lactâmicos utilizados em infecções causadas por *P. aeruginosa*



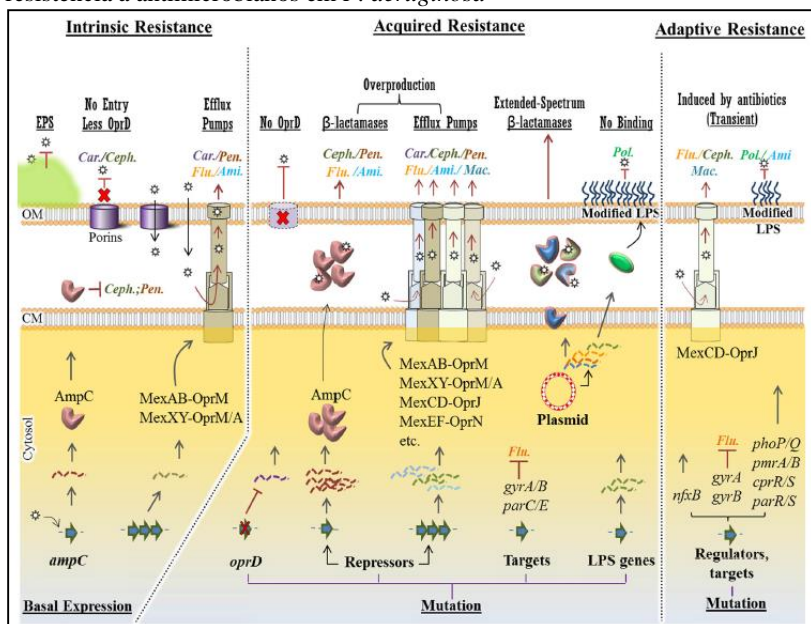
Fonte: Adaptado de Poole, 2011.

O uso disseminado e abusivo de beta-lactâmicos, em especial dos carbapenêmicos, tem contribuído para a seleção de micro-organismos resistentes aos antimicrobianos e a consequente redução das opções terapêuticas na prática clínica (*Center for Disease Control and Prevention - CDC, 2013*). Desde a década de 1960, a resistência bacteriana tem se tornado progressivamente mais complexa, o que pode ser demonstrado pela descoberta dos plasmídeos carreadores de genes de resistência e sua capacidade de transmissão por conjugação. Houve um agravamento desse quadro a partir dos anos 1980, quando detectou-se as primeiras enterobactérias produtoras de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) e sua disseminação pelo mundo. Na década de 2000, observou-se a disseminação de carbapenemases do tipo KPC e NDM (*WHO Workshop on the Containment of Antimicrobial Resistance in Europe – WHO, 2004*).

Os mecanismos de resistência descritos em *P. aeruginosa* podem ser intrínsecos e adquiridos. De maneira intrínseca estas bactérias apresentam resistência à ampicilina, amoxicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, cefalosporinas de primeira e segunda geração, cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidime, tetraciclina, cloranfenicol, ácido nalidíxico (OPLUSTIL; ZOCCOLI; TOBOUTI, 2010) e tigeciclina (LOPES, 2006). Tais mecanismos que explicam essa ampla resistência intrínseca incluem a baixa regulação na expressão de porinas de membrana externa (OprD), o aumento cromossomal da produção de beta-lactamases (desrepressão do gene *ampC* e alterações na AmpC, que expande o espectro) e o aumento da atividade das bombas de efluxo da família RND (*resistance-*

nodulation-cell division) conforme mostra a Figura 3 (LISTER; WOLTER; HANSON, 2009).

Figura 3 - Mecanismos intrínsecos, adquiridos e adaptativos conferem resistência a antimicrobianos em *P. aeruginosa*



Legenda: Para cada mecanismo, várias estratégias moleculares, que conferem resistência a uma classe específica de antimicrobianos antipseudomonais (Car., Carbapenêmicos, Ceph., Cephalosporinas, Pen., Penicilinas, Ami., Aminoglicosídeos, Flu., Fluoroquinolonas; Mac., Macrolídeos e Pol., Polimixinas) mostrados abaixo dos mecanismos de resistência relacionados. No topo da figura, abaixo dos mecanismos intrínsecos (sublinhado), estão EPS (substâncias extracelulares poliméricas), redução de OprD e produção basal betalactamases AmpC e bombas de efluxo MexAB / XY. Na resistência adquirida, são mostradas mudanças mutacionais no gene *oprD*, repressores transicionais causando a regulação de genes de resistência e Bombas de efluxo que conferem resistência a um maior espectro de antimicrobianos; resistência mediada por plasmídeos, mudanças mutacionais no genoma ou nos plasmídeos, a resistência às polimixinas que ocorre através da modificação do LPS (lipopolissacarídeos) impedindo a ligação do antimicrobiano a esta camada. A resistência adaptativa ocorre devido a presença de antimicrobianos principalmente via mutação em genes reguladores. Esta é uma resistência transitória e reversível, que irá se reverter após a remoção dos antimicrobianos. As estrelas representam antimicrobianos e linhas tracejadas / onduladas

representam os níveis de transcrição de cada produto de gene. CM, membrana citoplasmática e OM, membrana externa.

Fonte: MORADALI; GHODS; REHM, 2017.

De maneira endógena, *P. aeruginosa* carream genes cromossomais para cefalosporinas de classe C, AmpC, e oxacilinase de classe D. Essas bactérias podem ainda adquirir outros determinantes de resistência por transferência horizontal de elementos genéticos móveis (plasmídeos e transposons inseridos em integrons) que codificam especialmente beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) e as carbapenemases (POOLE, 2011; VIEDMA et al., 2012). Estudos mostram que *P. aeruginosa* pode desenvolver diversos desses mecanismos de resistência concomitantemente, potencializando sua característica de multidroga resistência (MDR) (POOLE, 2011; CHOUDHURY et al., 2015; KIM et al., 2016; PAN et al., 2016).

A seguir são descritos em mais detalhes os principais mecanismos de resistência encontrados em *Pseudomonas* spp.

2.2.1 Sistemas de efluxo

Os sistemas de efluxo são estruturas codificadas de maneira cromossomal e amplamente expressos em bactérias Gram negativas (POOLE, 2004). Estes sistemas podem ser específicos para um substrato ou para uma série de compostos estruturalmente diferentes (WEBBER; PIDDOCK, 2003). As bombas de efluxo podem ser categorizadas em cinco famílias distintas, sendo elas: ABC (*ATP binding cassette*), MFS (*major facilitator superfamily*), SMR (*small muldrug resistance*), RND (*resistance-nodulation-division*), exclusiva em Gram negativos (SUN; DENG; YAN, 2014) e MATE (*multidrug and toxic compound extrusion*) (WEBBER; PIDDOCK, 2003; DELMAR; SU; YU, 2014).

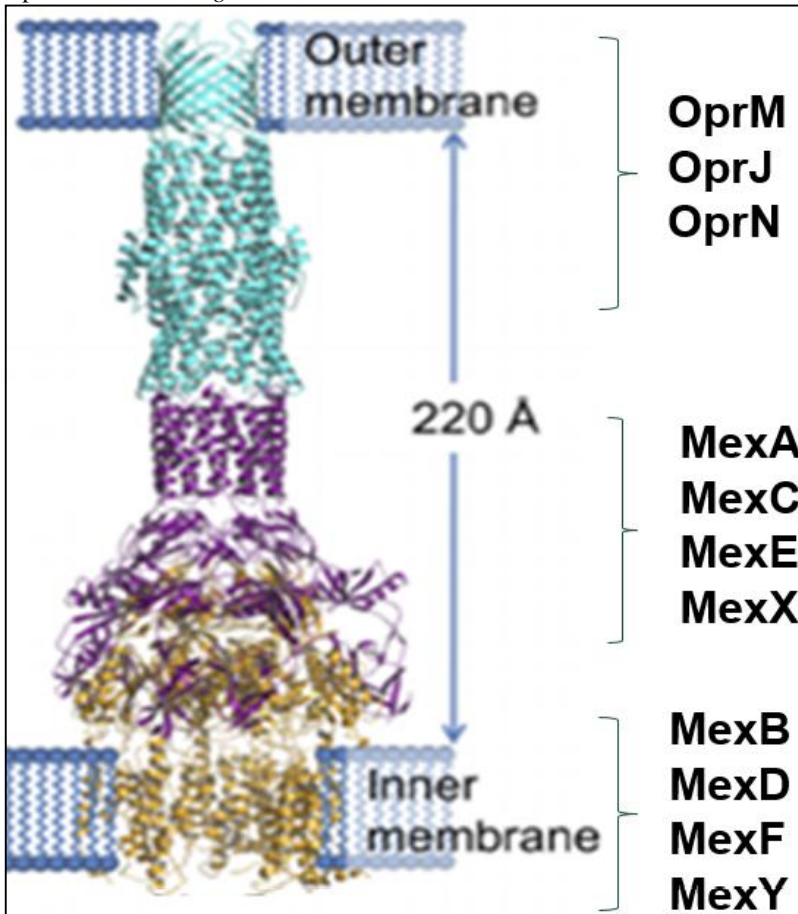
Os sistemas mencionados são dependentes de energia. Dessa forma, utilizam o transporte ativo primário ou o transporte ativo secundário para a extrusão de substâncias da célula. O transporte ativo primário, utilizado pela família ABC, é dependente da hidrólise de ATP (PIDDOCK, 2006a). Já as famílias RND, MATE, MFS e SMR utilizam o transporte ativo secundário, em que o gasto de energia é oriundo da força próton motora (MOREIRA, 2008), um gradiente eletroquímico no qual o movimento de íons conduz o transporte (PIDDOCK, 2006b). Sistemas de efluxo da superfamília RND podem acarretar complicações no tratamento de quimioterapia em pacientes com câncer e no tratamento de infecções em geral (PIDDOCK, 2006b).

Os principais sistemas de efluxo RND expressos em *P. aeruginosa* são MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN e MexXY-OprM (CHOUDHURY et al., 2015; PAN et al., 2016). Estas bombas de efluxo são formadas por três componentes: o primeiro está localizado na membrana citoplasmática (MexB, MexD, MexF e MexY) que age como uma bomba dependente de energia e substrato específico; o segundo componente é a proteína de membrana externa, o canal de extrusão (OprM, OprJ e OprN); a terceira proteína está localizada no espaço periplasmático e conecta a proteína externa à interna (MexA, MexC, MexE e MexX), conforme ilustrado na Figura 4 (SADEGHIFARD et al., 2012; HORIYAMA; NISHINO, 2014; PAN et al., 2016).

Cada um dos transportadores apresentados é essencial para o efluxo de substâncias da célula, pois a ausência de um único componente acarreta na inativação total do complexo tripartite (NIKAIDO; TAKATSUKA, 2009). Estudos sugerem que MexB reconhece e captura substratos específicos da bicamada lipídica da membrana interna ou do espaço citoplasmático, então os transporta para o meio extracelular através de OprM que forma um canal na membrana externa. A cooperação entre MexB e OprM é coordenada por MexA (DING et al., 2014).

A partir do sequenciamento do genoma completo de *P. aeruginosa* identificou-se doze sistemas de efluxo da família RND denominados mex, do inglês multidrug efflux pump, dos quais dez já estão caracterizados: MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXY-OprM, MexJK-OprM, MexGHI-OpmD, MexVW-OprM, MexPQ-OpmE, MexMN, e TriABC (AESCHLIMANN, 2003; XAVIER, 2008; AVRAIN et al, 2013). Esses sistemas são denominados como MDR (Multidrug Resistance), devido à sua capacidade de conferir resistência a uma ampla variedade de quimioterápicos (KRIENGKAUYKIAT et al., 2005; PIDDOCK, 2006a).

Figura 4 - Estrutura cristalográfica de bombas de efluxo da família RND expressas em *P. aeruginosa*



Legenda: Figura cristalográfica do sistema de efluxo da família RND mostrando de maneira esquemática os componentes das bombas de efluxo MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN e MexXY-OprM.

Fonte: Adaptado de XU, Y.; LEE, M.; MOELLER, A., et al., 2011.

Os sistemas de efluxo intrínsecos a *P. aeruginosa* MexAB-OprM e MexXY, MexCD-OprJ e MexEF-OprN em geral não são expressos em isolados selvagens, podendo, no entanto, ser superexpressos após a aquisição de mutações regulatórias (POONSUK; CHUANHUEN, 2014). Essas bombas possuem a capacidade de extrusão de antimicrobianos, sendo alguns deles descritos no Quadro 1 a seguir.

Quadro 1 - Relação das bombas de efluxo descritas em *P. aeruginosa* e de seus antimicrobianos substratos

| MexAB-OprM | MexCD-OprJ | MexEF-OprN | MexXY-OprM |
|-----------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| Aztreonam | CEFEPIME | Cloranfenicol | Amicacina |
| Carbenicilina | Cefuroxina | Ciprofloxacino | Cefepime |
| Cefotaxima | Cloranfenicol | Clavulanato | Cefotaxima |
| Ceftazidima | Ciprofloxacino | IMIPENEM | Ciprofloxacino |
| Cefuroxina | Eritromicina | Levofloxacino | Eritromicina |
| Cloranfenicol | Levofloxacino | Norfloxacino | Levofloxacino |
| CIPROFLOXACINO | Nafcilina | Sulbactam | Tetraciclina |
| Clavulanato | Norfloxacino | Trimetoprim | Tobramicina |
| Faropenen | Tetraciclina | | GENTAMICINA |
| Levofloxacino | Travofloxacino | | |
| Meropenem | | | |
| Nafcilina | | | |
| Norfloxacino | | | |
| Piperacilina | | | |
| Sulbactam | | | |
| Tetraciclina | | | |
| Trimetoprim | | | |

Legenda: Os antimicrobianos em destaque foram utilizados para a determinação da concentração inibitória mínima (MIC) neste estudo.

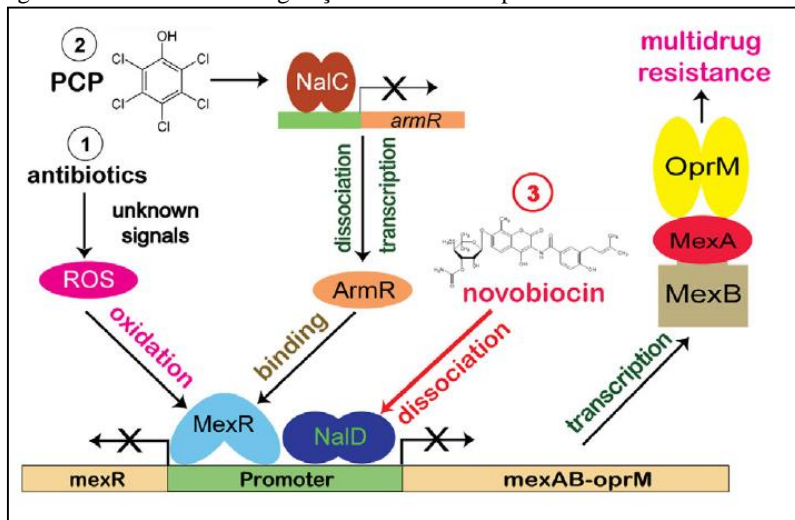
Fonte: Adaptado de NEVES, 2010.

MexAB-OprM é a principal bomba da família RND, comumente expressa em *P. aeruginosa* e promove resistência às fluoroquinolonas, macrolídeos, trimetoprim, sulfonamidas, cloranfenicol, tetraciclina, novobiocina, inibidores de beta-lactamases, à maioria dos beta-lactâmicos, incluindo meropenem, mas não ao imipenem. Tal estrutura possui ainda a capacidade de extrusão de uma série de detergentes, corantes, solventes orgânicos, ácidos graxos, inibidores de síntese e homoserina lactona (TERZI; KULAH; CIFTCI, 2014; CHOUDHURY et al., 2015; CHEN et al., 2016).

MexAB-OprM em *P. aeruginosa* possui três reguladores transcricionais tais como: MexR, NalC e NalD (CHEN et al., 2016; PAN et al., 2016). MexR é o principal regulador negativo, este se liga à região intergênica mexR-mexA, reprimindo diretamente a expressão da bomba.

O processo de oxidação pode modificar a conformação de MexR e leva a sua dissociação da região promotora do DNA. NalC pode se ligar a uma molécula de pentaclorofenol (PCP), o que resulta na desrepressão da transcrição do gene *armR* e superexpressão de ArmR (peptídio de 53 aminoácidos), promovendo assim, uma interação alostérica MexR-ArmR que impede a ligação de MexR com sua região de ligação no DNA, aumentando a expressão de MexAB-OprM. A proteína NalD, pertencente à família TetR, é um regulador transcricional do operon *mexAB-oprM*. NalD se liga no promotor secundário *mexA*-proximal, atuando como repressor secundário da bomba MexAB-oprM, contudo o mecanismo de ativação deste processo não está esclarecido. Chen e colaboradores demonstram que novobiocina pode se ligar a NalD promovendo a sua dissociação da região promotora do operon *mexAB-oprM*. Este mecanismo de regulação de NalD é similar ao de outras proteínas da família TetR que se ligam a antimicrobianos, causando desrepressão gênica (CHEN et al., 2016) (Figura 5).

Figura 5 - Mecanismo de regulação de MexAB-OprM



Legenda: Três caminhos conhecidos são apresentados para mediar a expressão transcricional de MexAB-OprM. MexR é o principal repressor da bomba MexAB-OprM. O sinal de oxidação poderia causar mudança de conformação de MexR, e leva à sua dissociação da região do promotor de DNA (via 1). NalC vinculativo para pentaclorofenol (PCP) resulta na de-repressão de ArmR. A superexpressão de ArmR de-reprime a bomba MexAB-OprM via uma interação alostérica de MexR-ArmR que evita a ligação de MexR para seu operador de

DNA cognato (via 2). NalD é o repressor secundário da bomba MexAB-OprM. Aqui, relata-se que a novobiocina se liga diretamente ao NalD, o que leva NalD a dissociar-se do promotor do DNA (via 3).

Fonte: CHEN et al., 2016.

A superexpressão de MexAB-OprM pode ser ainda resultante de mutações nos genes repressores *nalB*, *nalC*, *nalD* e *mexR* (CHOUDHURY et al., 2015; PAN et al., 2016; PUZARI; CHETIA, 2017). Em alguns estudos verificou-se que mutações em *nalB*, levaram ao aumento da expressão de *mexB* e consequente aumento de resistência a meropenem (TERZI; KULAH; CIFTCI, 2014).

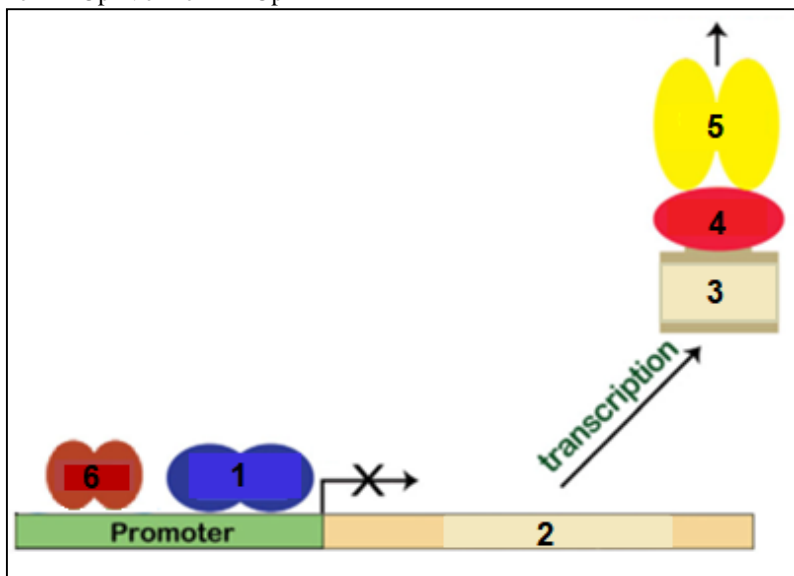
Os sistemas de efluxo MexCD-OprJ e MexEF-OprN são regulados pelos genes repressores *nfxB* e *nfxC*, respectivamente; e em geral são superexpressos quando há mutações nestes genes (PUZARI; CHETIA, 2017). MexCD-OprJ possui grande similaridade com MexAB-OprM e promove a extrusão de vários agentes antimicrobianos como fluoroquinolonas, alguns beta-lactâmicos, cloranfenicol, tetraciclina, macrolídeos, novobiocina e trimetoprim (TERZI; KULAH; CIFTCI, 2014). Este sistema de efluxo é geralmente induzível por danos à membrana, causado por biocidas a exemplo da clorexidina, e ainda corantes, detergentes, solventes orgânicos e peptídios antimicrobianos que geram stress no envelope da bactéria, favorecendo o recrutamento de MexCD-OprJ. Assim, *P. aeruginosa* com resistência à clorexidina podem superexpressar este sistema de efluxo e possuem mutação em *nfxB*. Modificações na região C-terminal de *nfxB* geram mudança conformacional que impede a interação com seu sítio de ligação no DNA, acarretando uma desrepressão de *mexCD-oprJ*, conforme demonstrado na Figura 6 (PURSELL; POOLE, 2013).

MexEF-OprN possui a capacidade de extrusão para imipenem, fluoroquinolonas, cloranfenicol e trimetoprim. Esta bomba é regulada negativamente pelo gene *nfxC* e positivamente por *mexT*. Bactérias que possuem o gene *mexT*, bem como as que apresentam mutações em *nfxC* possuem superexpressão de *mexEF-oprN* e redução da produção de porinas OprD, e em geral apresentam resistência aos carbapenêmicos, como imipenem, representada na Figura 6 (MASEDA; UWATE; NAKAE, 2010).

MexXY-OprM age sobre fluoroquinolonas, beta-lactâmicos específicos (cefepime e cefpiroma, mas não ceftazidima), aminoglicosídeos, tetraciclina, cloranfenicol e eritromicina (TERZI; KULAH; CIFTCI, 2014; GOLI et al., 2016). MexXY-OprM é o único sistema de efluxo em *P. aeruginosa* que promove resistência a aminoglicosídeos e pode ser

induzível por outras classes de antimicrobianos. Os componentes MexXY são codificados por um operon e controlados pelo gene repressor *mexZ*. OprM é codificado pelo terceiro gene de outro operon de efluxo multifármaco (OprM atua como componente de membrana externa de vários sistemas de efluxo em *P. aeruginosa*). Mutações em *mexZ* são comuns em isolados resistentes a aminoglicosídeos, ilustrada pela Figura 6 (HAY et al., 2013)

Figura 6 - Mecanismo de regulação dos sistemas de efluxo MexCD-OprJ, MexEF-OprN e MexXY-OprM



Legenda: Na representação esquemática do sistema de regulação das bombas de efluxo, as estruturas numeradas representam em relação à bomba de efluxo MexCD-OprJ: 1: gene regulador *nfxB*, 2: genes *mexC*, *mexD* e *oprJ*, 3: proteína MexD, 4: proteína MexC e 5: proteína OprJ; em relação à bomba de efluxo MexEF-OprN: 1: gene regulador *nfxC*, 2: genes *mexE*, *mexF* e *oprN*, 3: proteína MexF, 4: proteína MexE, 5: proteína OprN e 6: gene *mexT*; e em relação à bomba de efluxo MexXY-OprM: 1: gene regulador *mexZ*, 2: genes *mexx*, *mexY* e *oprM*, 3: proteína MexY, 4: proteína MexX e 5: proteína OprM.

Fonte: Adaptado de CHEN et al., 2016.

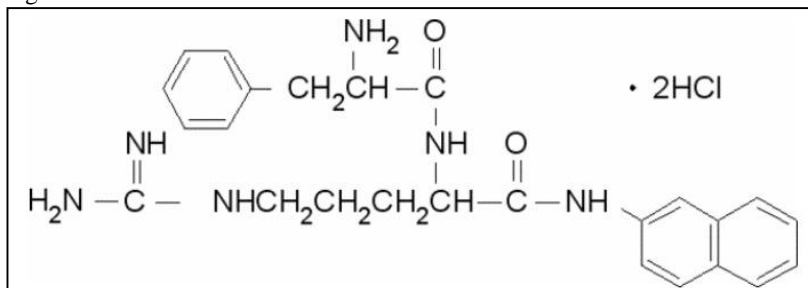
A caracterização dos sistemas de efluxo e a identificação da sua importância na resistência bacteriana aos antimicrobianos de uso clínico promoveu o interesse em compostos que atuam como inibidores destes sistemas. Os inibidores de efluxo possibilitam avaliar fenotipicamente a

expressão das bombas de efluxo por meio de compostos que agem inibindo as suas funcionalidades (ASKOURA et al., 2011). Inibidores de bombas de efluxo têm sido estudados com o objetivo de reduzir a resistência mediada por estes agentes (SONNET; IZARD; MULLIE, 2012; LAMERS; CAVALLARI; BURROWS, 2013).

Os inibidores utilizam mecanismos diferentes para atuar sobre a funcionalidade dos sistemas, podendo promover inibição da ligação do fármaco com a própria bomba de efluxo ou a inibição da interação entre componentes que formam o sistema de efluxo. Os inibidores podem ainda ter a capacidade de restringir a fonte de energia ou inibir a expressão gênica dos sistemas de efluxo (SUN; DENG; YAN, 2014).

A Fenilalanina-arginina beta-naftilamida (PAbetaN ou MC-207,110), ilustrada na Figura 7, foi caracterizada em 2001 como o primeiro inibidor de amplo espectro que atua sobre MexAB-OprM, MexCD-OprJ e MexEF-OprN. Assim, é capaz de significativas reduções de resistência a fluoroquinolonas em *P. aeruginosa* (SONNET; IZARD; MULLIE, 2012; LAMERS; CAVALLARI; BURROWS, 2013).

Figura 7 - Inibidor de efluxo PAbetaN



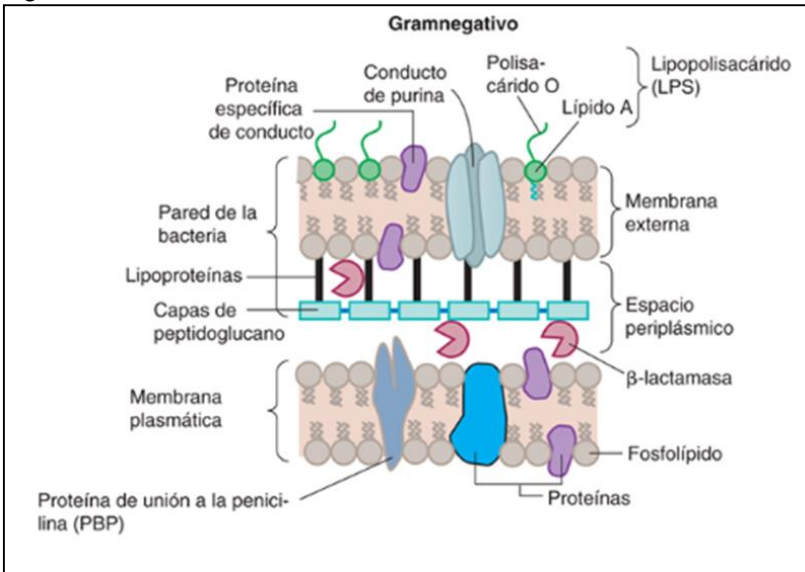
Fonte: SONNET; IZARD; MULLIE, 2012; LAMERS; CAVALLARI; BURROWS, 2013.

Esta molécula age através da inibição competitiva, em que a bomba de efluxo reconhece a PAbetaN como substrato ao invés do antimicrobiano alvo. Dessa forma, o inibidor compete com o antimicrobiano pelo sítio de ligação da bomba sendo expulso para fora das células e, conseqüentemente, ocorre o aumento da disponibilidade do antimicrobiano (ASKOURA et al., 2011).

2.2.2 Proteínas de membrana externa

As proteínas de membrana externa (OprC, OprD e OprE) são as principais em *P. aeruginosa* e promovem a entrada de pequenas moléculas hidrofílicas dentro da bactéria (Figura 8). A proteína OprD2 é específica para a entrada de imipenem, pois possui um lócus específico para ligação deste antimicrobiano. A redução na expressão e a inativação de OprD2 diminuem a permeabilidade e consistem na principal causa de resistência aos carbapenêmicos, especialmente quando associada à superexpressão de bombas de efluxo e de AmpC. A redução na expressão de OprD2 pode ocorrer devido a mutações, inserções e deleções no gene *oprD* (CAI et al., 2016).

Figura 8 - Representação da proteína de membrana externa em bactérias Gram negativas



Fonte: CAI et al., 2016; KIM et al., 2016

2.2.3 Enzimas beta-lactamases

As enzimas beta-lactamases têm se mostrado eficientes mecanismos de resistência, pois clivam por hidrólise o anel beta-lactâmico desta classe de antimicrobianos, tornando-os ineficazes. Quatro classes dessas enzimas são descritas (A – D) e incluem: metal dependente (Classe B: requerem Zn^{+2}) e metal independente (Classes A, C e D: com serina no sítio ativo). Todas essas classes são descritas em *P. aeruginosa* (KATVORAVUTTHICHAJ; BOONBUMRUNG; TIYAWISUTSRI, 2016).

2.2.3.1 AmpC

A desrepressão do gene de AmpC pode ser induzida pelo uso de alguns beta-lactâmicos e consiste no principal mecanismo de resistência a esta classe de antimicrobianos, incluindo cefalosporinas de amplo espectro e penicilinas. Os carbapenêmicos, embora forte indutores de *ampC*, são eficazes contra *P. aeruginosa* AmpC positivo, devido a sua alta estabilidade e rápida atividade bactericida. Entretanto, a produção de AmpC corrobora para a resistência a carbapenêmicos quando associada a outros mecanismos de resistência, como redução na expressão proteínas OprD. A produção de variantes de AmpC tem causado resistência em cefalosporinas (ceftazidima) e em carbapenêmicos (incluindo imipenem) em enterobactérias e em *P. aeruginosa* (POOLE, 2011). A superprodução de AmpC tem sido reportada em isolados multidroga resistentes e com resistência estendida, principalmente associados a outros mecanismos de resistência como redução de porinas e superexpressão de bombas de efluxo (DANTAS et al., 2017).

2.2.3.2 Beta-lactamases de espectro estendido (ESBL)

As ESBL clássicas de classe A, TEM e SHV, possuem um espectro mais restrito, enquanto que CTX-M, PER, VEB, GES e BEL e as de classe D OXA, apresentam um espectro mais abrangente. As ESBL de classe A encontradas em isolados de *P. aeruginosa* conferem resistência a ceftazidima, a mais predominante é VEB e PER; entretanto, BEL-1, BEL-2, CTX-M, SHV, TEM e GES têm sido reportadas em estudos recentes (KATVORAVUTTHICHAJ; BOONBUMRUNG; TIYAWISUTSRI, 2016).

PER-1 foi a primeira ESBL encontrada em *P. aeruginosa* isolada em um paciente turco internado na região de Paris, em 1991 (NORDMANN et al., 1993). A presença de isolados de *P. aeruginosa* produtoras de PER-1 é generalizada na Turquia (KOLAYLI et al., 2005) e já foram descritos em países próximos como Bélgica, Itália, Espanha, Polônia, Hungria, Sérvia e Tunísia, bem como na Grécia e países asiáticos (CLAEYS et al., 2000; LUZZARO et al., 2001; TATO et al., 2006; EMPEL et al., 2007; LIBISCH et al., 2008; KTARI et al., 2011; MIRSALEHIAN et al., 2010; RANELLOU et al., 2012; YAMANO et al., 2006; QING et al., 2014). A beta-lactamase PER-2, que compartilha 86% identidade de aminoácidos com PER-1 e, portanto, representa outra linhagem desta enzima, foi identificada apenas a partir de um isolado identificado na Bolívia (DELBRUCK et al., 2012).

VEB-1 foi identificada a partir de *P. aeruginosa* isolados de pacientes internados na França, mas transferidos da Tailândia (GIRLICH et al., 2002). Posteriormente, outros isolados produtores de VEB foram reportados do Kuwait (POIREL et al., 2001), Índia (AUBERT et al., 2004), Irã (FARAJNIA et al., 2013), Bulgária (STRATEVA et al., 2007), Reino Unido e Dinamarca (HANSEN et al., 2014), destacando a disseminação mundial desses isolados produtores de VEB. Isolados que produzem VEB-2 ou VEB-3 foram identificados na Tailândia e na China (GIRLICH et al., 2002; JIANG et al., 2006). O gene *bla*GES-1 foi identificado a partir de isolados provenientes da França e América do Sul (DUBOIS et al., 2002; PASTERAN et al., 2005).

GES-8 e GES-13 foram isolados na Grécia (MAVROIDI et al., 2001) e GES-9, que possui capacidade de hidrólise do Aztreonam foi identificado em um único isolado na França (POIREL et al., 2005). Isolados com o gene SHV-2 foi identificado na França e Tunísia; SHV-12, na Tailândia e Japão e SHV-5 foi descrita na Grécia (NAAS et al., 1999; MANSOUR et al., 2009). As ESBLs do tipo TEM foram pouco relatadas em *P. aeruginosa*, nos poucos casos identificados. Há evidências de transferência horizontal proveniente de Enterobacteriaceae. CTXM-1 foi relatada na Holanda, em 2006 e CTXM-2 e CTXM-43 foram identificadas na América do Sul (POTRON; POIREL; NORDMANN, 2015).

ESBL de classe D, as oxacilinases (OXA), apresentam grande espectro, hidrolisando amino e carboxipenicilinas e cefalosporinas de amplo espectro, comumente conferindo resistência a cefotaxima, ceftazidima, cefepima e/ou aztreonam (KATVORAVUTTHICHAI; BOONBUMRUNG; TIYAWISUTSRI, 2016).

2.2.3.3 Carbapenemases

A resistência de *P. aeruginosa* aos carbapenêmicos ocorre principalmente por redução e perda de porinas (oprD) e pela presença de carbapenemases (POTRON; POIREL; NORDMANN, 2015). Estudos mostram que a superexpressão das bombas de efluxo MexEF-OprM e MexXY-OprM podem estar relacionadas à resistência aos carbapenêmicos (HAENNI et al., 2017).

Os carbapenêmicos compõem uma importante classe para o tratamento de infecções causadas por bacilos Gram negativos MDR, incluindo *P. aeruginosa* produtoras de ESBL e AmpC. Estes antimicrobianos possuem alta afinidade com proteínas ligadoras de penicilina, estabilidade contra as ESBLs e permeabilidade nas membranas externas bacterianas, o que os torna efetivos no tratamento de *P. aeruginosa* MDR. Entre os vários mecanismos de resistência antimicrobiana, a produção de carbapenemases é um dos mais importantes mecanismos pelos quais estas bactérias adquirem resistência aos carbapenêmicos. Carbapenemases são capazes de hidrolisar esses medicamentos, como as de classes A e D e as metalo-beta-lactamases (MBLs) de classe B (HONG et al., 2015). Entre as carbapenemases de classe A, GES e KPC são descritas em *P. aeruginosa*, os demais tipos são incomuns (POOLE, 2011).

As MBLs são as principais carbapenemas encontradas em *P. aeruginosa*. Fazem parte dessa classe as enzimas VIM-1, IMP-1, SPM-1, GIM-1, NDM-1, AIM-1 e SIM-1 (POOLE, 2011; POTRON; POIREL; NORDMANN, 2015). VIM e IMP são as mais comuns e predominam entre *P. aeruginosa*, sendo que IMP é mais frequente na Ásia e VIM, na Europa. VIM-2 é bem estabelecida em todos os continentes. GIM-1 e AIM-1 são descritos na Alemanha. A prevalência de *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos fenotípicamente por meio da produção de MBL em estudos brasileiros atinge taxas acima de 50% em diferentes regiões geográficas e a enzima SPM-1 é a mais prevalente entre os isolados resistentes no país, contudo VIM e IMP também têm sido reportadas (POTRON; POIREL; NORDMANN, 2015; DANTAS et al., 2017).

2.3 TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS (TSA)

A realização de um tratamento eficaz é de fundamental relevância quando se trata de incidência de infecções nosocomiais, pois reduz o período de internação, os custos com hospitalização e aumenta a probabilidade de cura e sobrevivência do paciente. A fim de promover a maior eficácia do tratamento é necessário a realização de um antibiograma que forneça o perfil de susceptibilidade da bactéria aos antimicrobianos.

No Brasil, historicamente a recomendação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária é de que os testes para detecção da susceptibilidade sejam realizados segundo as recomendações do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) (ANVISA, 2013), a não ser que haja disposição em contrário por meio de notas técnicas específicas. No Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago (HU/UFSC) em que o presente trabalho foi realizado, utiliza-se os critérios de avaliação do CLSI.

Adicionalmente, em uma iniciativa conjunta da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Brasileira de Microbiologia e Sociedade Brasileira de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial, em 2015 foi criado o Comitê Brasileiro para Testes de Susceptibilidade aos Antimicrobianos (BrCast) que tem como principal objetivo determinar e rever periodicamente pontos de corte para interpretação dos testes de sensibilidade aos antimicrobianos para uso clínico e com finalidade epidemiológica, e propor à ANVISA a sua implementação nos laboratórios clínicos em todo o Brasil (BRCAST, 2016). Como a proposta do BrCast passa pela tradução das recomendações europeias para TSA (EUCAST), a qual difere em vários aspectos das recomendações do CLSI, a implementação dos pontos de corte nacionais talvez não seja tão rápida quanto necessária, mas tanto as recomendações do CLSI quanto do BrCast são aceitas pela ANVISA. No caso específico de *Pseudomonas* spp., o CLSI difere do BrCast quanto ao conteúdo antimicrobianos nos discos de Piperacilina-tazobactam (BrCast: 30-6 µg; CLSI: 100-10 µg), Ceftazidima (BrCast: 10 µg; CLSI: 30 µg) e Ceftazidima-avibactam (BrCast: 10-4 µg; CLSI: 30-20 µg).

O CLSI e o FDA (*Food and Drug Administration*) recomendam que para *Pseudomonas* spp. seja realizado o TSA de rotina para os seguintes antimicrobianos representados no Quadro 2:

Quadro 2 - Recomendação de Antimicrobianos para realização de TSA em *Pseudomonas* spp.

| Grupo | Recomendação | Antimicrobianos <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Antimicrobianos Demais espécies de <i>Pseudomonas</i> |
|--------------|--|--|--|
| Grupo A | Obrigatória à realização do teste primário, deve-se reportar os resultados; | Ceftazidima, Gentamicina, Tobramicina e Piperacilina-Tazobactam; | Ceftazidima, Gentamicina e Tobramicina |
| Grupo B | Opcional realização do teste primário, deve-se reportar os resultados de maneira seletiva; | Amicacina, Aztreonam, Cefepime, Ceftolozana-Tazobactam, Ciprofloxacino, Levofloxacino, Doripenem, Imipenem e Meropenem | Amicacina, Aztreonam, Cefepime, Ciprofloxacino, Levofloxacino, Imipenem, Meropenem, Piperacilina-Tazobactam e Trimetoprim-Sulfametoxazol |
| Grupo C | Teste de realização suplementar, deve-se reportar os resultados de maneira seletiva; | Não se aplica | Cefotaxima, Ceftriaxona e Cloranfenicol |
| Grupo U | Testes suplementares apenas para infecções urinárias; | Não se aplica | Sulfisoxazol e Tetraciclina |

Fonte: Desenvolvido pela autora com base em CLSI, 2018.

2.4 CLASSIFICAÇÃO DE ISOLADOS RESISTENTES

A classificação da resistência aos antimicrobianos em isolados de *P. aeruginosa* exclui as resistências intrínsecas e considera os seguintes antimicrobianos: aminoglicosídeos (gentamicina, tobramicina, ampicilina e netilmicina); carbapenêmicos (imipenem, meropenem e doripenem), cefalosporinas (ceftazidima e cefepime); fluoroquinolonas (ciprofloxacino e levofloxacino), penicilinas com inibidores de beta-lactamase (ticarcilina/ácido clavulânico e piperacilina/tazobactam), monobactâmicos (aztreonam); fosfomicina e polimixinas (polimixina B e colistina) (MAGIORAKOS et al, 2012). Estudos recentes mostram que a colistina é o antimicrobiano mais efetivo para o tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa* XDR. Recomenda-se a associação de outros antimicrobianos à colistina objetivando a promoção de um efeito sinérgico e a consequente melhoria nos resultados do tratamento, com a redução da toxicidade causada por esse fármaco (PALAVUTITOTAI et al., 2018).

Margiorakos e colaboradores (2012), por meio do consenso de um grupo de *experts* dos centros europeu e americano de prevenção e controle de doenças, *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) e *Centers For Disease Control and Prevention* (CDC), propõem a seguinte classificação

- i) Multidroga resistência (*Multidrug-resistant* - MDR): não suscetível a no mínimo um antimicrobiano em três ou mais classes;
- ii) Resistência estendida (*Extensively drug-resistant* - XDR): não suscetível a pelo menos um antimicrobiano em todas as classes, exceto duas ou menos classes;
- iii) Pandroga resistência (*Pandrug resistant* - PDR): não suscetível a todos os antimicrobianos listados.

Alguns fatores podem acarretar em predisposição ao risco de infecções por *P. aeruginosa* XDR (PA-XDR) como o uso prévio de fluoroquinolonas e carbapenêmicos, provavelmente devido à atividade antipseudomonas desses agentes, que apresenta uma maior tendência para selecionar um mutante resistente do que outros antimicrobianos (PALAVUTITOTAI et al., 2018). Pacientes com câncer e malignidades hematológicas apresentam maior propensão a infecções por esses agentes (LIEW et al., 2013; SAMONIS et al., 2014). O uso de nutrição parenteral foi associado, também a infecções por *P. aeruginosa* MDR, XDR, e bacteremias causadas por *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos.

Colonizações anteriores dos pacientes por esse agente foram relacionadas a risco de infecção por PA-XDR (PALAVUTITOTAI et al., 2018).

2.5 FATORES DE VIRULÊNCIA RELACIONADOS À RESISTÊNCIA BACTERIANA

Além dos mecanismos de resistência, a patogenicidade em *P. aeruginosa* é também atribuída a diversos fatores de virulência que podem ser estruturais ou produzidos e secretados para o meio. Dentre os estruturais pode-se destacar as fímbrias ou *pili* que são apêndices superficiais e promovem aderência a receptores presentes nas células epiteliais do hospedeiro; o flagelo que promove motilidade; e a cápsula polissacarídica com ação anti-fagocítica, que favorece evasão à resposta imune do hospedeiro. Destacam-se ainda os lipopolissacarídeos que encontram-se presentes na membrana externa, sendo responsáveis por manifestações sistêmicas (BALASUBRAMANIAN et al., 2013).

Este patógeno possui sistemas de secreção de proteínas, sendo que o Sistema de Secreção Tipo II (T2SS) e o Sistema de Secreção Tipo III (T3SS) são responsáveis pela secreção da maior parte das toxinas descritas na literatura (SAWA et al., 2014). Nas células endoteliais, Golovkine e colaboradores relatam que o sistema T3SS induz a retração celular concomitantemente ao aumento da permeabilidade paracelular e ainda que a inativação T2SS retardou a retração celular induzida por T3SS. Os secretomas de *P. aeruginosa* induziram a formação de espaço entre as células apenas quando os isolados eram competentes em T2SS (GOLOVKINE et al., 2014). Dentre as toxinas secretadas pelo T2SS estão a exotoxina A, que atua inibindo a biossíntese de proteínas na célula eucariótica, o que leva a necrose (JAFFAR-BANDJEE et al., 1995; BRADBURY et al., 2010; NIKBIN et al., 2012).

O T3SS é um sistema secretor que consiste em várias proteínas que formam um complexo macromolecular que abrange a membrana interna bacteriana, o espaço periplasmático, a camada peptidoglicanosa, a membrana externa bacteriana, o espaço extracelular e a membrana da célula hospedeira. T3SS é responsável pela secreção de 4 enzimas efetoras: exoenzima S (ExoS), exoenzima T (ExoT), exoenzima U (ExoU) e exoenzima Y (ExoY) diretamente dentro da célula hospedeira. Este sistema é ativado quando o patógeno entra em contato com membranas de células eucarióticas e promove interferência no sinal de transdução, morte celular e alterações na resposta imune do hospedeiro (GALLE; CARPENTIER; BEYAERT, 2012; BOUILLOT; ATTREE;

HUBER, 2015). T3SS é um importante marcador de isolados associados a um desfecho clínico ruim em pacientes infectados por estes patógenos (EL-SOLH et al., 2012; RANGEL et al., 2015; BERUBE; RANGEL; HAUSER, 2016).

Os genes *exoT* e *exoY* que codificam as exoenzimas T e Y respectivamente, estão presentes em praticamente todos os isolados clínicos, enquanto os genes *exoS* e *exoU* estão distribuídos variavelmente, e são mutuamente exclusivos na maior parte dos isolados, sendo *exoS* mais prevalente (GAREY et al., 2008; AGNELLO; WONG-BERINGER, 2012). As toxinas efetoras ExoS e ExoU têm maior participação na virulência em relação à ExoT e ExoY (SUN et al., 2012).

Além dos efeitos citotóxicos, isolados *exoU* positivos apresentam maior propensão a multidroga resistência à cefepime, ceftazidima, piperacilina/tazobactam, carbapenêmicos e gentamicina (GAREY et al., 2008), bem como a fluoroquinolonas, exibindo tanto mutações em *gyrA*, quanto superexpressão de bombas de efluxo (WONG-BERINGER et al., 2008). A capacidade de ExoU e ExoS de modular a resposta imune do hospedeiro, associada à habilidade de induzir danos teciduais extensos, desempenham papel de grande importância na patogenicidade de *P. aeruginosa* (GALLE, CARPENTIER e BEYAERT, 2012).

2.6 FORMAÇÃO DE BIOFILME

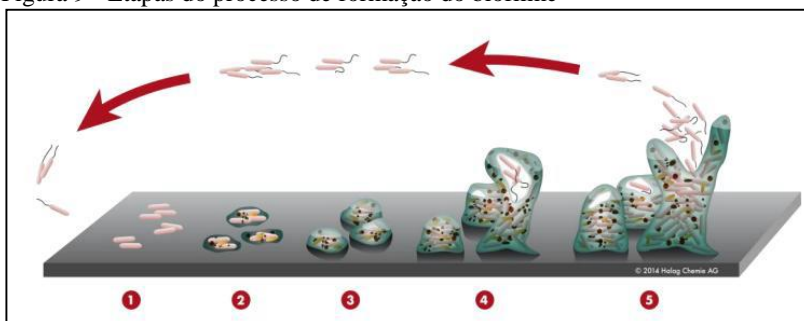
Biofilme pode ser definido como uma estrutura comunitária de células microbianas protegidas por uma matriz polissacarídica ou proteica, sintetizada pelas próprias células e aderente tanto a superfícies inertes ou vivas (WIMPENNY; MANZ; SZEWZYK, 2000; DONLAN, 2002). Os biofilmes são conhecidos como mecanismos para aumentar a tenacidade e resistência ao sistema imune do hospedeiro, conferindo capacidade de persistência contra fagocitose, estresse oxidativo, restrição de oxigênio e nutrientes, acúmulo de resíduos metabólicos, competição interespecies e agentes antimicrobianos convencionais (MORADALI; GHODS; REHM, 2017).

Estas estruturas consistem em um dos principais mecanismos de resposta a fatores externos de estresse em *P. aeruginosa*. Em algumas situações adversas, estas bactérias perdem sua motilidade e se fixam em superfícies ou hospedeiros, formando agregados celulares ou micro colônias que estão embutidas em substâncias poliméricas extracelulares (EPS), que as protegem do meio ambiente hostil (LAVERTY; GORMAN; GILMORE, 2014; KAISER et al., 2017). Em *P. aeruginosa*,

biofilmes aumentam a resistência a beta-lactâmicos, cloranfenicol, quinolonas e tetraciclina (ALAV; SUTTON; RAHMAN, 2018).

A formação de biofilme é um fenômeno biológico complexo, pois diversos fatores ambientais podem influenciar seu padrão de formação (MONDS; O'TOOLE, 2009). Biofilmes de *P. aeruginosa* são formados por meio de uma interação complexa entre diferentes fatores, incluindo a proliferação e migração celular em resposta aos nutrientes disponíveis e outros sinais ambientais externos, assim como os sinais intracelulares e a produção de uma matriz extracelular, conforme Figura 9 (PARSEK; TOLKER-NIELSEN, 2008).

Figura 9 - Etapas do processo de formação do biofilme



Legenda: 1. Células planctônicas; 2. Fixação das células em superfície fixa; 3. Secreção de substâncias poliméricas extracelulares (EPS); 4. Maturação do biofilme e 5. Desprendimento de células.

Fonte: <http://halagchemie.ch/biofilm>.

O padrão de formação de biofilme permite que a bactéria se posicione de acordo com gradientes de nutrientes favoráveis e possibilita o desenvolvimento e manutenção de subpopulações distintas fisiologicamente. Esse mecanismo facilita a sobrevivência de uma ou mais subpopulações em condições ambientais adversas (PARSEK; TOLKER-NIELSEN, 2008; MONDS; O'TOOLE, 2009).

De maneira específica, a formação do biofilme é determinada pelo processo de adesão, agregação celular e pela produção de uma substância polimérica circundante (EPS) ou matriz extracelular, em geral composta por polissacarídeos de estrutura simples, compostos por oito homo ou heteropolissacarídeos (LAVERTY; GORMAN; GILMORE, 2014; KAISER et al., 2017), lipídios, ácidos nucleicos, e proteínas.

A EPS desempenha um importante papel na manutenção da integridade estrutural do biofilme, facilitando a adesão às superfícies e

formando uma rede de coesão entre os polímeros, os quais garantem que as células do biofilme permaneçam estacionárias (ALAV; SUTTON; RAHMAN, 2018). Essa característica faz parte de um processo controlado geneticamente que induz várias funções adicionais e alterações fenotípicas, incluindo perda de motilidade, taxa de crescimento reduzida e aumento da capacidade de adesão superficial, bem como altera a susceptibilidade à resposta do hospedeiro. Essas características determinadas geneticamente contribuem para a virulência (KAISER et al., 2017).

A formação de biofilme mucoso por *P. aeruginosa* é uma característica fortemente relacionada a infecções crônicas e indicativo de progressão da doença e persistência a longo prazo. Como consequência, essa espécie bacteriana domina a microbiota pulmonar em pacientes com mais de 24 anos com fibrose cística. Outras infecções associadas ao biofilme de *P. aeruginosa* incluem infecção crônica de feridas, otite média crônica, rinosinusite crônica, infecção do trato urinário associada ao uso de cateter e ceratite relacionada à lente de contato (MORADALI; GHODS; REHM, 2017).

P. aeruginosa utiliza um sistema de comunicação molecular, o *quorum sensing* (QS), para sincronizar a expressão de certos genes e dessa maneira, regular os fatores de virulência (como piocianinas e proteases), para mobilidade e formação de biofilme (GUENDOUZE et al., 2017). O QS é um sistema pelo qual as células bacterianas se comunicam para atuar como uma comunidade de células. Isso maximiza o potencial de suas estratégias de sobrevivência mutualistas, permitindo que benefícios seletivos sejam conferidos à população bacteriana que, de outra forma, não estaria presente como células individuais (FOXMAN; BROWN, 2003; LAVERTY; GORMAN; GILMORE, 2014; KAISER et al., 2017).

Em *P. aeruginosa* o QS controla a produção de exoenzimas, secreta toxinas, como a elastase e exotoxina A e direciona a formação de biofilme. O QS é de grande importância na produção de biofilmes bacterianos e na regulação positiva e negativa dos genes relacionados. Em *P. aeruginosa* há quatro sistemas de QS identificados: o sistema *las*, controlado pela produção de *N*-(3-oxododecanoil)-L-homoserina pelo *loci* gênico *lasRI*; o sistema *rhl*, regulado pela produção de *N*-butiril-homoserina lactona produzida pelo operon *rhlRI* e o sistema *pqs* que controla os sistemas *las* e *rhl* pela produção de 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona. O sistema *rhl* é controlado pelo sistema *las* a medida que LasR-*N*-(3-oxododecanoil)-L-homoserina lactona ativa a transcrição de *rhlR* e *rhlI* o que significa que os dois sistemas são interligados

(WAGNER et al., 2003; LAVERTY; GORMAN; GILMORE, 2014; GUENDOUZE et al., 2017; KALIA et al., 2018).

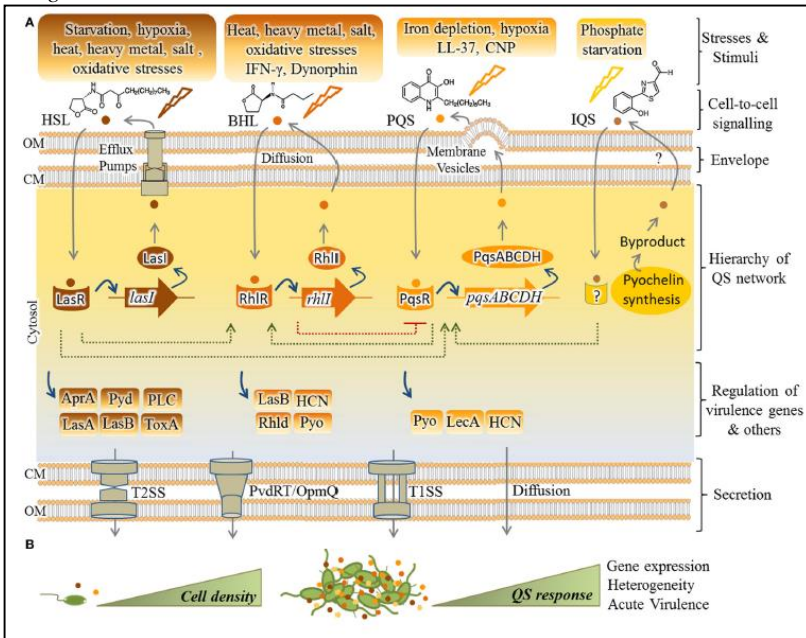
Recentemente descobriu-se o sistema de sinalização promovido pelo composto nomeado IQS (2-(2-Hidroxifenil)-tiazol-4-carbaldeído). Acreditava-se que este sistema fosse produto de atividade enzimática de proteínas codificadas pelos genes *ambBCDE*. Contudo, novos achados mostram que a molécula IQS é um subproduto da biossíntese da pirolinina e as proteínas AmbBCDE são responsáveis pela biossíntese da toxina L-2-amino-4-metoxi-trans-3-ácido butenóico (AMB) (MORADALI; GHODS; REHM, 2017).

Acredita-se que o gene *pelA-G* seja controlado indiretamente pelos sistemas de QS *las* e *rhl*. A detecção de QS também demonstrou regular a produção de DNA extracelular nos biofilmes (SAKURAGI; KOLTER, 2007). O sistema *rhl* é responsável pela produção de biosurfactantes anfífilicos, conhecidos como rhamnolípidios (hemolisina termoestável), nos últimos estágios de desenvolvimento do biofilme que auxiliam na manutenção de macrocolônias e canais cheios de líquido.

Este sistema também é responsável pela produção de múltiplas enzimas extracelulares juntamente com metabólitos secundários, como pirocianina, cianeto de hidrogênio e pirodinina. Em *P. aeruginosa* existe uma alta correlação entre a arquitetura do biofilme e a detecção de quórum, com pouca ou nenhuma influência na adesão e motilidade do biofilme (HENTZER et al., 2003). O sistema *pqs* tem especial importância para a produção de exoprodutos *rhl*-dependentes no início da fase estacionária do crescimento. A produção de 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona está relacionada à ativação de *lasR* e, portanto, é pensado para operar entre os sistemas *las* e *rhl* (LAVERTY; GORMAN; GILMORE, 2014).

O sistema QS *rpoS* é comum a *Escherichia coli* e *P. aeruginosa*. Em *P. aeruginosa*, a mutação de *rpoS* leva a susceptibilidade aumentada de células de fase estacionária a calor, alta osmolaridade, pH ácido (baixo), peróxido de hidrogênio e etanol. (LAVERTY; GORMAN; GILMORE, 2014). O mecanismo de ação do sistema QS pode ser observado na Figura 10.

Figura 10 - Mecanismo de ação do sistema Quorum Sensing (QS) em *P. aeruginosa*



Legenda: (A) Ação dos quatro sinalizadores do sistema QS em *P. aeruginosa*, incluindo Las, Rhl, Pqs e IQS, cujo papel é pouco esclarecido como mediador de respostas no QS, enquanto LasR está no topo da cascata. Em resposta a estímulos específicos / estresse, cada caminho sintetiza auto-indutores cognatos (AIs) [HSL (3-oxo-C12-homoserina lactona)], BHL (lactona N-butyrylhomoserina ou C4-HSL), PQS (2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona) e IQS [2-(2-hidroxi-fenil)-tiazole-4-carbaldeído (aeruginaldeído)]. A exportação e importação de HSL, BHL e PQS é mediada pelas bombas de efluxo MexAB-OprM / MexEF-OprN, difusão livre e vesículas de membrana, respectivamente. O ponto de interrogação indica o caminho desconhecido do transporte IQS. Como circuitos ajustados individuais, mas interconectados (linhas tracejadas), os fatores de transcrição (isto é, LasR, RhlR e PqsR) são ativados por AIs para aumentar a expressão da AI cognada sintases (respectivamente, LasI, RhlI, PqsABCdH), bem como outras, como genes de fatores de virulência. O caminho IQS permanece não esclarecido e o receptor IQS ainda é desconhecido. Vários sistemas de secreção, principalmente, sistemas de secreção tipo 1 e 2 (T1SS / T2SS) e também a bomba de efluxo PvdRT-OpmQ medeiam a secreção de fatores de virulência. (B) QS inicia-se após a produção cumulativa de IAs (círculos pequenos e coloridos), aumentando a densidade celular e resultando em respostas coletivas. AprA, protease alcalina; Pyd, pyoverdine; PLC, fosfolipase C; Tox, toxina A; LASA, LasA elastase; LASB, elastase LasB; HCN, cianeto de hidrogénio; Pyo, piocianina; RhlD,

rhamnolipídios; Lec A, lectina A; CM, membrana citoplasmática; OM, membrana externa.

Fonte: MORADALI; GHODS; REHM, 2017.

A pesquisa relacionada à ação do QS e à formação de biofilme tem crescido muito nos últimos anos. Comin e colaboradores relatam a ação de substâncias com atividade anti-biofilme como a *Melaleuca alternifolia* livre e em nanopartículas, que atuam reduzindo a formação do biofilme (COMIN et al., 2016).

Com o maior conhecimento a respeito do sistema QS, as pesquisas relacionadas à ação anti-biofilme têm sido direcionadas a este sistema regulador. Os triterpenos pentacíclicos betulina e ácido betulínico demonstram capacidade de atenuar os efeitos do QS, reduzindo os fenótipos de virulência associados à formação de biofilme, sem alterar o crescimento cinético e a viabilidade dos patógenos, evitando pressão seletiva que pode desencadear mecanismos de resistência. Essas substâncias ligam-se em regiões dos sítios ativos de LasR e RhIR, reduzindo sua ação na produção de biofilme (RAJKUMARI et al., 2018). O sesquiterpeno lactona partenolida reduziu a produção de fatores de virulência, bem como a formação de biofilmes possivelmente reprimindo a expressão dos genes reguladores do QS, visto que se liga no sítio ativo de LasR (KALIA et al., 2018).

A motilidade bacteriana também contribui para a formação e arquitetura de biofilmes. *P. aeruginosa* possuem pelo menos três tipos de motilidade, incluindo movimentação flagelar, movimentação por espasmos mediada pelos pili tipo IV (T4P), movimentação em superfícies semissólidas. Alta motilidade resulta em um biofilme plano e uniforme, enquanto que motilidade reduzida promove agregados bacterianos e formação de micro colônias (WANG et al., 2014). A movimentação flagelar e do T4P são responsáveis pela adesão inicial de *P. aeruginosa* a superfícies em combinação com dois lipopolissacarídeos denominados A e B (MAKIN; BEVERIDGE, 1996; MATTICK, 2002; BOHN et al., 2009; LAVERTY; GORMAN; GILMORE, 2014).

A adesão intracelular destas bactérias é aumentada pela produção de lectinas PA-IL e PA-IIL, sintetizadas no citoplasma das células planctônicas. Essas lectinas são liberadas após processo de lise celular devido ao declínio de crescimento bacteriano gerado pelo estresse ambiental, ligando-se a células bacterianas saudáveis, aderindo aos substratos glicoconjugados (KOLOMIETS et al., 2009).

Para auxiliar na aderência, PA-IL e PA-IIL localizam-se na membrana externa de bactérias do biofilme. PA-IL liga-se

preferencialmente a galactose e PA-IIL possui afinidade com monossacarídeos, especialmente fucose, contribuindo para a formação do biofilme (TIELKER et al., 2005; ADAM et al., 2007). Em *P. aeruginosa* as lectinas são solúveis, o que sugere que estejam envolvidas na formação de biofilmes nas vias aéreas de pacientes com fibrose cística (MEWE et al., 2005; LAVERTY; GORMAN; GILMORE, 2014).

O acúmulo e maturação do biofilme corresponde ao aumento da produção de um alginato que compõe a matriz extracelular. Este composto é importante para a arquitetura do biofilme, porém não essencial para que o mesmo ocorra. A estrutura do biofilme é tridimensional, possui canais de água, micro e macro colônias e uma espessa matriz. As bactérias do biofilme apresentam regulação negativa de genes relacionados à motilidade, como os responsáveis pela produção de flagelos e regulação positiva para genes de produção de substâncias poliméricas extracelulares durante a fase de maturação (KOLOMIETS et al., 2009; LAVERTY; GORMAN; GILMORE, 2014).

A substância extracelular polimérica do biofilme em *P. aeruginosa* é composta por polissacarídeos, proteínas, lipídios e ácidos nucléicos (ZHAO; LIU; BURGESS, 2007). Em isolados mucoides provenientes de fibrose cística, o principal exopolissacarídeo produzido é o ácido algínico (STAPPER et al., 2004), isolados não mucoides possuem baixos níveis de alginato e baixa produção de biofilme (MATSUKAWA; GREENBERG, 2004; LAVERTY; GORMAN; GILMORE, 2014).

Em isolados não mucoides ocorre prevalência dos exopolissacarídeos Psl e Pel. Apenas 1% dos isolados de infecções hospitalares em outros sítios, exceto os pulmões, são mucoides, portanto, o ácido algínico não é o exopolissacarídeo mais presente em infecções hospitalares (LAVERTY; GORMAN; GILMORE, 2014; MORADALI; GHODS; REHM, 2017). A presença de substância extracelular polimérica exibindo diferentes propriedades físico-químicas confere uma estratégia de sobrevivência devido ao aumento da flexibilidade e a estabilidade dos biofilmes sob várias condições (MORADALI; GHODS; REHM, 2017).

2.6.1 Formação de biofilme por isolados não mucoides

A aderência, agregação, maturação e formação da estrutura do biofilme em *P. aeruginosa* não mucoides, devem-se também à produção dos exopolissacarídeos Psl e Pel (FRIEDMAN; KOLTER, 2004b). A síntese de proteínas, enzimas e transportadores moleculares requeridos para produção destes exopolissacarídeos e formação pelicular do biofilme

em *P. aeruginosa* PAO1 são codificados pelos genes *pslA-O* e *pelA-G* (LEE et al., 2007; MA et al., 2007). O locus gênico *pslA-G* está presente em apenas alguns isolados, enquanto que *pelA-G* foi identificado em todos os isolados de *P. aeruginosa* (FRIEDMAN; KOLTER, 2004a; LAVERTY; GORMAN; GILMORE, 2014).

Pel é um polímero rico em glicose. A análise das proteínas PelA-G mostra que PelA é uma proteína citosólica e uma liase oligogalacturonide; PelB possui a função de proteína de membrana externa; PelC é uma glicosiltransferase presente no periplasma; PelD e PelE são grandes proteínas citosólicas localizadas na membrana interna, sendo PelD uma proteína transmembrana; PelF é uma glicosiltransferase e PelG é uma 12-transmembrana proteína de membrana interna (LEE et al., 2007; LAVERTY; GORMAN; GILMORE, 2014; WANG et al., 2014).

As proteínas Psl não tem função bem esclarecida pela literatura, como as funções individuais de Pel. A proteína PslA foi identificada como um suposto carreador de UDP-glicose em *P. aeruginosa* PAO1. Análises de substâncias poliméricas extracelulares desta cepa mostrou que os principais carboidratos constituintes de Psl são glicose, manose e ramnose, não o ácido algínico. Psl localiza-se em regiões periféricas da matriz do biofilme, acredita-se que a razão é o aumento de nutrientes, metabolismo, DNA e síntese proteica na extremidade externa do biofilme. A degradação de Psl no centro da matriz por enzimas, corrobora para a confirmação desta hipótese (BYRD et al., 2009; LAVERTY; GORMAN; GILMORE, 2014; WANG et al., 2014).

A produção do mensageiro secundário bis-(3'-5')-cíclico-dimérico-guanosina monofosfato (c-di-GMP) está relacionada à maturação de biofilmes e produção de exopolissacarídeos. Essa produção é regulada pela ação de enzimas diguanilato ciclase (SINTIM et al., 2010). A clivagem ou redução na produção de c-di-GMP é associada à expressão de fatores de motilidade e virulência. Altos níveis de c-di-GMP são associados a traços de biofilme em formação (adesão e acúmulo), reduzem a motilidade e aumentam a produção de exopolissacarídeos (LEE et al., 2007; LAVERTY; GORMAN; GILMORE, 2014; WANG et al., 2014).

Um sítio de ligação de c-di-GMP foi identificado na proteína citosólica de membrana interna PelD, o que relaciona esta molécula a síntese de Pel. C-di-GMP é produzida a partir de duas moléculas de guanosina trifosfato e sua síntese é regulada pela enzima diguanilato ciclase. Estudos mostram que, embora a formação de Psl seja controlada

por c-di-GMP, também atua como um sinal de *feedback* positivo e estimula a produção de duas diguanilato ciclases, SiaD e SadC, resultando em maior formação de c-di-GMP (IRIE et al., 2012). Análogos de c-di-GMP possuem ação antibiofilme contra *P. aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Baixas concentrações de óxido nítrico causam dispersão do biofilme e aumento da sensibilidade a antimicrobianos (BARRAUD et al., 2009; LAVERTY; GORMAN; GILMORE, 2014).

O DNA extracelular tem um importante papel na maturação e estabilização do biofilme em isolados de *P. aeruginosa* não mucoides, compensando a falta do alginato. Estudos mostram que na matriz de biofilmes maduros, o DNA extracelular foi o polímero mais prevalente e que os exopolissacarídeos eram de grande importância em relação à integridade estrutural. DNases possuem a capacidade de desfazer biofilmes jovens, entretanto, possuem baixa capacidade de dissolução de biofilmes maduros. Estes dados sugerem que os biofilmes iniciais são mantidos unidos por DNA extracelular, mas os biofilmes maduros são mantidos unidos por outros compostos, os exopolissacarídeos (MA et al., 2006).

O DNA extracelular também pode desempenhar um papel no aumento da resistência das formas de biofilme de *P. aeruginosa* em relação a antimicrobianos catiônicos, como os peptídeos antimicrobianos. O DNA extracelular é um quelante de cátions e atua sequestrando cátions do ambiente circundante (MULCAHY; CHARRON-MAZENOD; LEWENZA, 2008; LAVERTY; GORMAN; GILMORE, 2014).

2.6.2 Formação de Biofilme por isolados mucoides

A produção de muco por cepas formadoras de mucóides de *P. aeruginosa* é importante para a colonização de dispositivos médicos e superfícies celulares, como os pulmões em pacientes com fibrose cística. A formação deste muco, composto principalmente por ácido algínico, é importante para proteger a bactéria de antimicrobianos e mecanismos de defesa do hospedeiro por penetração restrita dessas moléculas através da matriz de biofilme (BYRD et al., 2009). A síntese do ácido algínico, também conhecido por alginato é controlada pelo operon *algACD*. A regulação positiva destes genes depende de diversos fatores ambientais: alta concentração de oxigênio, alta osmolaridade, ausência de nitrogênio e a presença de etanol (LAVERTY; GORMAN; GILMORE, 2014; MORADALI; GHODS; REHM, 2017).

Os genes importantes para a produção do ácido algínico são *algA*, *algC* e *algD* que são requeridos para a síntese do precursor de

alginato, guanosina difosfato (GDP)-ácido manurônico. Uma combinação das proteínas transportadoras transmembrana Alg44 e Alg8, que normalmente não são ativas em *P. aeruginosa* não mucoide, permite o movimento deste precursor de alginato através da membrana interna para polimerização. AlgA-X são enzimas de alginato envolvidas nos processos de polimerização e biossíntese que resultam na formação de alginato (FRANKLIN; OHMAN, 2002; FRANKLIN; DOUTHIT; MCCLURE, 2004).

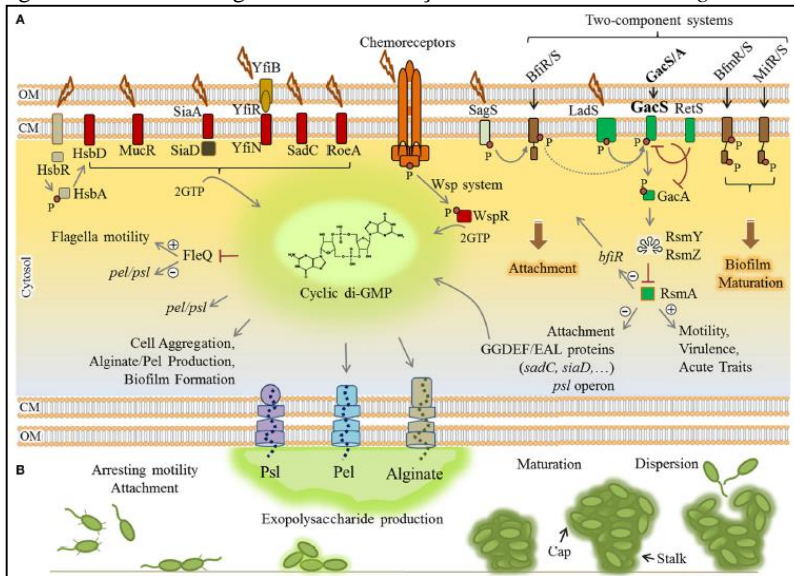
O papel da alginato liase, no estágio de maturação, não é esclarecido, embora possa permitir a produção de oligômeros curtos que iniciam a polimerização, além de permitir a quebra do alginato na fase de desprendimento celular do crescimento do biofilme. AlgG interage com AlgK e AlgX, possuem um papel importante na proteção da produção do polímero de alginato formando um andaime no periplasma que circunda as moléculas de polímero recentemente formadas (FRANKLIN; OHMAN, 2002; FRANKLIN; DOUTHIT; MCCLURE, 2004).

A epimerização de resíduos de manuronato polimerizado é controlada pela enzima AlgG (FRANKLIN; DOUTHIT; MCCLURE, 2004). A acetilação destes resíduos de manuronato também ocorre através das enzimas AlgF, AlgJ e AlgI. O AlgF está localizado no periplasma. AlgJ é uma proteína de membrana de tipo II com uma porção de peptídeo de sinal não clivado ligada à membrana interna com uma porção remanescente no periplasma, enquanto que AlgI é uma hélice transmembrana integral que aceita um grupo acetil de um doador desconhecido. Quando o processo de O-acetilação é concluído, o transporte de alginato para fora da célula é mediado por AlgE presente na membrana externa que forma a maioria da substância de matriz polimérica extracelular (WOZNIAK; SPRINKLE; BAYNHAM, 2003).

AlgA, AlgC e AlgD são enzimas importantes na produção de ácido GDP-manurônico. AlgA está envolvido na biossíntese de alginato catalisando tanto a produção de manose-6-fosfato a partir de fructose-6-fosfato e PIB-manose a partir de manose-1-fosfato, como uma fosforanose isomerase e GDP-manose pirofosforilase, respectivamente. O AlgC catalisa a produção reversível de manose-6-fosfato em manose-1-fosfato, também mostrou ser importante na síntese de lipopolissacarídeos, com sua preferência por substratos contendo manose e glicose, permitindo que ele possua um mecanismo de ação diversificado. O AlgD é uma GDP-manose desidrogenase limitante de taxa que catalisa a produção do GDP-ácido manurônico da GDP-manose (REGNI et al., 2004; LAVERTY; GORMAN; GILMORE, 2014).

O controle da biossíntese do alginato e transcrição das proteínas Alg são mediados pelo operon *algD*, responsável pela produção de ácido GDP-manurônico, a molécula base para a polimerização e síntese de alginato (NIKOLSKAYA; GALPERIN, 2002). O processo regulatório da formação de biofilme em *P. aeruginosa* estão representados na Figura 11, abaixo.

Figura 11 - Processo regulatório da formação de biofilme em *P. aeruginosa*



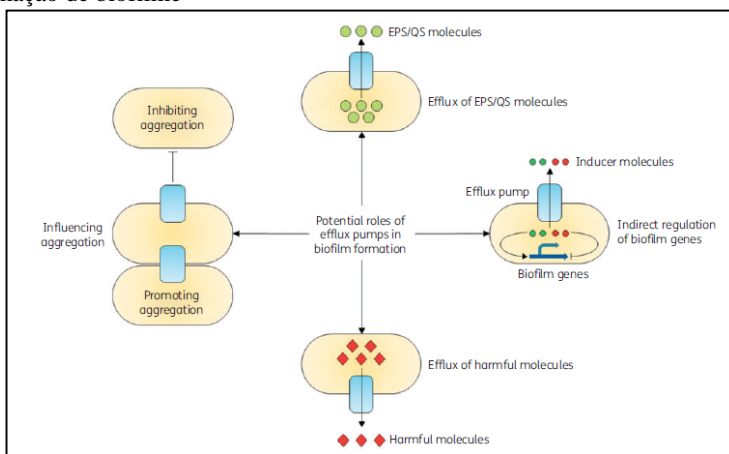
Legenda: (A) A elevação da molécula c-di-GMP é um determinante chave para a interrupção de motilidade. Os fatores ambientais são detectados por várias proteínas localizadas no envelope das células, essas proteínas contribuem para a formação de um sistema de dois componentes (retângulos marrons/verdes), sistema tipo quimiorreceptor (complexo de laranja) e outras vias de sinalização mediadas pelo receptor (dispostas no lado esquerdo da figura). Ocorre o desencadeamento de cascatas de fosforilação (círculo vermelho pequeno) ou interações proteína-proteína, os sinais induzem diguanilato-ciclases (contendo motivo GGDEF) (retângulo vermelho) para sintetizar c-di-GMP a partir de duas moléculas de GTP (guanosina-5'-trifosfato). Consequentemente, proteínas detectoras de c-di-GMP atuam como receptor/efetor para saídas específicas, como indução de polimerização de alginato e Pel, inibição da motilidade e desregulamentação da expressão de *psl/pel* através de FleQ, indução de ligação e formação/maturação de biofilmes desencadeada por sistemas de dois componentes. Os sistemas de dois componentes estão interligados e os A rede reguladora LadS / RetS / GacS / GacA / RsmA (retângulos verdes) que

desempenha um papel fundamental na mudança fenotípica de motilidade para o modo sésbil, regulação negativa de QS e produção de fatores de virulência. (B) Foram representados vários estágios de formação e desenvolvimento do biofilme. Sinais positivos e negativos representam efeito positivo e negativo de reguladores de transcrição, respectivamente. CM, membrana citoplasmática; OM, membrana externa.

Fonte: MORADALI; GHODS; REHM, 2017.

Diversos estudos sugerem que as bombas de efluxo podem influenciar na formação de biofilmes das seguintes maneiras: extrusão de EPSs, moléculas do QS e reguladores; regulação indireta dos genes envolvidos no processo de formação do biofilme; extrusão de moléculas prejudiciais, tais como antimicrobianos e intermediários metabólicos; e influenciando agregação por meio da promoção ou prevenção da adesão às superfícies e outras células demonstradas na Figura 12 (ALAV; SUTTON; RAHMAN, 2018).

Figura 12 - Esquema representativo da influência das bombas de efluxo na formação de biofilme



Legenda: A gravura mostra os potenciais efeitos que as bombas de efluxo podem ter sobre a formação de biofilme, por meio da extrusão de compostos nocivos, influenciando na agregação (promovendo ou inibindo), pela extrusão de sinalizadores do Quorum Sensing ou ainda pela regulação indireta de genes relacionados à formação de biofilme.

Fonte: ALAV; SUTTON; RAHMAN, 2018.

Considerando o exposto nesta revisão, este trabalho propõe investigar fenotipicamente aspectos relacionados à resistência aos antimicrobianos em isolados hospitalares de *P. aeruginosa*.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar fenotipicamente a resistência de isolados de *Pseudomonas* spp. de pacientes, profissionais da saúde e ambiente hospitalar.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Determinar fenotipicamente o perfil de resistência aos antimicrobianos de isolados de *P. aeruginosa* MDR por disco difusão e comparar com o método Vitek2;
- b. Determinar a concentração inibitória mínima dos isolados de *P. aeruginosa* para os antimicrobianos cefepime, ciprofloxacino, gentamicina, imipenem e polimixina B;
- c. Determinar a atividade de bombas de efluxo nos isolados de *P. aeruginosa*;
- d. Analisar a formação de biofilme nos isolados de *Pseudomonas* spp. e correlacionar à superexpressão das bombas de efluxo.

4 METODOLOGIA

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

Os isolados bacterianos utilizados neste estudo fazem parte de um projeto aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal de Santa Catarina, sob número 32930514.0.0000.0121. Foram obedecidos os critérios éticos estabelecidos pela resolução 466/12 do Conselho Nacional de Ética em Pesquisa, Diretrizes e Normas regulamentadores de Pesquisas envolvendo seres humanos, garantindo, dessa forma, o sigilo da identidade dos participantes da pesquisa.

4.2 OBTENÇÃO E SELEÇÃO DAS AMOSTRAS

Os isolados de *Pseudomonas* spp. são provenientes do projeto de microbioma hospitalar denominado “*Health Associated Infections Microbiome Project*” (HAIMP), desenvolvido na Universidade Federal de Santa Catarina em parceria com a empresa Neopropecta, que tem como objetivo o rastreamento, identificação e caracterização de bactérias do microbioma hospitalar. O estudo desenvolvido no presente trabalho é uma parte do referido projeto.

As coletas foram realizadas mensalmente entre abril e outubro de 2015 em cinco alas do Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago (HU/UFSC): Centro Cirúrgico (CC), Clínica Médica I (CMI), Clínica Cirúrgica I (CRI), Emergência (EMG) e Unidade de Terapia Intensiva (UTI). Os pacientes foram selecionados de acordo com os critérios de maior tempo de internação e aceitação em participar do projeto e foi realizada coleta de *swab* de mãos, nasal e retal. Os critérios de seleção dos profissionais da saúde foram aceitação em participar e à disponibilidade para a realização das coletas. Estas foram obtidas de *swab* de mãos, vestimenta e celular. No ambiente hospitalar foram selecionadas as áreas com alto contato, como grades de leito, banheiros, posto de enfermagem, sala de descanso dos profissionais da saúde; e ainda equipamentos de uso comum, como aparelho de Raio X e termômetros. As amostras foram encaminhadas para isolamento e análises microbiológicas e moleculares no Laboratório de Microbiologia Molecular (MIMA/CCS/UFSC), no Serviço de Análises Clínicas do HU/UFSC e no Laboratório de Biologia Molecular da empresa Neopropecta Pesquisa e Consultoria SA (Florianópolis/SC).

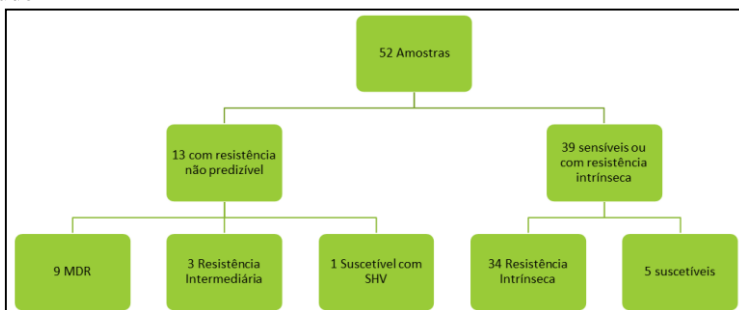
Na execução do HAIMP, o total de 52 isolados de *Pseudomonas* spp. obtidos foram identificados bioquimicamente (Vitek2 - bioMèrieux®) e geneticamente (sequenciamento da região v3/v4 do 16S rDNA).

Os isolados também tiveram um perfil de susceptibilidade preliminar determinado pelo Vitek2, sendo que o cartão utilizado para o TSA de todos os bacilos Gram-negativos do projeto HAIMP avaliou os seguintes antimicrobianos: amicacina, ampicilina, ampicilina/sulbactam, cefepime, cefoxitina, ceftazima, ceftriaxona, cefuroxima, acetilcefuroxima, ciprofloxacino, colistina, gentamicina, imipenem, meropenem, piperacilina/tazobactam e tigeciclina.

Também foi feita a pesquisa de beta-lactamases por qPCR para os genes *bla*CTX-M-1-like, *bla*CTX-M-2-like, *bla*CTX-M-8-like, *bla*CTX-M-9-like, *bla*CTX-M-25-like, *bla*KPC-like, *bla*SHV-like, *bla*NDM-like, *bla*IMP-like, *bla*VIM-like, *bla*GES-like, *bla*SPM-like.

De acordo com a caracterização inicial do projeto HAIMP, dos 52 isolados de *Pseudomonas* spp., 5 foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados e 34 isolados possuíam apenas resistências intrínsecas. Dos 13 isolados com perfil de susceptibilidade não predizível, 9 apresentaram perfil MDR, 3 mostraram resistência intermediária a algum antimicrobiano e 1 amostra era fenotipicamente susceptível a todos os antimicrobianos testados, mas apresentava o gene da beta-lactamase SHV (Figura 13).

Figura 13 - Características das amostras de *Pseudomonas* spp. incluídas no estudo



Legenda: Descrição das características das amostras de *Pseudomonas* spp. utilizadas no estudo. MDR: Multidroga resistente; SHV: Enzima *Sulphydryl Variable*.

Fonte: Desenvolvido pela autora, 2017.

Entre os isolados identificados como *Pseudomonas* spp. no projeto HAIMP, 33 pertenciam à espécie *P. aeruginosa*, 9 *P. stutzeri*, 9 *P. putida* e 1 *P. luteola*. Dos 13 isolados com resistência não predizível, 10 eram da espécie *P. aeruginosa*, 2 *P. putida* e 1 *P. luteola*. Os isolados resistentes de *Pseudomonas* spp. não *aeruginosa* foram provenientes do ambiente hospitalar, enquanto que todos os isolados resistentes de *P. aeruginosa* foram provenientes de pacientes (6 amostras de *swab* retal, 3 de *swab* nasal e 1 de *swab* de mãos). As características de todos os isolados utilizados neste estudo estão descritas no Quadro 3.

Quadro 3 - Caracterização dos isolados selecionados de *Pseudomonas* spp. (continuação)

| AMOSTRA | ESPÉCIE | MÊS | UNIDADE | SÍTIO ANATÔMICO/LOCAL | Enzima | AMI | CPM | CAZ | CIP | GEN | IPM | MER | PPT |
|---------|-------------------------|----------|---------|-----------------------|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 16 | <i>P. stutzeri</i> | Setembro | UTI | Posto Enfermagem | | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 17 | <i>P. stutzeri</i> | Setembro | EMG | Leito | | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 18 | <i>P. stutzeri</i> | Setembro | EMG | Sala Descanço PS | | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 19 | <i>P. putida</i> | Julho | CRI | Dispenser Torneira | | N | N | N | N | N | N | N | N |
| 20 | <i>P. stutzeri</i> | Julho | CMI | Sala Descanço PS | | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 43 | <i>P. putida</i> | Junho | UTI | Celular PS | | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 44 | <i>P. aeruginosa</i> | Junho | UTI | Grades Leito | | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 45 | <i>P. oryzihabitans</i> | Junho | UTI | Raio X | | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 46 | <i>P. aeruginosa</i> | Junho | EMG | Retal Paciente | | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 47 | <i>P. aeruginosa</i> | Agosto | CRI | Retal Paciente | | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 48 | <i>P. aeruginosa</i> | Agosto | CMI | Banheiro | | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 49 | <i>P. aeruginosa</i> | Agosto | UTI | Retal Paciente | | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 50 | <i>P. aeruginosa</i> | Agosto | UTI | Retal Paciente | | S | S | S | S | S | S | S | S |
| 51 | <i>P. putida</i> | Agosto | EMG | Jaleco PS | | N | N | N | N | N | N | N | N |

Quadro 3 - Caracterização dos isolados selecionados de *Pseudomonas* spp. (conclusão)

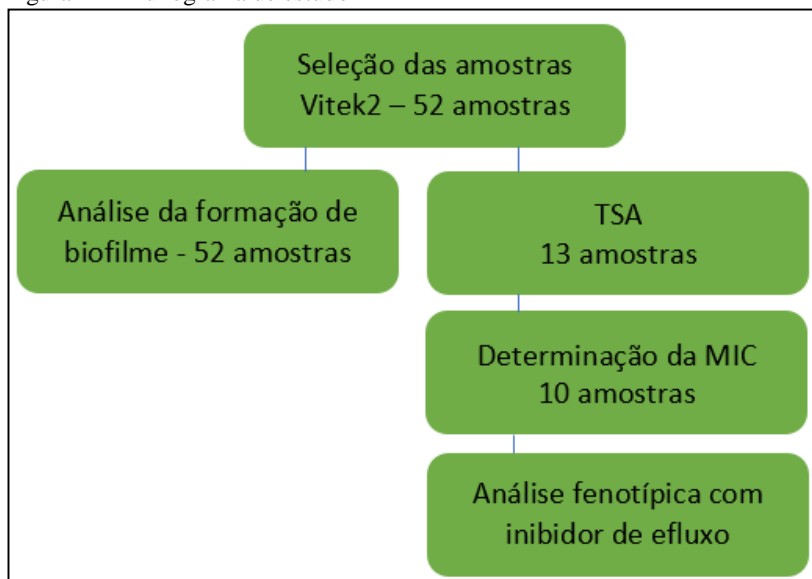
| AMOSTRA | ESPÉCIE | MÊS | UNIDADE | SÍTIO ANATÔMICO/LOCAL | Enzima | AMI | CPM | CAZ | CIP | GEN | IPM | MER | PPT |
|---------|----------------------|-------|---------|-----------------------|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 52 | <i>P. aeruginosa</i> | Junho | UTI | Termômetro | | S | S | S | S | S | S | S | S |

Legenda: Perfil de susceptibilidade determinado pelo ViteK2 para os isolados de *Pseudomonas* spp., conforme recomendado pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) (CLSI, 2017).

Antimicrobianos: AMI: amicacina; CPM: cefepime; CAZ: ceftazidima; CIP: ciprofloxacino; GEN: gentamicina; IPM: imipenem; MER: meropenem; PPT: piperacilina/tazobactam. PS: Profissional da saúde. N: TSA (teste de susceptibilidade aos antimicrobianos) não realizado, devido à amostra ser ambiental. Unidades Hospitalares: CC: Centro Cirúrgico; CMI: Clínica Médica I; CRI: Clínica cirurgia I; EMG: Emergência e UTI: Unidade de Terapia Intensiva. Isolados 1 a 13 (em negrito) apresentaram resistência a algum antimicrobiano ou presença de genes de beta-lactamases. Fonte: desenvolvido pela autora.

Foram selecionadas para a avaliação do perfil de resistência somente os isolados com resistência não predizível (ou fenotipicamente sensíveis, mas com presença de genes que codificam beta-lactamases) foram selecionados para avaliação do perfil de resistência (disco-difusão e microdiluição em caldo) e da atividade de bombas de efluxo. Já para os ensaios de formação de biofilme todas as amostras foram selecionadas para permitir a comparação entre isolados sensíveis e resistentes. As cepas controle utilizadas foram a ATCC 27853 e PAO1, conforme recomendação do CLSI ilustrado pela Figura 14.

Figura 14 - Fluxograma de estudo



Legenda: Delineamento do fluxograma com as etapas realizadas no estudo.

Fonte: Desenvolvido pela autora, 2017.

4.3 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS (TSA) POR DISCO DIFUSÃO

A susceptibilidade aos antimicrobianos foi determinada pelo método de disco difusão em ágar Muller-Hinton (Kirby-Bauer) preconizado pelo CLSI, 2017. A cepa *P. aeruginosa* ATCC 27853 foi utilizada como controle. Como a seleção dos isolados foi realizada com base no TSA determinado pela metodologia Vitek2® – bioMérieux, realizou-se a comparação do perfil de resistência apresentado pelos

isolados de acordo com ambas as metodologias. Os antimicrobianos utilizados para determinação do TSA foram os seguintes, conforme recomendação do CLSI: ticarcilina/ácido clavulânico (75 µg/10 µg) (Cecon, Brasil), piperacilina/tazobactam (100/10 µg) (Cecon, Brasil), ceftazidima (30 µg) (Cecon, Brasil), cefepime (30 µg) (Cecon, Brasil), aztreonam (30 µg) (Cecon, Brasil), imipenem (10 µg) (Cecon, Brasil), meropenem (10 µg) (Cecon, Brasil), gentamicina (10 µg) (Cecon, Brasil), ampicacina (30 µg) (Cecon, Brasil), ciprofloxacino (5 µg) (Cecon, Brasil) e levofloxacino (5 µg) (Cecon, Brasil) (GOLI et al., 2016). Os pontos de corte utilizados neste trabalho para avaliar o perfil de resistência dos isolados seguiram os critérios do CLSI. Contudo, realizou-se a comparação dos valores dos pontos de corte padronizados pelo BrCast e pelo CLSI conforme descrito no Quadro 4.

Quadro 4 - Pontos de corte padronizados pelo BrCast e CLSI para *Pseudomonas aeruginosa* (Continua)

| Classe de Antimicrobiano | Antimicrobiano | BrCast | | | | | | CLSI | | | | | |
|--------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|------|-----|--------------------------|-------|----|-------------------------------|-------|-----|-----------------------------|-------|----|
| | | Ponto de corte MIC (µg/mL) | | | Ponto de Corte Halo (mm) | | | Ponto de corte MIC (µg/mL) | | | Ponto de Corte Halo (mm) | | |
| | | S≤ | I | R> | S≥ | I | R< | S≤ | I | R≥ | S≥ | I | R≤ |
| Penicilinas | Piperacilina | - | - | - | - | - | - | 16 | 32-64 | 128 | 21 | 15-20 | 14 |
| Cefalosporinas | Cefepime (30 µg) | 8 | - | 8 | 21 | - | 21 | 8 | 16 | 32 | 18 | 15-17 | 14 |
| | Ceftazidima ^a (30 µg) | 8 | - | 8 | 17 | - | 17 | 8 | 16 | 32 | 18 | 15-17 | 14 |
| Carbapenêmicos | Doripenem | 1 | 2 | 2 | 25 | 22-24 | 24 | 2 | 4 | 8 | 19 | 16-18 | 15 |
| | Imipenem (10 µg) | 4 | 8 | 8 | 20 | 17-19 | 17 | 2 | 4 | 8 | 19 | 16-18 | 15 |
| | Meropenem (10 µg) | 2 | 4-8 | 8 | 24 | 18-23 | 18 | 2 | 4 | 8 | 19 | 16-18 | 15 |
| Monobactâmico | Aztreonam (30 µg) | 1 | 2-16 | 16 | * | * | 16 | 8 | 16 | 32 | 22 | 16-21 | 15 |
| Fluoroquinolonas | Ciprofloxacino (5 µg) | 0.5 | - | 0.5 | 26 | - | 26 | 1 | 2 | 4 | 21 | 16-20 | 15 |
| | Levofloxacino (5 µg) | 1 | - | 1 | 22 | - | 22 | 2 | 4 | 8 | 17 | 14-16 | 13 |

Quadro 4 - Pontos de corte padronizados pelo BrCast e CLSI para *Pseudomonas aeruginosa* (Continuação)

| Classe de Antimicrobiano | Antimicrobiano | BrCast | | | | | | CLSI | | | | | |
|--------------------------|------------------------|-------------------------------|----|----|--------------------------|-------|----|-------------------------------|----|----|-----------------------------|-------|----|
| | | Ponto de corte MIC (µg/mL) | | | Ponto de Corte Halo (mm) | | | Ponto de corte MIC (µg/mL) | | | Ponto de Corte Halo (mm) | | |
| | | S≤ | I | R> | S≥ | I | R< | S≤ | I | R≥ | S≥ | I | R≤ |
| Fluoroquinolonas | Norfloxacino | - | - | - | - | - | - | 4 | 4 | 16 | 17 | 13-16 | 12 |
| | Lomefloxacino | - | - | - | - | - | - | 2 | 4 | 22 | 21 | 19-21 | 18 |
| | Ofloxacino | - | - | - | - | - | - | 2 | 4 | 16 | 21 | 13-15 | 12 |
| | Gatifloxacino | - | - | - | - | - | - | 2 | 4 | 18 | 21 | 15-17 | 14 |
| Aminoglicosídeos | Amicacina (30 µg) | 8 | 16 | 16 | 18 | 15-17 | 15 | 16 | 32 | 64 | 17 | 15-16 | 14 |
| | Gentamicina (10 µg) | 4 | - | 4 | 15 | - | 15 | 4 | 8 | 16 | 15 | 13-14 | 12 |
| | Netilmicina | 4 | - | 4 | 12 | - | 12 | 8 | 16 | 32 | 15 | 13-14 | 12 |
| | Tobramicina | 4 | - | 4 | 16 | - | 16 | 4 | 8 | 16 | 15 | 13-14 | 12 |
| Polimixinas | Colistina | 2 | - | 2 | ** | ** | ** | 2 | - | 4 | - | - | - |
| | Polimixina B | 2 | - | 2 | ** | ** | ** | 2 | 4 | 8 | - | - | - |

Quadro 4 - Pontos de corte padronizados pelo BrCast e CLSI para *Pseudomonas aeruginosa* (Conclusão)

| Classe de Antimicrobiano | Antimicrobiano | BrCast | | | | | | CLSI | | | | | |
|-------------------------------|--|----------------------------|---|----|--------------------------|---|----|----------------------------|-----------|-------|--------------------------|-------|----|
| | | Ponto de corte MIC (µg/mL) | | | Ponto de Corte Halo (mm) | | | Ponto de corte MIC (µg/mL) | | | Ponto de Corte Halo (mm) | | |
| | | S≤ | I | R> | S≥ | I | R< | S≤ | I | R≥ | S≥ | I | R≤ |
| Associação de Beta-lactâmicos | Ceftazidima-avibactam ^a | 8 | - | 8 | 17 | - | 17 | 8/4 | - | 16/4 | 21 | - | 20 |
| | Ceftolozana-tazobactam | 4 | - | 4 | 24 | - | 24 | 4/4 | 8/4 | 16/4 | 21 | 17-20 | 16 |
| | Piperacilina-tazobactam ^a (100/10 µg) | 16 | - | 16 | 18 | - | 18 | 16/4 | 32/4-64/4 | 128/4 | 21 | 15-20 | 14 |
| | Ticarcilina-clavulanato (75 µg/10 µg) | - | - | - | - | - | - | 16/2 | 32/2-64/2 | 128/2 | 24 | 16-23 | 15 |

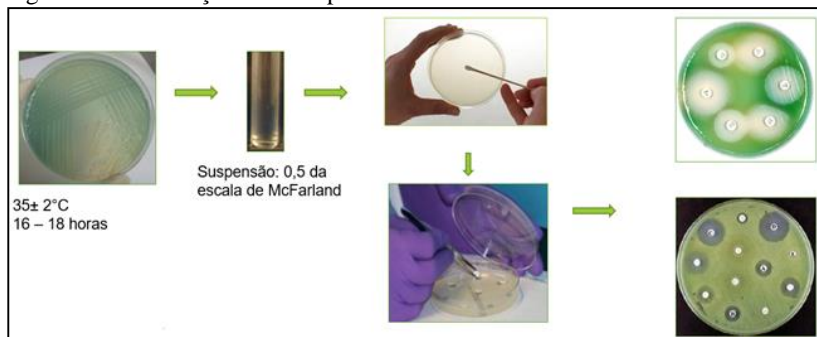
Legenda: * O ponto de corte de resistência é confiável para categorizar os isolados, mas a sensibilidade (S ou I) deve ser avaliada pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM); ** Único método de determinação da CIM é o de diluição em caldo. Métodos de disco difusão e de gradiente de difusão podem não ser confiáveis. (a) para ceftazidima, ceftazidima-avibactam e piperacilina-tazobactam, o conteúdo dos discos do BrCast difere do CLSI sendo 10 µg, 10/4 µg e 30/6 µg respectivamente. Os antimicrobianos sublinhados foram os avaliados neste estudo. (-)

Fonte: BrCast; 2018; CLSI, 2017.

O protocolo foi realizado conforme Figura 15. As bactérias foram semeadas pelo método de esgotamento em ágar triptona de soja (Sigma-Aldrich, EUA) e cresceram à 35°C por 24 horas em estufa com ar ambiente.

Posteriormente, a partir de colônias isoladas preparou-se uma suspensão em solução salina estéril a 0,5 da escala McFarland (~10⁸ UFC/mL), determinada pelo equipamento DensiCHEK™ Plus (Biomérieux). A suspensão foi inoculada em Ágar Muller Hinton (Sigma-Aldrich, EUA) de maneira uniforme com o uso de *swab* estéril e foram adicionados os discos com os antimicrobianos já descritos. Incubou-se por 16 a 18 horas a 35°C em estufa com ar ambiente. Após este período, foi feita a leitura do halo de inibição e determinação do perfil de susceptibilidade. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Figura 15 - Realização do TSA pelo método de disco difusão



Legenda: Figura esquemática demonstrando a realização do TSA pelo método de disco difusão.

Fonte: CLSI, 2017 (M100-S24).

4.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A CIM foi determinada para as amostras que apresentaram perfil de resistência a pelo menos um antimicrobiano selecionado de cada classe no teste de susceptibilidade por disco difusão. O método utilizado foi o de microdiluição em caldo recomendado pelo CLSI, com um antimicrobiano de cada classe: cefepime (Sigma-Aldrich, EUA) representante da classe das cefalosporinas,

ciprofloxacino (Sigma-Aldrich, EUA), da classe das fluoroquinolonas, gentamicina (Sigma-Aldrich, EUA), representando os aminoglicosídeos, imipenem (Sigma-Aldrich, EUA), representando os carbapenêmicos e polimixina B (Sigma-Aldrich, EUA), representando as polimixinas.

Para a realização do método de microdiluição em caldo utilizou-se placas de 96 poços estéreis para cultura de células com fundo em U. O meio utilizado foi o Mueller Hinton Cátion ajustado com pH de 7,4 +/- 0,2 (Sigma-Aldrich, EUA) à temperatura ambiente. No momento do uso, as placas foram preenchidas com 100µL do meio 2x concentrado. Posteriormente realizou-se a diluição seriada dos antimicrobianos selecionados diluídos em água estéril em concentrações superiores e inferiores ao ponto de corte determinado pelo CLSI (Quadro 5), deixando dessa forma o meio na concentração de 1x. Para algumas amostras não foi possível determinar a CIM com as diluições padronizadas, realizou-se então, novos ensaios com concentrações maiores de antimicrobiano.

Quadro 5 - Concentrações dos antimicrobianos utilizadas na diluição seriada em µg/mL

| Cefepime | Ciprofloxacino | Gentamicina | Imipenem | Polimixina B |
|----------|----------------|-------------|----------|--------------|
| 128 | 8 | 32 | 128 | 32 |
| 64 | 4 | 16 | 64 | 16 |
| 32 | 2 | 8 | 32 | 8 |
| 16 | 1 | 4 | 16 | 4 |
| 8 | 0,5 | 2 | 8 | 2 |
| 4 | 0,25 | 1 | 4 | 1 |
| 2 | 0,125 | 0,5 | 2 | 0,5 |
| 1 | 0,0625 | 0,25 | 1 | 0,25 |

Legenda: CIMs menores ou iguais às concentrações em destaque, são consideradas sensíveis de acordo com CLSI (2017).

Fonte: Desenvolvido pela autora, 2018.

As amostras foram isoladas em ágar triptona de soja (Sigma-Aldrich, EUA) pelo método de esgotamento a 35°C por 24 horas. A partir de colônias isoladas preparou-se uma suspensão em solução salina estéril a 0,5 da escala McFarland, determinada pelo equipamento DensiCHEK™ Plus (Biomérieux) e 5µL da suspensão foram adicionados em triplicata às placas contendo o meio com antimicrobianos previamente preparadas.

Foi realizada a incubação a 35°C em estufa com ar ambiente por 20 horas. Em cada placa foi incluída uma coluna controle de crescimento positivo, apenas com o meio de cultura e o inóculo bacteriano e uma coluna controle de crescimento negativo somente com o meio estéril. Para o antimicrobiano cefepime, diluído em tampão fosfato, o controle foi feito com adição deste tampão a alguns poços na coluna de controle de crescimento positivo. A cepa ATCC 27853 foi utilizada como referência em todas as placas. Determinou-se a CIM para a cepa PAO1 (cepa tipo selvagem comumente utilizada como padrão de virulência em ensaios com *P. aeruginosa*) (KLOCKGETHER et al., 2010) que foi utilizada como controle do teste com inibidor de efluxo. A leitura foi realizada pela visualização do crescimento no fundo do poço ou turvação significativa em relação ao crescimento positivo. Os ensaios foram realizados em triplicata técnica.

Durante a padronização do processo, foram realizadas provas de determinação da atividade bactericida destes mesmos microbianos. Esta prova consistiu na introdução de um instrumento repicador estéril com 96 pontas em cada poço da placa após a determinação da CIM, com posterior inoculação em placas de tamanho 140mmX15mm contendo ágar triptona de soja (Sigma-Aldrich, EUA). Foi realizada a incubação a 35°C por 24 horas e a partir daí observada a presença ou ausência de crescimento bacteriano. Nos pontos de inoculação em que não houve crescimento bacteriano, a ação do antimicrobiano foi considerada bactericida.

4.5 TESTES FENOTÍPICOS COM INIBIDOR DE EFLUXO FENILALANINA-ARGININA BETA-NAFTILAMIDA (PAbetaN)

Após a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) com os antimicrobianos selecionados utilizando o método de microdiluição em caldo Muller-Hinton, conforme recomendação do CLSI (TOHIDPOUR et al., 2009; LAMERS; CAVALLARI; BURROWS, 2013), selecionou-se as amostras que apresentaram perfil de resistência para o ensaio com inibidor de efluxo Fenilalanina-arginina beta-naftilamida (PAbetaN) (Sigma-Aldrich, EUA).

O ensaio consistiu da determinação da CIM descrita no item 4.5, sem e com o inibidor PABetaN na concentração 50µg/mL (GOLI et al., 2016). Os isolados foram testados em triplicata técnica e biológica e o resultado, checado após incubação *overnight* a 35°C em estufa com ar ambiente. A cepa PAO1 foi utilizada como referência. O fenótipo de superexpressão de bombas de efluxo é definido com a redução de duas vezes na CIM do antimicrobiano quando testado na presença do inibidor de bomba de efluxo PABetaN (TOHIDPOUR et al., 2009).

4.6 ANÁLISE DA FORMAÇÃO DE BIOFILME

Selecionou-se colônias de 24 horas isoladas por esgotamento em ágar TSA (Sigma-Aldrich, EUA), que foram repicadas em 2µL de caldo TSB (caldo soja tripticaseína) (Sigma-Aldrich, EUA). Após incubação por 24 horas a 35°C, realizou-se a diluição das culturas em meio TSB até turbidez equivalente ao tubo 1,0 da escala McFarland determinada pelo equipamento DensiCHEK™ Plus (Biomérieux) e 200µL foram aplicados em placas de 96 poços com fundo chato em quadruplicata. Os ensaios foram realizados em triplicata biológica. Como controle negativo foi utilizado o meio TSB estéril em 8 poços, a cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25913 foi utilizada como controle positivo da formação de biofilme. As placas foram incubadas a 35°C por 24 horas (FERREIRA et al., 2012; COMIN et al., 2016) em estufa com ar ambiente. O sobrenadante foi removido e os poços lavados cuidadosamente 2x com solução salina estéril. As células aderidas foram fixadas a 70°C por 1,5 horas. Posteriormente, foi aplicado 200 µL de cristal violeta 1% (FERREIRA et al., 2012) em cada poço por 5 minutos. O corante foi removido e os poços foram lavados cuidadosamente 5x com água destilada estéril ou até que os poços de controle negativo estivessem limpos. As placas foram secas a 70°C por 1,5 horas e foi realizada a leitura da densidade ótica (DO) do crescimento no comprimento de onda de 540nm no equipamento SpectraMax Paradigm Multi-Mode Microplate Reader (FERREIRA et al., 2012). A densidade ótica do biofilme corado das amostras (Doa) foi comparado com o valor da densidade ótica dos controles negativos (Docn). Para determinar o grau de formação de biofilme foi utilizada a seguinte classificação: não formadora de biofilme ($Doa \leq Docn$), fracamente formadora de biofilme ($Docn \leq Doa \leq 2 \cdot Docn$), moderadamente formadora de biofilme ($2 \cdot Docn < Doa \leq 4 \cdot Docn$) e fortemente formadora de biofilme ($4 \cdot Docn < Doa$) (RODRIGUES et al., 2009).

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas por meio do *software Statistical Package for the Social Sciences v. 22* (SPSS Statistics 22). O programa *GraphPadPrism v. 5* e *Statistical Package for the Social Sciences v. 22* (SPSS Statistics 22) foram utilizados para a construção dos gráficos. A concentração inibitória mínima na ausência e na presença do inibidor de efluxo PAbetaN foi comparada pelo teste de Wilcoxon, adotando nível de significância $p \leq 0,01$. A formação de biofilme foi comparada pelo teste Qui-quadrado, adotando nível de significância $s \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS (TSA)

O perfil de susceptibilidade determinado pelo método de disco difusão de Kirby-Bauer foi concordante com os perfis de susceptibilidade determinados pelo Vitek2® na maior parte dos isolados analisados. Contudo, os isolados 2, 3 e 4 que apresentaram perfil MDR pelo Vitek2 foram susceptíveis quando testados por disco difusão. Ainda o isolado 11, apresentou resistência intermediária à piperacilina-tazobactam pelo Vitek2 e demonstrou resistência pela disco difusão. Enquanto o isolado 9, resistente a piperacilina-tazobactam e com resistência intermediária para cefepime na determinação do Vitek2, apresentou-se susceptível para ambos os antimicrobianos pela disco. O isolado *P. putida* (isolado 12) ambiental, com perfil de resistência intermediário pelo Vitek2, foi susceptível pela disco difusão.

Para o TSA pelo Vitek2 são utilizados cartões comuns a todas os bacilos Gram-negativos, por esta razão há diferença nos antimicrobianos testados. Assim, por terem sido selecionados antimicrobianos específicos para o TSA de *P. aeruginosa* por disco difusão, obteve-se um perfil mais abrangente da resistência destes isolados, com resultados adicionais para aztreonam, levofloxacino e ticarcilina com ácido clavulânico.

De acordo com a classificação de resistências definido por Margiorakos em 2011, 10 isolados (19,2%) apresentaram resistência a pelo menos um tipo de antimicrobiano recomendado pelo CLSI para o tratamento de *P. aeruginosa* e 6 isolados (11%) apresentaram o perfil MDR, desconsiderando as resistências intrínsecas. Todos os isolados que mantiveram o perfil de resistência foram da espécie *P. aeruginosa* e provenientes de pacientes, sendo que 6 foram de *swab* retal, 3 de *swab* nasal e 1 do *swab* de mãos.

As amostras 1 e 4 eram produtoras da carbapenemase SPM, identificada previamente a este estudo por qPCR. Entretanto, a resistência fenotípica aos carbapenêmicos só foi observada na amostra 1 (resistente pelo BrCast e resistência intermediária pelo CLSI). A amostra 4, apresentava o gene SPM mas era fenotipicamente sensível ao imipenem e ao meropenem segundo o CLSI, permanecendo resistente ao meropenem somente se usado o critério do BrCast (Quadro 6).

Quadro 6 - Teste de Susceptibilidade aos Antimicrobianos (TSA) determinado por disco difusão (continua)

| ANTIMICROBIANOS | | | AMI | | CPM | | CAZ | | CIP | | LVX | | GEN | | IPM | | MER | | PPT | | ATM | | TIC | | | |
|-----------------|-----------------|--------|-----|---|-----|---|-----|---|-----|---|-----|---|-----|---|-----|---|-----|---|-----|---|-----|---|-----|---|---|---|
| AMOSTRA | LOCAL DE COLETA | ENZIMA | B | C | B | C | B | C | B | C | B | C | B | C | B | C | B | C | B | C | B | C | B | C | | |
| ATCC 27853 | - | | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | * | S | S | S | | |
| 1 | Retal Paciente | SPM | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | I | * | I | - | R | |
| 2 | Mãos Paciente | | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | * | S | - | R |
| 3 | Nasal Paciente | | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | * | S | - | I |
| 4 | Retal Paciente | SPM | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | R | S | S | S | S | * | S | - | I | |
| 5 | Retal Paciente | | R | R | R | S | S | R | R | R | R | R | R | S | S | R | S | S | S | S | R | R | - | R | | |
| 6 | Retal Paciente | | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | I | I | S | S | * | I | - | R | | | |
| 7 | Retal Paciente | | S | S | R | S | R | R | S | S | S | S | S | R | I | R | R | R | I | * | R | - | R | | | |
| 8 | Nasal Paciente | | R | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | * | S | - | S | | | |
| 9 | Retal Paciente | | R | R | R | S | S | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | I | R | R | - | R | |
| 10 | Nasal Paciente | | R | R | R | S | S | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | R | S | S | R | R | - | R | | |
| 11 | Ambiente | | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | R | S | R | R | R | R | R | R | R | | |

Quadro 6 - Teste de Susceptibilidade aos Antimicrobianos (TSA) determinado por disco difusão (conclusão)

| ANTIMICROBIANOS | | | AMI | | CPM | | CAZ | | CIP | | LVX | | GEN | | IPM | | MER | | PPT | | ATM | | TIC | | |
|--------------------------------------|-----------------|--------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|---|
| AMOSTRA | LOCAL DE COLETA | ENZIMA | B | C | B | C | B | C | B | C | B | C | B | C | B | C | B | C | B | C | B | C | B | C | |
| 12 | Ambiente | | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | R | R | R | R |
| 13 | Ambiente | SHV | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | S | R | R | S | S |
| Total de Amostras Resistentes | | | 5 | 4 | 5 | 1 | 2 | 2 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 | 3 | 6 | 5 | 3 | 1 | 6 | 7 | 2 | 9 | |

Legenda: As células destacadas em azul representam os resultados discrepantes entre o Vitek2 e a disco difusão. As células vermelhas representam as discrepâncias apresentadas entre as interpretações do BrCast e CLSI. * O ponto de corte de resistência é confiável para categorizar os isolados, mas a sensibilidade (S ou I) deve ser avaliada pela determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Antimicrobianos: AMI: amicacina; CPM: cefepime; CAZ: ceftazidima; CIP: ciprofloxacino; LVX: levofloxacino; GEN: gentamicina; IPM: imipenem; MER: meropenem; PPT: piperacilina/tazobactam; ATM: aztreonam; TIC: ticarcilina/ácido clavulânico. B: BrCast; C: CLSI S: suscetível; R: resistente; MDR: multidroga resistente; XDR: extensiva droga resistência.

Fonte: desenvolvido pela autora, 2017.

5.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

Os ensaios de CIMs e as CBMs (concentração bactericida mínima) dos antimicrobianos testados para as 10 amostras resistentes foram coincidentes. Os valores das CIMs podem ser observados no Quadro 7.

A amostra 1 mostrou o perfil de resistência mais amplo, com elevadas concentrações inibitórias mínimas, sendo resistente a imipenem (CIM: 1024 µg/mL), cefepime (CIM: 32 µg/mL), ciprofloxacino (CIM: 16 µg/mL) e gentamicina (CIM: > 1024 µg/mL), entretanto foi suscetível à polimixina B. Esta foi a única amostra resistente ao cefepime e o resultado da CIM para gentamicina foi superior a 1.024µg/mL, não podendo ser determinado com exatidão.

Apenas as amostras 2 e 4 foram resistentes à polimixina B, entretanto foram suscetíveis aos demais antimicrobianos. Destacando que a amostra 4 apresentou resistência ao meropenem na disco-difusão e somente segundo os critérios do BrCast.

As amostras 1, 5, 9 e 10 foram resistentes ao ciprofloxacino e à gentamicina. As amostras 1, 7, 9 e 10 foram resistentes ao imipenem. A amostra 6 que havia apresentado resistência intermediária ao meropenem no teste de disco difusão, não demonstrou resistência ao imipenem ou aos outros antimicrobianos testados para determinação da CIM, ressaltando a diferença na sensibilidade entre meropenem e imipenem como marcadores para resistência aos carbapenêmicos.

Quanto aos critérios de interpretação do perfil de susceptibilidade determinados pelo BrCast e pelo CLSI, ocorreu diferença significativa para a polimixina B. O BrCast considera resistentes amostras com CIMs acima de 2 µg/mL, enquanto que o CLSI, considera resistentes apenas CIMs maiores ou iguais a 8 µg/mL. Essa diferença de interpretação alteraria significativamente o perfil de resistência dos isolados incluídos neste estudo, caso a avaliação seguisse os critérios do BrCast. Os resultados das CIMs das amostras testadas estão descritos no Quadro 7.

Quadro 7 - Resultados das CIMs e das CBMs nos isolados de *P. aeruginosa*

| Amostra | Cefepime | Ciprofloxacino | Gentamicina | Imipenem | Polimixina |
|------------|----------|----------------|-------------|----------|------------|
| ATCC 27853 | 2 | 0,5 | 1 | 4 | 2 |
| PAO1 | 0,25 | 0,0625 | 1 | 128 | 4 |
| 1 | 32 | 16 | >1.024 | 1.024 | 4 |
| 2 | 2 | <0.625 | 1 | 2 | 8 |
| 3 | 2 | <0.625 | 1 | 2 | 4 |
| 4 | 2 | <0.625 | 2 | 2 | 8 |
| 5 | 8 | 16 | 1024 | 2 | 4 |
| 6 | <1 | 0,25 | 0,5 | 1 | 4 |
| 7 | 4 | <0,625 | 1 | 1.024 | 4 |
| 8 | 2 | <0,625 | 1 | 4 | 4 |
| 9 | 8 | 16 | 1.024 | 512 | 4 |
| 10 | 8 | 8 | 1.024 | 512 | 4 |

Legenda: Os valores da CIMs são em $\mu\text{g/mL}$ e o halo da disco difusão em milímetros. Os pontos de corte determinados pelo BrCast e CLSI para CIM (concentração inibitória mínima) dos antimicrobianos testados estão descritos respectivamente: Cefepime: BrCast – $S \leq 8$ e $R > 8$ e CLSI – $S \leq 8$, $I = 16$ e $R \geq 32$; Ciprofloxacino: BrCast – $S \leq 0,5$ e $R > 0,5$ e CLSI – $S \leq 1$, $I = 2$ e $R \geq 4$; Gentamicina: BrCast – $S \leq 4$ e $R > 4$ e CLSI – $S \leq 4$, $I = 8$ e $R \geq 16$; Imipenem: BrCast – $S \leq 4$, $I = 8$ e $R > 8$ e CLSI – $S \leq 8$, $I = 16$ e $R \geq 32$; e Polimixina B: BrCast – $S \leq 2$ e $R > 2$ e CLSI – $S \leq 2$, $I = 4$ e $R \geq 8$. Os pontos de corte determinados pelo BrCast e CLSI para disco difusão estão descritos respectivamente: Cefepime: BrCast - $S \geq 21$ e $R < 21$ e CLSI - $S \geq 18$, $I = 15-17$ e $R \leq 14$; Ciprofloxacino: BrCast - $S \geq 26$ e $R < 26$ e CLSI - $S \geq 21$, $I = 16-20$ e $R \leq 15$; Gentamicina: BrCast - $S \geq 15$ e $R < 15$ e CLSI - $S \geq 15$, $I = 13-14$ e $R \leq 12$; Imipenem: BrCast - $S \geq 20$, $I = 17-19$ e $R < 17$ e CLSI - $S \geq 19$, $I = 16-18$ e $R \leq 15$. Tanto BrCast quanto CLSI não recomendam a realização de disco difusão para polimixina B. As células grifadas em vermelho representam resistência, segundo BrCast e CLSI, as células grifadas em amarelo representam resistência apenas para os critérios definidos pelo BrCast. S: susceptível; I: intermediário; R: resistente; CIM: concentração inibitória mínima.

Fonte: Desenvolvido pela autora com base no BrCast e CLSI, 2018.

Realizou-se a comparação entre das metodologias de determinação da CIM, disco difusão e VITEK2 utilizados neste estudo. O antimicrobiano cefepime demonstrou discrepâncias quanto à comparação do BrCast e CLSI na disco difusão com os isolados 7 e 10. Estes são considerados resistentes pelo BrCast e susceptíveis pelo CLSI na disco difusão, ambos foram caracterizados como intermediários pelo VITEK2 e susceptíveis

pela CIM de acordo com ambos os critérios. O isolado 9, intermediário pelo VITEK2 e pela disco difusão conforme CLSI, foi susceptível pela disco difusão de acordo com o BrCast e pela CIM por ambos os critérios. Os antimicrobianos cefepime e imipenem apresentaram algumas discrepâncias (cefepime com o isolado 5 e imipenem com a cepa PAO1) entre CIM e disco difusão pelos dois critérios, e ainda entre o VITEK2 e os demais métodos, como observado no Quadro 8.

Quadro 8 - Comparação entre CIM, disco difusão e ViteK2 para os antimicrobianos cefepime, ciprofloxacino, gentamicina e imipenem (continua)

| Amostra | Cefepime | | | Ciprofloxacino | | | Gentamicina | | | Imipenem | | |
|-----------------------|---------------------|--------------------------|-------|-------------------|--------------------------|-------|--------------------|--------------------------|-------|---------------------|--------------------------|-------|
| | CIM | Disco Difusão | VITEK | CIM | Disco Difusão | VITEK | CIM | Disco Difusão | VITEK | CIM | Disco Difusão | VITEK |
| Ponto de corte BrCast | S≤8 R>8 | S≥21 R<21 | - | S≤0,5 R>0,5 | S≥26 R<26 | - | S≤4 R>4 | S≥15 R<15 | - | S≤4 I=8 R>8 | S≥20 I: 17-19 R<17 | - |
| Ponto de corte CLSI | S≤8 I=16 R≥32 | S≥18 I: 15-17 R<14 | - | S≤1 I=2 R≥4 | S≥21 I: 16-20 R≤15 | - | S≤4 I=8 R≥16 | S≥15 I: 13-14 R≤12 | - | S≤8 I=16 R≥32 | S≥19 I: 16-18 R≤15 | - |
| ATCC 27853 | 2 | 30 | - | 0,5 | 30 | - | 1 | 23 | - | 4 | 22 | - |
| PAO1 | 0,25 | 25 | - | 0,0625 | 35 | - | 1 | 15 | - | 128 | 24 | - |
| 1 | 32 | 7 | R | 16 | 7 | R | >1.024 | 7 | R | 1.024 | 7 | R |
| 2 | 2 | 27 | S | <0,0625 | 30 | R | 1 | 15 | R | 2 | 25 | R |
| 3 | 2 | 26 | R | <0,0625 | 28 | R | 1 | 16 | R | 2 | 25 | R |
| 4 | 2 | 26 | R | <0,0625 | 30 | R | 2 | 16 | R | 2 | 25 | R |
| 5 | 8 | 14 | S | 16 | 7 | R | 1.024 | 7 | R | 2 | 27 | S |
| 6 | <1 | 22 | S | 0,25 | 28 | S | 0,5 | 23 | S | 1 | 28 | I |

Quadro 8 - Comparação entre CIM, disco difusão e ViteK2 para os antimicrobianos cefepime, ciprofloxacino, gentamicina e imipenem (conclusão)

| Amostra | Cefepime | | | Ciprofloxacino | | | Gentamicina | | | Imipenem | | |
|---------|----------|----|---|----------------|----|---|-------------|----|---|----------|----|---|
| | | | | | | | | | | | | |
| 7 | 4 | 19 | I | <0,0625 | 30 | S | 1 | 16 | S | 1.024 | 10 | R |
| 8 | 2 | 26 | S | <0,0625 | 28 | S | 1 | 15 | S | 4 | 24 | R |
| 9 | 8 | 15 | I | 16 | 7 | R | 1.024 | 7 | R | 512 | 11 | R |
| 10 | 8 | 18 | I | 8 | 7 | R | 1.024 | 7 | R | 512 | 12 | R |

Legenda: Os valores da CIMs são em $\mu\text{g}/\text{mL}$ e o halo da disco difusão em milímetros. Os pontos de corte determinados pelo BrCast e CLSI para CIM (concentração inibitória mínima) dos antimicrobianos testados estão descritos respectivamente: Cefepime: BrCast – $S \leq 8$ e $R > 8$ e CLSI – $S \leq 8$, $I = 16$ e $R \geq 32$; Ciprofloxacino: BrCast – $S \leq 0,5$ e $R > 0,5$ e CLSI – $S \leq 1$, $I = 2$ e $R \geq 4$; Gentamicina: BrCast – $S \leq 4$ e $R > 4$ e CLSI – $S \leq 4$, $I = 8$ e $R \geq 16$; Imipenem: BrCast – $S \leq 4$, $I = 8$ e $R > 8$ e CLSI – $S \leq 8$, $I = 16$ e $R \geq 32$. Os pontos de corte determinados pelo BrCast e CLSI para disco difusão estão descritos respectivamente: Cefepime: BrCast - $S \geq 21$ e $R < 21$ e CLSI - $S \geq 18$, I : 15-17 e $R \leq 14$; Ciprofloxacino: BrCast - $S \geq 26$ e $R < 26$ e CLSI - $S \geq 21$, I : 16-20 e $R \leq 15$; Gentamicina: BrCast - $S \geq 15$ e $R < 15$ e CLSI - $S \geq 15$, I : 13-14 e $R \leq 12$ e Imipenem: BrCast - $S \geq 20$, I : 17-19 e $R < 17$ e CLSI - $S \geq 19$, I : 16-18 e $R \leq 15$. Tanto BrCast quanto CLSI não recomendam a realização de disco difusão para polimixina B, por este motivo este antimicrobiano não está descrito no quadro. As células grifadas em azul representam susceptibilidade, em verde representam resistência intermediária, em vermelho representam resistência, segundo BrCast e CLSI, as células grifadas em amarelo representam resistência apenas para os critérios definidos pelo BrCast. S: susceptível; I: intermediário; R: resistente; CIM: concentração inibitória mínima.

Fonte: Desenvolvido pela autora com base no BrCast e CLSI, 2018.

5.3 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE BOMBAS DE EFLUXO

A CIM de todas as amostras na presença do inibidor de efluxo PAbetaN teve uma redução significativa em comparação ao mesmo ensaio sem o inibidor de efluxo para todos os antimicrobianos testados, demonstrando o papel fundamental das bombas de efluxo na resistência de *P. aeruginosa* para várias classes de antimicrobianos (Figura 16).

Figura 16 - Gráfico da CIM de todas as amostras com e sem inibidor por antimicrobiano (continua)

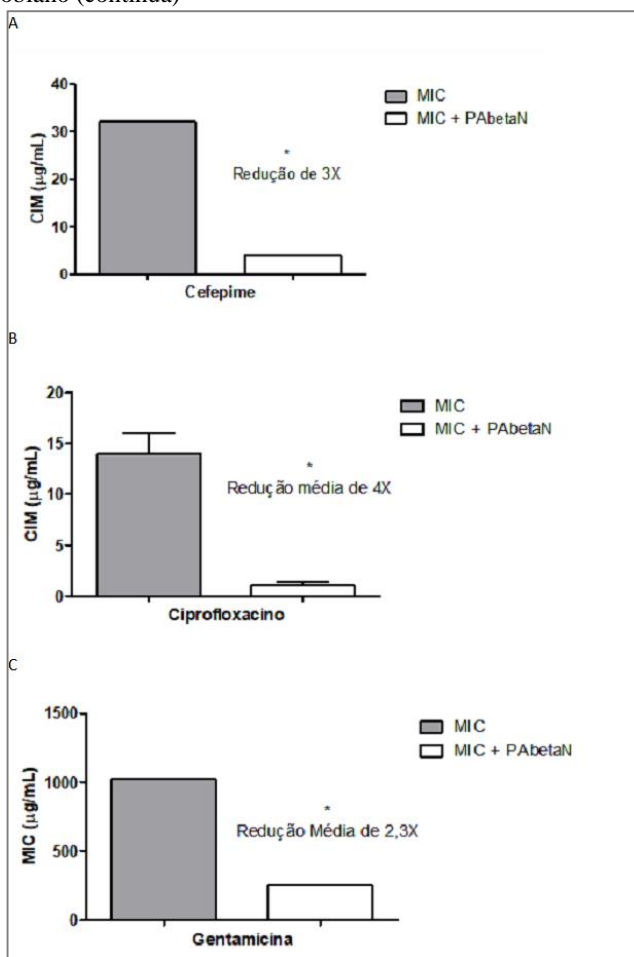
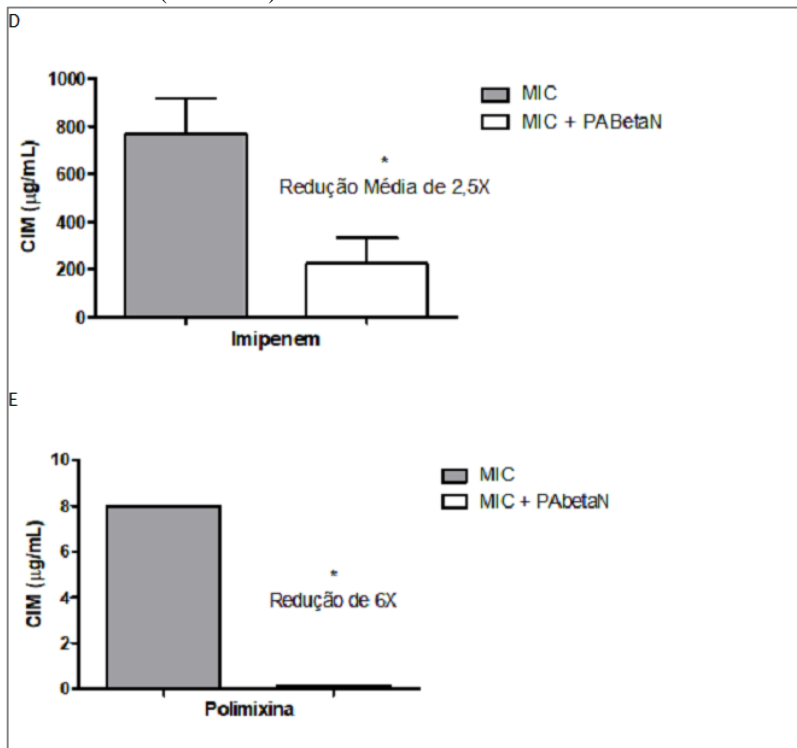


Figura 16 - Gráfico da CIM de todas as amostras com e sem inibidor por antimicrobiano (conclusão)



Legenda: (A) CIM sem e com inibidor PABetaN com cefepime; (B) CIM sem e com inibidor PABetaN com ciprofloxacino; (C) CIM sem e com inibidor PABetaN com gentamicina; (D) CIM sem e com inibidor PABetaN com imipenem; (E) CIM sem e com inibidor PABetaN com Polimixina B. Os gráficos representam a média das triplicatas biológicas. As barras representam o erro relativo. Diferenças estatísticas entre as amostras estão indicadas pelo asterisco ($p \leq 0,05$).

Fonte: desenvolvido pela autora, 2018.

Na presença do inibidor de efluxo, a CIM do imipenem apresentou uma redução de 2 a 3 vezes, da polimixina B houve redução da CIM em 6 vezes, do ciprofloxacino houve uma redução de 3 a 5 vezes, do cefepime houve uma redução de 3 vezes e da gentamicina a redução da CIM foi de 2 a 3 vezes, de acordo com a Figura 17.

Figura 17 - Gráfico da CIM de todas as amostras com e sem inibidor por antimicrobiano

| A - Cefepime | | | | D - Imipenem | | | |
|--------------|-----|-------------|---------|--------------|--------|-------------|---------|
| AMOSTRAS | CPM | CPM+PAbetaN | REDUÇÃO | AMOSTRAS | IPM | IPM+PAbetaN | REDUÇÃO |
| 1 | 32 | 4 | 3X | 1 | >1.024 | 512 | >2X |
| | | | | 7 | 1.024 | 256 | 2X |
| | | | | 9 | 512 | 64 | 3X |
| | | | | 10 | 512 | 64 | 3X |

| B - Ciprofloxacino | | | |
|--------------------|-----|-------------|---------|
| AMOSTRAS | CIP | CIP+PAbetaN | REDUÇÃO |
| 1 | 16 | 2 | 3X |
| 5 | 16 | 1 | 4X |
| 9 | 16 | 0,5 | 5X |
| 10 | 8 | 0,5 | 4X |

| C - Gentamicina | | | |
|-----------------|--------|-------------|---------|
| AMOSTRAS | GEN | GEN+PAbetaN | REDUÇÃO |
| 1 | >1.024 | 256 | >3X |
| 5 | 1.024 | 256 | 2X |
| 9 | 1.024 | 256 | 2X |
| 10 | 1.024 | 256 | 2X |

| E - Polimixina | | | |
|----------------|-----|-------------|---------|
| AMOSTRAS | POL | POL+PAbetaN | REDUÇÃO |
| 2 | 8 | 0,125 | 6X |
| 4 | 8 | 0,125 | 6X |

Legenda: (A) CIM sem e com inibidor PAbetaN com cefepime; (B) CIM sem e com inibidor PAbetaN com ciprofloxacino; (C) CIM sem e com inibidor PAbetaN com gentamicina; (D) CIM sem e com inibidor PAbetaN com imipenem; (E) CIM sem e com inibidor PAbetaN com Polimixina B. Os resultados representam a média das triplicatas biológicas.

Fonte: desenvolvido pela autora, 2018.

5.4 ANÁLISE DA FORMAÇÃO DE BIOFILME

Os resultados do teste de formação de biofilme dos 52 isolados de *Pseudomonas* spp. testados estão descritos na Quadro 9.

Quadro 9 - Resultados da análise da formação de biofilme, espécie, perfil de resistência e local de coleta dos isolados (continua)

| AMOSTRA | ESPÉCIE | BIOFILME | RESISTÊNCIA | SÍTIO ANATÔMICO/LOCAL |
|---------|----------------------|----------|-------------|----------------------------|
| 1 | <i>P. aeruginosa</i> | Grupo 1 | Resistente | Retal |
| 2 | <i>P. aeruginosa</i> | Grupo 1 | Resistente | Mãos |
| 3 | <i>P. aeruginosa</i> | Grupo 1 | Resistente | Nasal |
| 4 | <i>P. aeruginosa</i> | Grupo 2 | Resistente | Retal |
| 5 | <i>P. aeruginosa</i> | Grupo 2 | Resistente | Retal |
| 6 | <i>P. aeruginosa</i> | Grupo 2 | Resistente | Retal |
| 7 | <i>P. aeruginosa</i> | Grupo 1 | Resistente | Retal |
| 8 | <i>P. aeruginosa</i> | Grupo 1 | Resistente | Nasal |
| 9 | <i>P. aeruginosa</i> | Grupo 2 | Resistente | Retal |
| 10 | <i>P. aeruginosa</i> | Grupo 2 | Resistente | Nasal |
| 11 | <i>P. putida</i> | Grupo 1 | Sensível | Posto de Enfermagem |
| 12 | <i>P. putida</i> | Grupo 1 | Sensível | Equipamentos |
| 13 | <i>P. luteola</i> | Grupo 1 | Sensível | Suporte Utensílios |
| 14 | <i>P. aeruginosa</i> | Grupo 2 | Sensível | Retal |
| 15 | <i>P. aeruginosa</i> | Grupo 1 | Sensível | Retal |
| 16 | <i>P. stutzeri</i> | Grupo 1 | Sensível | Posto de Enfermagem |
| 17 | <i>P. stutzeri</i> | Grupo 1 | Sensível | Sala Repouso Enfermagem |
| 18 | <i>P. stutzeri</i> | Grupo 2 | Sensível | Sala Repouso Enfermagem |
| 19 | <i>P. putida</i> | Grupo 1 | Sensível | Sala de Medicamentos |
| 20 | <i>P. stutzeri</i> | Grupo 2 | Sensível | Sala Repouso Enfermagem |
| 21 | <i>P. stutzeri</i> | Grupo 1 | Sensível | Sala Repouso Enfermagem |
| 22 | <i>P. aeruginosa</i> | Grupo 1 | Sensível | Retal |
| 23 | <i>P. aeruginosa</i> | Grupo 1 | Sensível | Retal |
| 24 | <i>P. putida</i> | Grupo 1 | Sensível | Sala Repouso Enfermagem |
| 25 | <i>P. putida</i> | Grupo 1 | Sensível | Mãos |

Quadro 9 - Resultados da análise da formação de biofilme, espécie, perfil de resistência e local de coleta dos isolados (conclusão)

| AMOSTRA | ESPÉCIE | BIOFILME | RESISTÊNCIA | SÍTIO ANATÔMICO/LOCAL |
|---------|-------------------------|----------|-------------|----------------------------|
| 26 | <i>P. stutzeri</i> | Grupo 2 | Sensível | Mesa Computador |
| 27 | <i>P. aeruginosa</i> | Grupo 2 | Sensível | Retal |
| 28 | <i>P. aeruginosa</i> | Grupo 2 | Sensível | Retal |
| 29 | <i>P. aeruginosa</i> | Grupo 2 | Sensível | Nasal |
| 30 | <i>P. putida</i> | Grupo 1 | Sensível | Banheiro |
| 31 | <i>P. stutzeri</i> | Grupo 1 | Sensível | Posto de Enfermagem |
| 32 | <i>P. stutzeri</i> | Grupo 1 | Sensível | Posto de Enfermagem |
| 33 | <i>P. aeruginosa</i> | Grupo 2 | Sensível | Retal |
| 34 | <i>P. aeruginosa</i> | Grupo 1 | Sensível | Retal |
| 35 | <i>P. stutzeri</i> | Grupo 1 | Sensível | Grades do Leito |
| 36 | <i>P. stutzeri</i> | Grupo 1 | Sensível | Sala Repouso Enfermagem |
| 37 | <i>P. aeruginosa</i> | Grupo 1 | Sensível | Sala de Medicamentos |
| 38 | <i>P. aeruginosa</i> | Grupo 1 | Sensível | Retal |
| 39 | <i>P. aeruginosa</i> | Grupo 1 | Sensível | Retal |
| 40 | <i>P. aeruginosa</i> | Grupo 1 | Sensível | Banheiro |
| 41 | <i>P. aeruginosa</i> | Grupo 2 | Sensível | Banheiro |
| 42 | <i>P. aeruginosa</i> | Grupo 2 | Sensível | Retal |
| 43 | <i>P. putida</i> | Grupo 2 | Sensível | Celular |
| 44 | <i>P. aeruginosa</i> | Grupo 1 | Sensível | Leito |
| 45 | <i>P. oryzihabitans</i> | Grupo 1 | Sensível | Raio X |
| 46 | <i>P. aeruginosa</i> | Grupo 2 | Sensível | Retal |
| 47 | <i>P. aeruginosa</i> | Grupo 2 | Sensível | Retal |
| 48 | <i>P. aeruginosa</i> | Grupo 1 | Sensível | Banheiro |
| 49 | <i>P. aeruginosa</i> | Grupo 1 | Sensível | Retal |
| 50 | <i>P. aeruginosa</i> | Grupo 2 | Sensível | Retal |
| 51 | <i>P. putida</i> | Grupo 1 | Sensível | Jaleco |
| 52 | <i>P. aeruginosa</i> | Grupo 2 | Sensível | Termômetro |

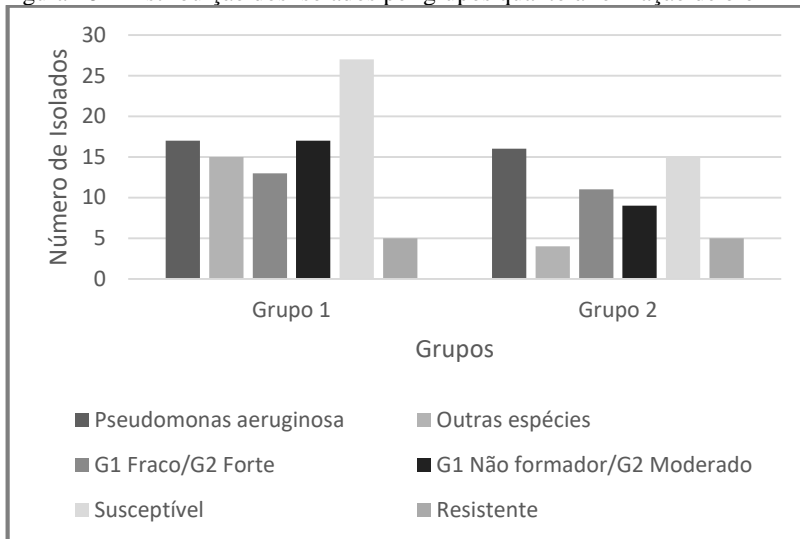
Legenda: Perfil dos isolados de *Pseudomonas* spp. quanto à espécie, capacidade de formação de biofilme, perfil de resistência e local de coleta. Grupo 1: Não

formadores e Fracamente formadores de Biofilme; Grupo 2: Moderadamente formadores e Fortemente formadores de biofilme.

Fonte: desenvolvido pela autora.

Dentre as amostras testadas, 19 (36,5%) eram não formadoras de biofilme, 13 (25%) eram fracamente formadoras, 9 (17,3%) formavam biofilme moderadamente e 11 (21,1%) eram fortes formadoras de biofilme, conforme Figura 18. Como não houve diferença significativa entre os grupos, as amostras foram agrupadas em 2 grupos: 1) não formadores ou fracamente formadores de biofilme (n=32) e 2) formadores moderados ou fortes de biofilme (n=20).

Figura 18 - Distribuição dos isolados por grupos quanto à formação de biofilme



Legenda: Os isolados foram separados por grupos quanto à formação de biofilme: Grupo 1: Não formadores e Fracamente formadores de Biofilme; Grupo 2: Moderadamente formadores e Fortemente formadores de biofilme. Em cada grupo foi avaliado a espécie, resistência e capacidade de formação de biofilme, sendo que para a coluna destacada em preto G1 Não formador e G1 fraco se referem a essas características apenas para o grupo 1 e G2 moderado e G2 Forte se referem a essas características apenas para o grupo 2. G1: grupo 1; G2: grupo 2.

Fonte: desenvolvido pela autora, 2018.

Dentre os isolados do Grupo 1 (Não formadores e Fracamente formadores de Biofilme), 5 amostras (15,60%) eram resistentes e 27

sensíveis (84,38). Quanto ao local de coleta, 19 amostras (59,37%) foram provenientes do ambiente hospitalar: 3 amostras do banheiro (dispensador do sabonete líquido, torneira ou descarga), 1 amostra do aparelho de raio-X, 4 amostras do posto de enfermagem (bancada, computador ou telefone), 1 amostra do jaleco do profissional da saúde, 1 amostra do leito (quarto), 1 amostra da grade do leito, 1 amostra dos equipamentos de uso comum, 2 amostras da sala de medicamentos, 4 amostras da sala de repouso da enfermagem e 1 amostra do suporte de utensílios. Ainda foram observadas que 13 amostras (40,62%) provinham dos pacientes: 2 amostras de *swab* de mãos, 2 amostras de *swab* nasal e 9 amostras de *swab* retal. Observou-se ainda 16 amostras (50,0%) pertenciam a espécie *P. aeruginosa* e 16 amostras (50,0%) foram de outras espécies, sendo que 1 amostra *P. oryzihabitans*, 7 *P. stutzeri*, 1 amostra *P. luteola* e 7 amostras de *P. putida*.

Os isolados do Grupo 2 (Moderadamente formadores e Fortemente formadores de biofilme) eram compostos por 5 (25%) amostras resistentes e 15 (75%) amostras sensíveis. Apenas 6 (30%) amostras foram ambientais, estando presentes 1 no celular do profissional da saúde e 2 sala de repouso da enfermagem (cama, mesa ou cadeira), 1 amostra do banheiro (dispenser do sabonete líquido, torneira ou descarga), 1 do termômetro e 1 do posto de enfermagem (bancada, computador ou telefone). Das 14 (70%) amostras isoladas de paciente, 2 foi de *swab* nasal e 12 foram de *swab* retal. Dentre as espécies, foi isolada 1 *P. putida*, 3 *P. stutzeri* 16 *P. aeruginosa*.

6 DISCUSSÃO

P. aeruginosa possuem diversos mecanismos de resistência que reduzem as opções terapêuticas, aumentam a mortalidade e morbidade dos pacientes e acarretam um alto custo para o sistema de saúde. Alguns destes mecanismos de resistência são intrínsecos, entretanto, mutações e aquisição de genes de resistência podem tornar estes patógenos ainda mais resistentes.

A perda de porinas impede a passagem dos antimicrobianos pela parede bacteriana e a superexpressão de bombas de efluxo favorece sua extrusão, impedindo desta maneira sua ação. A capacidade de formação de biofilmes e produção de diversos fatores de virulência regulados pelo sistema QS, aumentam a capacidade de defesa destes patógenos e os tornam de difícil eliminação e tratamento (MORADALI; GHODS; REHM, 2017).

Devido a essa problemática, o presente projeto avaliou alguns mecanismos de resistência em *P. aeruginosa* de isolados provenientes de coletas realizadas no período de março a outubro de 2015, em cinco alas do hospital: UTI, EMG, CC, CRI e CMI do HU/UFSC.

6.1 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS (TSA)

Estes ensaios foram realizados com os 13 isolados de *Pseudomonas* spp. que apresentaram algum grau de resistência a um dos antimicrobianos na determinação realizada pelo Vitek2®. Selecionou-se ainda isolados que tiveram identificadas alguma enzima hidrolítica na determinação de qPCR, realizados previamente a este trabalho.

As amostras 11 e 12 de *P. putida*, apresentaram-se resistente e suscetível, respectivamente à piperacilina com tazobactam, contrariando o resultado de susceptibilidade intermediária apresentada pelo resultado do Vitek2®. A amostra 13 de *P. luteola*, mesmo sendo portadora da enzima SHV, mostrou-se suscetível a todos os antimicrobianos independente do critério de interpretação utilizado (CLSI ou BrCast), exceto ao aztreonam, ao qual foi resistente.

Em casos de isolados clínicos, *P. luteola*, geralmente é resistente a cefalosporinas de primeira e segunda geração, mas suscetível a cefalosporinas de terceira geração, aminoglicosídeos, ureidopenicilinas e ciprofloxacino (DOUBLET et al., 2010; OTTO et al., 2013). Deve-se atentar para a presença de enzimas de hidrólise em uma amostra

ambiental, visto que estas podem servir de reservatório de genes de resistência para transferência via elementos genéticos móveis para espécies patogênicas (OTTO et al., 2013).

Entre os isolados de *P. aeruginosa*, 4 (40%) foram resistentes ao ciprofloxacino. Estudo realizado com isolados hospitalares no Iran, mostrou uma variação no perfil de resistência ao ciprofloxacino entre 35 e 85% (TOHIDPOUR et al., 2009; ADABI et al., 2015). Apenas 2 isolados foram resistentes às cefalosporinas: 1 isolado foi resistente a ceftazidima e outro à ceftazidima e ao cefepime. Este achado é importante, visto que vem ocorrendo um aumento de *P. aeruginosa* resistente a cefalosporinas de terceira geração, inclusive em isolados da comunidade, como mostra um estudo realizado em supermercados na Austrália em 2014. Foram coletadas amostras de frango cru e costelas de porco em 26 supermercados e 4 açougues. De um total de 120 amostras, cerca de 93% dos isolados poderiam estar contaminados com bactérias resistentes a cefalosporinas de terceira geração, visto que cresceram em meio específico; destes, 13% eram de *P. aeruginosa*. Ainda, 57% dos isolados apresentaram resistência a mais de uma classe de antimicrobianos e 6%, a mais de 3 classes de antimicrobianos (MCLELLAN et al., 2018).

O isolado 1, resistente às cefalosporinas, apresentou resistência aos demais antimicrobianos testados, exceto à piperacilina com tazobactam e aztreonam, para os quais demonstrou um perfil de resistência intermediária. Este isolado é portador da enzima SPM, o que pode justificar a elevada resistência aos carbapenêmicos (POTRON; POIREL; NORDMANN, 2015). Contudo, acredita-se que este não seja o único mecanismo de resistência contra os carbapenêmicos, pois na determinação da CIM com o inibidor de efluxo PAbetaN, houve significativa redução da resistência. Cerca de 40% dos isolados apresentaram resistência aos carbapenêmicos. A resistência aos carbapenêmicos mediada por superexpressão de bombas de efluxo tem sido reportada em diversos estudos. Um estudo realizado com 50 amostras clínicas em 2014, identificou 35 isolados resistentes a meropenem, destes, 71% apresentavam superexpressão de *mexB* (TERZI; KULAH; CIFTCI, 2014). Chalhoub e colaboradores confirmaram que a superexpressão de *mexAB-OprM* associada a inativação de *OprD* conferiu elevada resistência a meropenem em amostras clínicas (CHALHOUB et al., 2016). A superexpressão de *MexEF-OprN* e *MexAB-OprM* foram relacionadas com a resistência a imipenem e meropenem, respectivamente em isolados de *P. aeruginosa* coletados de animais (HAENNI et al., 2017).

A resistência aos aminoglicosídeos variou entre 30% para amicacina e 40% para gentamicina. Resistência a estes antimicrobianos vem sendo relacionada com o sistema de efluxo MexXY-OprM há algum tempo, especialmente em isolados não produtores de beta-lactamases (MAO et al., 2001; POONSUK; TRIBUDDHARAT; CHUANHUEN, 2014).

Neste estudo, a maior parte dos resultados foram concordantes entre as duas metodologias, mas algumas discrepâncias foram identificadas nos resultados do TSA pelo Vitek2® em comparação com a disco difusão, como observado nas amostras 2, 3 e 4. Contudo, na clínica, a identificação e determinação do perfil de susceptibilidade pelo Vitek2® é recomendado para prevenir falhas terapêuticas em *Pseudomonas* spp. MDR (STOKKOU, 2015), visto que o resultado do TSA é mais rápido do que pelo método de disco difusão. Entretanto estudos mostram que podem ocorrer variações nos resultados do Vitek2® em relação à disco difusão (SAPINO et al., 2012; STOKKOU et al., 2015). O desempenho do Vitek2® tem-se demonstrado limitado com meropenem, ceftazidima e piperacilina-tazobactam contra *P. aeruginosa* (STOKKOU et al., 2015).

A marca dos antimicrobianos também pode ser fator de variação. Os discos de antimicrobianos da marca Cecon, utilizados nos ensaios, foram submetidos a testes de controle de qualidade e comparados com outras marcas nacionais, obtendo o melhor resultado entre os testados (SEJAS et al, 2003).

Entre os critérios de avaliação determinados pelo BrCast e CLSI, observamos discrepâncias principalmente quanto ao resultado do cefepime (30%), em que os pontos de corte são consideravelmente diferentes (BrCast: $S \geq 21$ e $R < 21$ e CLSI: $S \geq 18$, I: 15 – 20 e $R < 14$), o que acarretaria em modificação do perfil de resistência para susceptibilidade, respectivamente.

Na avaliação de Piperacilina-tazobactam (BrCast: $S \geq 18$ e $R < 18$ e CLSI: $S \geq 21$, I: 15 – 20 e $R < 14$) não podemos comparar pois o conteúdo de antimicrobianos nos discos do BrCast é diferente do CLSI.

Ocorreu discrepância na avaliação de 1 isolado, quanto ao perfil do imipenem, com variação de resistente, segundo BrCast para intermediária, CLSI. A avaliação dos resultados pelos critérios do BrCast não teriam feito diferença quanto às discrepâncias observadas em relação ao Vitek2. Contudo, a discrepância observada no perfil da amostra 4 (resistente pelo Vitek2), não é observada quando se utiliza a avaliação do BrCast, visto que os resultados são concordantes. As diferenças nos critérios de avaliação realizado pelos dois institutos de referência são

preocupantes principalmente quando ocorre modificação no perfil de susceptibilidade em que isolados considerados sensíveis por um critério se tornam resistentes quando avaliado pelo outro. Essas discrepâncias reforçam a necessidade de critérios específicos para a realidade brasileira e que, nos casos discrepantes, os laboratórios ponderem junto ao corpo clínico a melhor alternativa terapêutica.

6.2 DETERMINAÇÃO DA CIM NA AUSÊNCIA E PRESENÇA DO INIBIDOR DE EFLUXO PAbetaN

A determinação da CIM foi realizada com todos os isolados que apresentaram resistência aos antimicrobianos selecionados para estes ensaios. Observou-se a concordância dos resultados da CIM por microdiluição em caldo com o método de disco difusão. Os ensaios com inibidor de efluxo resultaram em redução significativa da CIM para todos os antimicrobianos testados, comprovando fenotipicamente a superexpressão de bombas de efluxo nas amostras testadas.

As amostras 1, 7, 9 e 10 apresentaram alta resistência ao imipenem, com resultados de CIM acima de 512 µg/mL e demonstraram redução de 2 a 3x nas CIMs quando expostas ao inibidor de efluxo. Mesmo com a significativa redução da resistência, estes isolados ainda apresentaram resistência com CIMs variando entre 64 e 512 µg/mL. A amostra 1, portadora do gene SPM, apresentou as maiores CIMs (> 1.024 µg/mL sem o inibidor e 512 µg/mL com o inibidor), a redução da resistência foi significativa, contudo, ainda elevada, o que mostra que a ação da SPM está envolvida no processo de resistência neste isolado. Em *P. aeruginosa* a bomba de efluxo responsável pela extrusão de imipenem é MexEF-OprN (KOHLENER et al., 1999).

Os resultados descritos apontam para a superexpressão desta bomba. A amostra 1, portadora de SPM, demonstrou redução em 2x na CIM do imipenem, o que indica que além da ação enzimática, bombas de efluxo MexEF-OprN estão contribuindo para a resistência deste isolado (MASEDA; UWATE; NAKAE, 2010), embora possa estar concomitantemente relacionada redução na expressão de porinas OprD (KIM et al., 2016). A associação destes mecanismos de resistência pode justificar a elevada CIM (1.024 µg/mL).

Quanto à gentamicina, as amostras 1, 5 e 9 apresentaram CIMs elevadas, de no mínimo 1.024 µg/mL. Com associação do antimicrobiano a PAbetaN as CIMs reduziram de 2 a 3x. O perfil de resistência mais interessante foi o da amostra 1. Esta amostra apresentou elevada CIM,

acima de 1.024 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (devido a limitações relacionadas à disponibilidade de maiores concentrações do antimicrobiano a CIM exata para este antimicrobiano não foi determinada). A CIM de gentamicina com PAbetaN foi de 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$, o que indica uma redução maior do que 3x e relaciona fortemente a resistência a este antimicrobiano com a superexpressão da bomba MexXY-OprM (MAO et al., 2001; POONSUK; TRIBUDDHARAT; CHUANCHUEN, 2013, 2014).

Em relação às cefalosporinas, a amostra 1 foi a única que demonstrou resistência ao cefepime, com CIM de 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$. De acordo com estudos realizado por Cabot e colaboradores, a resistência ao cefepime pode estar associada à superexpressão cromossomal de AmpC, contudo, acarretaria também em aumento da resistência ao aztreonam e à piperacilina com tazobactam, o que não ocorre nesta amostra (CABOT et al., 2016). A redução da CIM com o inibidor de efluxo foi de 3x (4 $\mu\text{g}/\text{mL}$), ratificando a superexpressão de MexXY-OprM e sugere a possibilidade de superexpressão de MexCD-OprJ associada (JEANNOT et al., 2008; TERZI; KULAH; CIFTCI, 2014).

Estudos realizados por Goli e colaboradores em 2016, mostram que as fluoroquinolonas são os antimicrobianos mais eficazes para a determinação das bombas de efluxo MexAB-OprM e MexXY-OprM. Os isolados testados com PAbetaN com ciprofloxacino apresentaram redução de CIM maior do 4x. Estes isolados apresentavam superexpressão dos genes *mexB* e *mexY* confirmada por RT-qPCR (GOLI et al., 2016).

A redução da CIM com o inibidor de efluxo e ciprofloxacino foi de 3x (de 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Estes resultados são condizentes com os obtidos no presente estudo, visto um maior número de amostras (50%) foram resistentes ao ciprofloxacino em relação aos outros antimicrobianos testados e a redução da resistência foram maiores com PAbetaN e este antimicrobiano (de 3 a 5X) em relação aos demais, exceto polimixina B.

Mutações no gene *nfxB*, regulador positivo da expressão de MexCD-OprJ têm sido relacionados ao isolados resistentes a ciprofloxacino (PENG et al., 2017). Contudo, este antimicrobiano é substrato para todas as bombas de efluxo expressas em *P. aeruginosa* e a resistência pode estar relaciona a todas ou qualquer uma delas (CABOT et al., 2016; GOLI et al., 2016).

As amostras 2 e 4 foram resistentes apenas à polimixina B, ambas com CIM de 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Com o teste utilizando o inibidor de efluxo, houve uma redução de 6x na CIM, com resultado de 0,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Em geral, *P.*

aeruginosa apresentam susceptibilidade à polimixina B no Brasil (ARAIIS et al., 2016; RIBEIRO et al., 2016) e no mundo, sendo este o fármaco de última escolha usado para o tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa* resistentes (OBUOBI et al., 2018). Estudos realizados por Masuda e colaboradores em 2000 demonstraram que polimixina B não é substrato para nenhuma bomba de efluxo descrita em *P. aeruginosa* (MASUDA et al., 2000). Contudo, a polimixina B em dosagens subclínicas foi capaz de induzir a expressão de MexCD-OprJ em mutantes sem estes genes (FRAUD et al., 2008).

Observou-se o aumento do nível de expressão de *mexA* em partes metabolicamente ativas de biofilmes maduros quando expostos à colistina. Este fato sugere que MexAB-OprM pode contribuir para a tolerância dos biofilmes cultivados em câmara de fluxo à colistina, o que causa estranheza já que as polimixinas (colistina e polimixina B) não parecem ser transportadas por esta bomba (LI; PLESIAT; NIKAIDO, 2015). O isolado 4, resistente a polimixina B, foi capaz de formar biofilmes moderadamente. Contudo, o isolado 2, também resistente a este antimicrobiano, foi fracamente formador de biofilme.

Devido à baixa ocorrência de *P. aeruginosa* resistentes à polimixina B avaliou-se a possível presença do gene *mcr-1* nestes isolados por PCR. Este gene é carregado por plasmídeos e promove resistência à polimixina B, reduzindo drasticamente as opções terapêuticas para bactérias com perfil MDR (HASMÁN et al., 2015). Entretanto, o gene *mcr-1* não foi detectado nas amostras analisadas (dados não mostrados). Este resultado é concordante com diversas pesquisas do gene *mcr-1* em *P. aeruginosa* (HASMÁN et al., 2015; LIU et al., 2016; PEDERSEN et al., 2017).

Para a confirmação da superexpressão das bombas de efluxo envolvidas na resistência destes isolados deve-se realizar uma análise de RT-qPCR. Esta análise foi iniciada durante a execução deste trabalho, contudo não houve tempo hábil para a conclusão da padronização de todos os processos. Até o momento definiu-se os iniciadores que seriam utilizados para avaliar a expressão dos genes *mexB*, *mexD*, *mexF*, *mexY*, e *oprD*, gene de porina de membrana externa. Os genes de referência selecionados foram *rpsL*, *proC* e *rpoD*. As seqüências de todos os iniciadores foram retiradas da literatura e adaptadas utilizando o programa *Primer Select* versão 3.0.25, sendo, em seguida, avaliadas quanto a especificidade por meio da ferramenta *PrimerBlast* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), disponível no site *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genban/>) (Quadro 10).

Quadro 10 - Iniciadores selecionados para a realização da análise de expressão gênica

| GENE | INICIADOR | SEQUÊNCIA | TAMANHO (pb) | REFERÊNCIA |
|-------------|------------------|--|--------------|----------------|
| <i>mexB</i> | mexB-F mexB-R | 5'-ACCAAGGGCGTCGGTACTTC-3' 5'-CTGGGAACCGTCGGGATTGAC-3' | 273 | Terzi, 2014 |
| <i>mexD</i> | mexD-F mexD-R | 5'-CAGGAGTTCGGCCAGGTAGTGCT-3' 5'-GAGGTGTCGTAGGGCACGCTGTA-3' | 260 | Terzi, 2014 |
| <i>mexF</i> | mexF-F mexF-R | 5'-GCCTGGTCACCGAGGAAGAGTTC-3' 5'-TGCTTCAGCTCGGCCATCTTCT-3' | 229 | Terzi, 2014 |
| <i>mexY</i> | mexY-F mexY-R | 5'-ACCCGCTACAACGGCTATCCCT-3' 5'-ATCGACCAGCTTTCGTAGAGGGC-3' | 244 | Xavier, 2010 |
| <i>oprD</i> | oprD-F oprD-R | 5'-CGGGCGAGGATGGCAAGCA-3' 5'-GGCGGATGCGGAACGACA-3' | 244 | Xavier, 2010 |
| <i>proC</i> | proC-F proC-R | 5'-GTCAGGCGCGAGGCTGTCT-3' 5'-GGCCGGCAGTTGCTGTCT-3' | 92 | Quale, 2006 |
| <i>rpoD</i> | rpoD-F rpoD-R | 5'-CCAGGTGGCGTAGGTGGAGAAC-3' 5'-CGGGCGAAGAAGGAAATGGTC-3' | 180 | Kolayli, 2004 |
| <i>rpsL</i> | rpsL-F rpsL-R | 5'-CGCTGTGCTCTTGCAGGTTGTG-3' 5'-CAAGAGCGACGTGCCTGCG-3' | 185 | Olivares, 2014 |

Fonte: Desenvolvido pela autora, 2017.

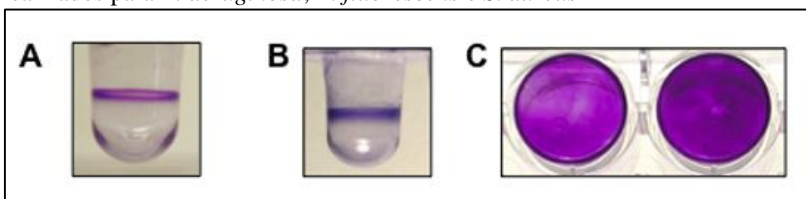
Os iniciadores foram testados com o DNA extraído das amostras e houve a amplificação dos genes de interesse, entretanto as etapas de purificação do RNA, transcrição do cDNA e qPCR precisam ser adequadamente padronizadas, o que não foi possível no período disponível para o mestrado. As análises serão finalizadas para a publicação.

6.3 CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME DOS ISOLADOS

O gênero *Pseudomonas* possui grande capacidade de formação de biofilmes que aumentam sua persistência em superfícies, tecidos vivos e dificultam a ação de antimicrobianos no tratamento de infecções causadas por estes agentes. Por este motivo são de extrema importância como causa de infecções hospitalares no Brasil e no mundo.

Pseudomonas spp., por serem bactérias móveis, formam biofilme na interface ar-líquido, comparado a de outras bactérias como *S. aureus*, em que a formação do biofilme ocorre exclusivamente no fundo do poço, a exemplo da representação da Figura 19 (OTOOLE, 2011). Na metodologia utilizada por O'Toole, após a etapa de secagem do biofilme corado com cristal violeta, é realizada a solubilização do mesmo com ácido acético e posterior leitura da densidade ótica do biofilme solubilizado.

Figura 19- Resultado representativo para os ensaios de formação de biofilmes realizados para *P. aeruginosa*, *P. fluorescens* e *S. aureus*



Legenda: (A) Uma vista lateral do poço com um biofilme de *P. aeruginosa* (8 horas, 37 ° C). (B) Uma vista lateral do poço com um biofilme de *P. fluorescens* (6 h, 30 ° C). (C) Uma visão de cima para baixo do biofilme formado por *S. aureus* em uma placa de microtitulação de fundo plano (dois poços, 24 h, 37 ° C).
Fonte: O'TOOLE, 2011.

A característica de *Pseudomonas* spp. de formar biofilme na interface ar-líquido devido a sua mobilidade, pode ter dificultado a análise pela metodologia adotada, visto que ao retirar as células planctônicas parte do biofilme aderiu às paredes dos poços e não apenas no fundo, onde foi feita a leitura da DO. Na metodologia utilizada por O'Toole em 2011, foi realizada a dissolução do biofilme aderido ao poço e posteriormente a leitura da DO.

Entretanto, diversos estudos recentes adotam a metodologia utilizada neste trabalho, com a realização da leitura da DO do biofilme seco corado com cristal violeta e aderido ao fundo do poço (COMIN et al., 2016; KALIA et al., 2018; SEGEV-ZARKO et al., 2018). Outros estudos realizados com *P. aeruginosa* de origem clínica também mostraram variação na classificação da formação de biofilme de acordo com as metodologias de detecção utilizadas (FONSECA et al., 2004; FONSECA et al., 2007). As metodologias diferem principalmente em relação aos meios de cultura utilizados, no tempo de formação do biofilme, no corante, no tempo de coloração e na interpretação dos resultados.

Um estudo realizado em 2008 comparando métodos de quantificação da produção de biofilme utilizando placas de poliestireno, avaliou seis metodologias quanto a sua repetibilidade e aplicabilidade para a quantificação de biofilmes formados em placa de microtitulação em várias espécies bacterianas, inclusive *P. aeruginosa*. A maior parte dos ensaios mostrou uma excelente aplicabilidade para a quantificação de biofilmes. A repetibilidade da maioria dos ensaios foi alta, apresentando poucas variações entre os resultados médios obtidos. Além disso, a maioria dos ensaios são simples, rápidos e adequados para quantificação de alto teor de biofilmes crescidos em uma placa de microtitulação. (PEETERS, NELIS & COENYE, 2008).

A análise da formação de biofilme em relação à espécie do isolado foi realizada entre *P. aeruginosa* e *Pseudomonas* spp. de outras espécies. Verificou-se que houve prevalência na formação de biofilme pelas espécies de *P. aeruginosa* em relação às demais espécies, sendo que em biofilmes moderados e fortes 80% dos formadores pertenciam a esta espécie.

Verificou-se que 70% das amostras formadoras de biofilme moderados ou fortes foram isoladas de pacientes e apenas 30% foram provenientes do ambiente hospitalar. Entre as não formadoras ou fracamente formadoras de biofilme, a predominância foi do ambiente hospitalar, com 59,4% dos isolados em relação ao número de isolados em pacientes, 40,6%. A obtenção destes resultados pode ser relacionada ao estímulo da formação de biofilmes pela exposição da bactéria a situações de estresse, como o uso de antimicrobianos pelo paciente (MORADALI; GHODS; REHM, 2017).

Neste estudo verificou-se que isolados resistentes estavam relacionados a maior capacidade de formação de biofilme. Kaiser e colaboradores, verificaram que o uso de meropenem no tratamento de pacientes infectados por *P. aeruginosa* XDR aumenta a habilidade destes isolados na formação de biofilme, sendo que o aumento da concentração do antimicrobiano foi diretamente proporcional ao aumento da capacidade de formação de biofilme (KAISER et al., 2017).

As amostras 5 e 9 do presente estudo, apresentaram perfil MDR com significativa redução da CIM na associação do inibidor de efluxo PABetaN ao antimicrobiano, o que demonstra a presença de bombas de efluxo como um mecanismo de resistência significativo. Estas amostras foram fortes produtoras de biofilme, o que sugere que a ação de sistemas de efluxo podem estar induzindo a maior formação de biofilme.

Um estudo de 1999 demonstrou que as células de *P. aeruginosa* tratadas com azida (inibidor de gradiente de prótons de membrana citoplasmática) apresentaram forte acumulação intracelular de N-3-oxododecanoil-L-homoserina lactona (3OC12-HSL), uma acil-homoserina lactona (AHL) importante que facilita a sinalização QS nestes patógenos, sugerindo o envolvimento de efluxo (PEARSON; VAN DELDEN; IGLEWSKI, 1999). De maneira complementar, os mutantes de *P. aeruginosa* que não possuem a bomba de efluxo MexAB-oprM codificada também mostrou forte acumulação intracelular de 3OC12-HSL e biofilme reduzida. Este estudo sugeriu que 3OC12-HSL é um substrato natural de MexAB-OprM e está envolvido em seu efluxo (PEARSON; VAN DELDEN; IGLEWSKI, 1999). *P. aeruginosa nalB* e *nfxB* mutantes, que superexpressam os sistemas de efluxo MexAB-OprM e MexCD-OprJ, respectivamente, não apresentaram defeitos na formação de biofilmes e que os isolados mutantes de *nalB* exibiram formação de biofilmes significativamente mais densa em comparação com os isolados selvagens (SANCHEZ et al., 2002). Vários estudos reportam que a bomba MexCD-OprJ apresenta o mesmo perfil que MexAB-oprM em relação à formação de biofilme (ALAV; SUTTON; RAHMAN, 2018).

A superexpressão de MexEF-OprN em outro estudo demonstrou prejudicar a formação de biofilme, visto que esta bomba é responsável pela extrusão de 4-hidroxi-2-heptilquinolina, um sinalizador do sistema QS. Há evidências que a superexpressão de MexEF-OprN reduz a concentração intracelular de sinais QS em *P. aeruginosa*, diminuindo a resposta de quórum, o que resultaria em comprometimento da formação de biofilmes (LAMARCHE; DEZIEL, 2011). Estes achados corroboram com os resultados obtidos neste estudo, visto que as amostras 1, 7 e 10, resistentes ao imipenem, não apresentaram formação de biofilme (1 e 7) ou formação moderada (10). A significativa redução da CIM destes isolados perante o inibidor de efluxo, sugere fortemente que o mecanismo de resistência dos mesmos seja a superexpressão do sistema de efluxo MexEF-OprN, único capaz de promover a extrusão do imipenem (KOHLER et al., 1999; MESAROS et al., 2007). O isolado 9, fortemente formador de biofilme, apresentou resistência ao imipenem, contudo, foi resistente também ao meropenem, substrato da bomba MexAB-OprM, sistemas que favorecem a sinalização para formação de biofilme (ALAV; SUTTON; RAHMAN, 2018).

Vários estudos demonstram que o uso de inibidores de bomba de efluxo podem reduzir a formação de biofilme. O inibidor de efluxo CCCP reduziu significativamente a formação de biofilme em isolados de *P.*

aeruginosa. PAbetaN foi testado em *P. putida* e *P. aeruginosa*, em ambos os casos houve redução da formação de biofilme. O uso de PAbetaN em associação com quelantes de ferro (ácido aceto-hidroxiâmico, EDTA e 2,2-dipiridilo) promoveu um efeito sinérgico em *P. aeruginosa*, acarretando uma maior redução da formação de biofilme em comparação às amostras tratadas apenas com PAbetaN. O ferro age como um sinal importante para a formação de biofilmes de *P. aeruginosa*, assim, os quelantes de ferro impedem a este processo, pela redução da concentração de ferro disponível para células (BANIN; VASIL; GREENBERG, 2005).

Portanto, considerando que a resistência mediada pela superexpressão de bombas de efluxo foi o principal mecanismo encontrado neste estudo, e que, conforme discutido acima, várias bombas de efluxo contribuem para a regulação da formação de biofilmes em *P. aeruginosa* (um dos principais fatores de risco e permanência da espécie em ambiente hospitalar), é razoável supor que a pesquisa de novas estratégias para o tratamento de infecções por *P. aeruginosa* MDR passa pelo desenvolvimento de inibidores de efluxo específicos.

7 CONCLUSÕES

Em relação a realização do TSA pelo método de disco difusão podemos concluir que os resultados obtidos são condizentes com o perfil de susceptibilidade que vem sendo descrito na literatura. Em comparação com a metodologia Vitek2® – bioMérieux, observou-se algumas discrepâncias importantes nos resultados. Contudo, dados da literatura recomendam a utilização do TSA do Vitek2® para acelerar o início do tratamento e direcionar a terapia antimicrobiana a ser utilizada, visto que na maior parte dos casos, estes resultados são corretos. Os resultados de resistência obtidos pela disco difusão puderam ser confirmados pela determinação da MIC. Entretanto, independente da metodologia utilizada se ressalta a importância dos critérios de interpretação utilizados para categorização dos isolados.

A determinação da CIM realizada na ausência e na presença do inibidor de efluxo PAbetaN, mostrou significativa redução da resistência na presença do inibidor para todos os isolados testados. Esses resultados comprovam que o principal mecanismo de resistência é a superexpressão de bombas de efluxo. De acordo com o tipo de antimicrobiano que os isolados foram resistentes, pôde-se ainda sugerir quais bombas de efluxo estariam envolvidas no processo de resistência. Estas sugestões deverão ser confirmadas genotipicamente por RT-qPCR, metodologia esta, que já está em processo de padronização.

Quanto à formação de biofilme, verificou-se que as bactérias com maior capacidade de formação de biofilmes foram as da espécie *P. aeruginosa*, isoladas de pacientes e com alto índice de resistência. Acredita-se que o maior isolamento em pacientes esteja relacionado com as condições de estresse destas bactérias, visto que em ambiente hospitalar em geral os pacientes são polimedicados, o que poderia estimular a produção de fatores de virulência. A maior incidência de isolados resistentes formadores de biofilme pode ser explicada pela superexpressão dos sistemas de efluxo que em sua maioria, auxiliam no processo de formação de biofilme. Estes resultados evidenciam que o mecanismo de resistência formado por sistemas de efluxo estão correlacionadas e interferem na formação de biofilme.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo pôde contribuir com informações relevantes a respeito das características de resistência e virulência de *Pseudomonas* spp. circulantes no HU-UFSC. Devido a serem bactérias de fácil adaptação e sobrevivência, bem como possuem a capacidade de expressar diversos mecanismos de resistência, deve-se sempre atentar para a possível patogenicidade de *Pseudomonas* spp., em especial, *P. aeruginosa*.

Confirmou-se a suspeita de que a resistência nos isolados estudados estava relacionada à superexpressão de bombas de efluxo, já que em sua maioria não apresentavam enzimas de hidrólise. Ainda foi possível correlacionar estes dados com à capacidade de formação de biofilme, o que corrobora com dados da literatura.

Estes patógenos tem se tornado um grave problema em todo o mundo, visto que causam altas taxas de mortalidade em ambientes hospitalares. A conscientização dos profissionais da saúde quanto ao seguimento de normas padronizadas para a adequada prescrição de antimicrobianos, o cuidado no manejo dos pacientes e o correto procedimento de limpeza e desinfecção dos ambientes são fundamentais na tentativa de coibir o aumento da resistência bacteriana e a ocorrência de surtos no âmbito hospitalar.

Ainda, os resultados do trabalho corroboram a necessidade de pesquisa e desenvolvimento de inibidores de efluxo específicos como opção para futuramente melhorar as opções de tratamento para *P. aeruginosa* MDR.

9 PERSPECTIVAS

- Realizar a avaliação genotípica da expressão dos sistemas de efluxo MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexE-OprM e MexXY-OprM, descritos em *P. aeruginosa* por RT-qPCR;
- Avaliar a expressão das porinas de membrana externa OprD;
- Analisar os dados de sequenciamento completo do genoma do isolado 1 MDR.

REFERÊNCIAS

ABRAAM, E.P.; CHAIN, E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. **Nature**, 146: 837, 1940.

AESCHLIMANN, J. R. The role of multidrug efflux pumps in the antibiotic resistance of *P. aeruginosa* and other gram-negative bacteria. Insights from the Society of Infectious Diseases Pharmacists. **Pharmacotherapy**, v.23, n.7, p.916-24, 2003.

ADABI, M.; TALEBI-TAHER, M.; ARBABI, L., et al. Spread of Efflux Pump Overexpressing-Mediated Fluoroquinolone Resistance and Multidrug Resistance in *P. aeruginosa* by using an Efflux Pump Inhibitor. **Infect Chemother**, v.47, n.2, p.98-104, 2015.

ADAM, J.; POKORNA, M.; SABIN, C., et al. Engineering of PA-IIL lectin from *P. aeruginosa* - Unravelling the role of the specificity loop for sugar preference. **BMC Struct Biol**, v.7, p.36, 2007.

AGNELLO, M.; WONG-BERINGER, A. Differentiation in quinolone resistance by virulence genotype in *P. aeruginosa*. **PLoS One**, v.7, n.8, p.e42973, 2012.

ALAV, I.; SUTTON, J. M.; RAHMAN, K. M. Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation. **J Antimicrob Chemother**, 2018.

ALVES BRAGA, I.; AMARAL DE CAMPOS, P.; PINTO GONTIJO FILHO, P., et al. Multi-Hospital Point Prevalence Study of Healthcare-Associated Infections in 28 Adult Intensive Care Units in Brazil. **J Hosp Infect**, 2018.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Medidas de Prevenção e Controle de Infecções Por Enterobactérias Multirresistentes, Nota Técnica nº1**. Brasília, DF 17 jan. 2013

ARAI, L. R.; BARBOSA, A. V.; CARVALHO, C. A., et al. Antimicrobial resistance, integron carriage, and *gyrA* and *gyrB* mutations in *P. aeruginosa* isolated from dogs with otitis externa and pyoderma in Brazil. **Vet Dermatol**, v.27, n.2, p.113-7e31, 2016.

- ASKOURA, M.; MOTTAWEA, W.; ABUJAMEL, T., et al. Efflux pump inhibitors (EPIs) as new antimicrobial agents against *P. aeruginosa*. **Libyan J Med**, v.6, 2011.
- AUBERT, D.; GIRLICH, D.; NAAS, T., et al. Functional and structural characterization of the genetic environment of an extended-spectrum beta-lactamase bla_{VEB} gene from a *P. aeruginosa* isolate obtained in India. **Antimicrob Agents Chemother**, v.48, n.9, p.3284-90, 2004.
- BALASUBRAMANIAN, D.; SCHNEPER, L.; KUMARI, H., et al. A dynamic and intricate regulatory network determines *P. aeruginosa* virulence. **Nucleic Acids Res**, v.41, n.1, p.1-20, 2013.
- BANIN, E.; VASIL, M. L.; GREENBERG, E. P. Iron and *P. aeruginosa* biofilm formation. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.102, n.31, p.11076-81, 2005.
- BARRAUD, N.; SCHLEHECK, D.; KLEBENSBERGER, J., et al. Nitric oxide signaling in *P. aeruginosa* biofilms mediates phosphodiesterase activity, decreased cyclic di-GMP levels, and enhanced dispersal. **J Bacteriol**, v.191, n.23, p.7333-42, 2009.
- BERUBE, B. J.; RANGEL, S. M.; HAUSER, A. R. *Pseudomonas aeruginosa*: breaking down barriers. **Curr Genet**, v.62, n.1, p.109-13, 2016.
- BOHN, Y. S.; BRANDES, G.; RAKHIMOVA, E., et al. Multiple roles of *P. aeruginosa* TBCF10839 PilY1 in motility, transport and infection. **Mol Microbiol**, v.71, n.3, p.730-47, 2009.
- BOUILLOT, S.; ATTREE, I.; HUBER, P. Pharmacological activation of Rap1 antagonizes the endothelial barrier disruption induced by exotoxins ExoS and ExoT of *Pseudomonas aeruginosa*. **Infect Immun**, v.83, n.5, p.1820-9, 2015.
- BRADBURY, R. S.; RODDAM, L. F.; MERRITT, A., et al. Virulence gene distribution in clinical, nosocomial and environmental isolates of *P. aeruginosa*. **J Med Microbiol**, v.59, n.Pt 8, p.881-90, 2010.

BRCAST. BRAZILIAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING. **Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos.** 2018.

BUSH, K.; BRADFORD, P. A. beta-Lactams and beta-Lactamase Inhibitors: An Overview. **Cold Spring Harb Perspect Med**, v.6, n.8, 2016.

BYRD, M. S.; SADOVSKAYA, I.; VINOGRADOV, E., et al. Genetic and biochemical analyses of the *P. aeruginosa* Psl exopolysaccharide reveal overlapping roles for polysaccharide synthesis enzymes in Psl and LPS production. **Mol Microbiol**, v.73, n.4, p.622-38, 2009.

CABOT, G.; ZAMORANO, L.; MOYA, B., et al. Evolution of *P. aeruginosa* Antimicrobial Resistance and Fitness under Low and High Mutation Rates. **Antimicrob Agents Chemother**, v.60, n.3, p.1767-78, 2016.

CAI, S.; CHEN, Y.; SONG, D., et al. Study on the resistance mechanism via outer membrane protein OprD2 and metal beta-lactamase expression in the cell wall of *P. aeruginosa*. **Exp Ther Med**, v.12, n.5, p.2869-2872, 2016.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. ***P. aeruginosa* in Healthcare Settings.** Disponível em: <<https://www.cdc.gov/hai/organisms/pseudomonas.html>>. Acesso em: 05 mar. 2017.

CHALHOUB, H.; SAENZ, Y.; RODRIGUEZ-VILLALOBOS, H., et al. High-level resistance to meropenem in clinical isolates of *P. aeruginosa* in the absence of carbapenemases: role of active efflux and porin alterations. **Int J Antimicrob Agents**, v.48, n.6, p.740-743, 2016.

CHEN, W.; WANG, D.; ZHOU, W., et al. Novobiocin binding to NalD induces the expression of the MexAB-OprM pump in *P. aeruginosa*. **Mol Microbiol**, v.100, n.5, p.749-58, 2016.

CHOUDHURY, D.; DAS TALUKDAR, A.; DUTTA CHOUDHURY, M., et al. Transcriptional Analysis of MexAB-OprM Efflux Pumps System of *P. aeruginosa* and Its Role in Carbapenem Resistance in a

Tertiary Referral Hospital in India. **PLoS One**, v.10, n.7, p.e0133842, 2015.

CLAEYS, G.; VERSCHRAEGEN, G.; DE BAERE, T., et al. PER-1 beta-lactamase-producing *P. aeruginosa* in an intensive care unit. **J Antimicrob Chemother**, v.45, n.6, p.924-5, 2000.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**. 27^a ed. CLSI standard M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**. 28^a ed. CLSI standard M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.

COMIN, V. M.; LOPES, L. Q.; QUATRIN, P. M., et al. Influence of Melaleuca alternifolia oil nanoparticles on aspects of *P. aeruginosa* biofilm. **Microb Pathog**, v.93, p.120-5, 2016.

DANTAS, R. C. C.; SILVA, R. T. E.; FERREIRA, M. L., et al. Molecular epidemiological survey of bacteremia by multidrug resistant *P. aeruginosa*: the relevance of intrinsic resistance mechanisms. **PLoS One**, v.12, n.5, p.e0176774, 2017.

DELBRUCK, H.; BOGAERTS, P.; KUPPER, M. B., et al. Kinetic and crystallographic studies of extended-spectrum GES-11, GES-12, and GES-14 beta-lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, v.56, n.11, p.5618-25, 2012.

DELMAR, J. A.; SU, C. C.; YU, E. W. Bacterial multidrug efflux transporters. **Annu Rev Biophys**, v.43, p.93-117, 2014.

DIAS, V. C.; RESENDE, J. A.; BASTOS, A. N., et al. Epidemiological, Physiological, and Molecular Characteristics of a Brazilian Collection of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* and *P. aeruginosa*. **Microb Drug Resist**, 2017.

DIAZ, M. H.; SHAVER, C. M.; KING, J. D., et al. *P. aeruginosa* induces localized immunosuppression during pneumonia. **Infect Immun**, v.76, n.10, p.4414-21, 2008.

DING, F.; LEE, K. J.; VAHEDI-FARIDI, A., et al. Design and study of the efflux function of the EGFP fused MexAB-OprM membrane transporter in *P. aeruginosa* using fluorescence spectroscopy. **Analyst**, v.139, n.12, p.3088-96, 2014.

DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerg Infect Dis**, v.8, n.9, p.881-90, 2002.

DOUBLET, B.; ROBIN, F.; CASIN, I., et al. Molecular and biochemical characterization of the natural chromosome-encoded class A beta-lactamase from *Pseudomonas luteola*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.54, n.1, p.45-51, 2010.

DUBOIS, V.; POIREL, L.; MARIE, C., et al. Molecular characterization of a novel class 1 integron containing bla(GES-1) and a fused product of aac3-Ib/aac6'-Ib' gene cassettes in *P. aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.46, n.3, p.638-45, 2002.

EL-SOLH, A. A.; HATTEMER, A.; HAUSER, A. R., et al. Clinical outcomes of type III *P. aeruginosa* bacteremia. **Crit Care Med**, v.40, n.4, p.1157-63, 2012.

EMPEL, J.; FILCZAK, K.; MROWKA, A., et al. Outbreak of *P. aeruginosa* infections with PER-1 extended-spectrum beta-lactamase in Warsaw, Poland: further evidence for an international clonal complex. **J Clin Microbiol**, v.45, n.9, p.2829-34, 2007.

FARAJNIA, S.; AZHARI, F.; ALIKHANI, M. Y., et al. Prevalence of PER and VEB Type Extended Spectrum Betalactamases among Multidrug Resistant Acinetobacter baumannii Isolates in North-West of Iran. **Iran J Basic Med Sci**, v.16, n.6, p.751-5, 2013.

FELTMAN, H.; SCHULERT, G.; KHAN, S., et al. Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *P. aeruginosa*. **Microbiology**, v.147, n.Pt 10, p.2659-69, 2001.

FERREIRA, F. A.; SOUZA, R. R.; BONELLI, R. R., et al. Comparison of in vitro and in vivo systems to study ica-independent *Staphylococcus aureus* biofilms. **J Microbiol Methods**, v.88, n.3, p.393-8, 2012.

FIGUEIREDO, E.A.P. et al. *P. aeruginosa*: Frequência a Múltiplos Fármacos e Resistência Cruzada entre Antimicrobianos no Recife/PE, **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v.19, n.4, p. 421-427, 2007.

FINCK-BARBANCON, V.; GORANSON, J.; ZHU, L., et al. ExoU expression by *P. aeruginosa* correlates with acute cytotoxicity and epithelial injury. **Mol Microbiol**, v.25, n.3, p.547-57, 1997.

FOXMAN, B.; BROWN, P. Epidemiology of urinary tract infections: transmission and risk factors, incidence, and costs. **Infect Dis Clin North Am**, v.17, n.2, p.227-41, 2003.

FRANKLIN, M. J.; DOUTHIT, S. A.; MCCLURE, M. A. Evidence that the algI/algJ gene cassette, required for O acetylation of *P. aeruginosa* alginate, evolved by lateral gene transfer. **J Bacteriol**, v.186, n.14, p.4759-73, 2004.

FRANKLIN, M. J.; OHMAN, D. E. Mutant analysis and cellular localization of the AlgI, AlgJ, and AlgF proteins required for O acetylation of alginate in *P. aeruginosa*. **J Bacteriol**, v.184, n.11, p.3000-7, 2002.

FRAUD, S.; CAMPIGOTTO, A. J.; CHEN, Z., et al. MexCD-OprJ multidrug efflux system of *P. aeruginosa*: involvement in chlorhexidine resistance and induction by membrane-damaging agents dependent upon the AlgU stress response sigma factor. **Antimicrob Agents Chemother**, v.52, n.12, p.4478-82, 2008.

FRIEDMAN, L.; KOLTER, R. Genes involved in matrix formation in *P. aeruginosa* PA14 biofilms. **Mol Microbiol**, v.51, n.3, p.675-90, 2004a.

FRIEDMAN, L.; KOLTER, R. Two genetic loci produce distinct carbohydrate-rich structural components of the *P. aeruginosa* biofilm matrix. **J Bacteriol**, v.186, n.14, p.4457-65, 2004b.

- GALLE, M.; CARPENTIER, I.; BEYAERT, R. Structure and function of the Type III secretion system of *P. aeruginosa*. **Curr Protein Pept Sci**, v.13, n.8, p.831-42, 2012.
- GAREY, K. W.; VO, Q. P.; LAROCCO, M. T., et al. Prevalence of type III secretion protein exoenzymes and antimicrobial susceptibility patterns from bloodstream isolates of patients with *P. aeruginosa* bacteremia. **J Chemother**, v.20, n.6, p.714-20, 2008.
- GELLATLY, S. L.; HANCOCK, R. E. *P. aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. **Pathog Dis**, v.67, n.3, p.159-73, 2013.
- GIRLICH, D.; NAAS, T.; LEELAPORN, A., et al. Nosocomial spread of the integron-located veb-1-like cassette encoding an extended-spectrum beta-lactamase in *P. aeruginosa* in Thailand. **Clin Infect Dis**, v.34, n.5, p.603-11, 2002.
- GOLI, H. R.; NAHAEI, M. R.; REZAEE, M. A., et al. Contribution of mexAB-oprM and mexXY (-oprA) efflux operons in antibiotic resistance of clinical *P. aeruginosa* isolates in Tabriz, Iran. **Infect Genet Evol**, v.45, p.75-82, 2016.
- GOLOVKINE, G.; FAUDRY, E.; BOUILLOT, S., et al. VE-cadherin cleavage by LasB protease from *P. aeruginosa* facilitates type III secretion system toxicity in endothelial cells. **PLoS Pathog**, v.10, n.3, p.e1003939, 2014.
- GRISHIN, A. V.; et al., *Pseudomonas aeruginosa* Lectins As Targets for Novel Antibacterials. **Acta Naturae**, v. 7, n. 25, p. 29–41, 2015.
- GUENDOUZE, A.; PLENER, L.; BZDRENGA, J., et al. Effect of Quorum Quenching Lactonase in Clinical Isolates of *P. aeruginosa* and Comparison with Quorum Sensing Inhibitors. **Front Microbiol**, v.8, p.227, 2017.
- HAENNI, M.; BOUR, M.; CHATRE, P., et al. haenn. **Front Microbiol**, v.8, p.1847, 2017.
- HANSEN, F.; JOHANSEN, H. K.; OSTERGAARD, C., et al. Characterization of carbapenem nonsusceptible *P. aeruginosa* in

Denmark: a nationwide, prospective study. **Microb Drug Resist**, v.20, n.1, p.22-9, 2014.

HASMAN, H.; HAMMERUM, A. M.; HANSEN, F., et al. Detection of mcr-1 encoding plasmid-mediated colistin-resistant *Escherichia coli* isolates from human bloodstream infection and imported chicken meat, Denmark 2015. **Euro Surveill**, v.20, n.49, 2015.

HAUSER, A. R.; ENGEL, J. N. *P. aeruginosa* induces type-III-secretion-mediated apoptosis of macrophages and epithelial cells. **Infect Immun**, v.67, n.10, p.5530-7, 1999.

HAY, T.; FRAUD, S.; LAU, C. H., et al. Antibiotic inducibility of the mexXY multidrug efflux operon of *P. aeruginosa*: involvement of the MexZ anti-repressor ArmZ. **PLoS One**, v.8, n.2, p.e56858, 2013.

HENTZER, M.; EBERL, L.; NIELSEN, J., et al. Quorum sensing : a novel target for the treatment of biofilm infections. **BioDrugs**, v.17, n.4, p.241-50, 2003.

HONG, D. J.; BAE, I. K.; JANG, I. H., et al. Epidemiology and Characteristics of Metallo-beta-Lactamase-Producing *P. aeruginosa*. **Infect Chemother**, v.47, n.2, p.81-97, 2015.

HORIYAMA, T.; NISHINO, K. AcrB, AcrD, and MdtABC multidrug efflux systems are involved in enterobactin export in *Escherichia coli*. **PLoS One**, v.9, n.9, p.e108642, 2014.

IGBINOSA, I. H.; NWODO, U. U.; SOSA, A., et al. Commensal *Pseudomonas* species isolated from wastewater and freshwater milieus in the Eastern Cape Province, South Africa, as reservoir of antibiotic resistant determinants. **Int J Environ Res Public Health**, v.9, n.7, p.2537-49, 2012.

IRIE, Y.; BORLEE, B. R.; O'CONNOR, J. R., et al. Self-produced exopolysaccharide is a signal that stimulates biofilm formation in *P. aeruginosa*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.109, n.50, p.20632-6, 2012.

JAFFAR-BANDJEE, M. C.; LAZDUNSKI, A.; BALLY, M., et al. Production of elastase, exotoxin A, and alkaline protease in sputa during

pulmonary exacerbation of cystic fibrosis in patients chronically infected by *P. aeruginosa*. **J Clin Microbiol**, v.33, n.4, p.924-9, 1995.

JEANNOT, K.; ELSEN, S.; KOHLER, T., et al. Resistance and virulence of *P. aeruginosa* clinical strains overproducing the MexCD-OprJ efflux pump. **Antimicrob Agents Chemother**, v.52, n.7, p.2455-62, 2008.

JIANG, X.; ZHANG, Z.; LI, M., et al. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.50, n.9, p.2990-5, 2006.

KAISER, S. J.; MUTTERS, N. T.; DEROSA, A., et al. Determinants for persistence of *P. aeruginosa* in hospitals: interplay between resistance, virulence and biofilm formation. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v.36, n.2, p.243-253, 2017.

KALIA, M.; YADAV, V. K.; SINGH, P. K., et al. Exploring the impact of parthenolide as anti-quorum sensing and anti-biofilm agent against *P. aeruginosa*. **Life Sci**, 2018.

KATTAN, J. N.; VILLEGAS, M. V.; QUINN, J. P. New developments in carbapenems. **Clin Microbiol Infect**, v.14, n.12, p.1102-11, 2008.

KATVORAVUTTHICHAJ, C.; BOONBUMRUNG, K.; TIYAWISUTSRI, R. Prevalence of beta-lactamase classes A, C, and D among clinical isolates of *P. aeruginosa* from a tertiary-level hospital in Bangkok, Thailand. **Genet Mol Res**, v.15, n.3, 2016.

KIM, C. H.; KANG, H. Y.; KIM, B. R., et al. Mutational inactivation of OprD in carbapenem-resistant *P. aeruginosa* isolates from Korean hospitals. **J Microbiol**, v.54, n.1, p.44-9, 2016.

KIRBY, W. M. Extraction of a Highly Potent Penicillin Inactivator from Penicillin Resistant Staphylococci. **Science**, v.99, n.2579, p.452-3, 1944.

KLOCKGETHER, J.; MUNDER, A.; NEUGEBAUER, J., et al. Genome diversity of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 laboratory strains. **J Bacteriol**, v.192, n.4, p.1113-21, 2010.

- KOHLER, T.; EPP, S. F.; CURTY, L. K., et al. Characterization of MexT, the regulator of the MexE-MexF-OprN multidrug efflux system of *P. aeruginosa*. **J Bacteriol**, v.181, n.20, p.6300-5, 1999.
- KOLAYLI, F.; GACAR, G.; KARADENIZLI, A., et al. PER-1 is still widespread in Turkish hospitals among *P. aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. **FEMS Microbiol Lett**, v.249, n.2, p.241-5, 2005.
- KOLOMIETS, E.; SWIDERSKA, M. A.; KADAM, R. U., et al. Glycopeptide dendrimers with high affinity for the fucose-binding lectin LecB from *P. aeruginosa*. **ChemMedChem**, v.4, n.4, p.562-9, 2009.
- KRIENGKAUYKIAT, J.; PORTER, E.; LOMOVSKAYA, O., et al. Use of an efflux pump inhibitor to determine the prevalence of efflux pump-mediated fluoroquinolone resistance and multidrug resistance in *P. aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.49, n.2, p.565-70, 2005.
- KTARI, S.; MNIF, B.; ZNAZEN, A., et al. Diversity of beta-lactamases in *P. aeruginosa* isolates producing metallo-beta-lactamase in two Tunisian hospitals. **Microb Drug Resist**, v.17, n.1, p.25-30, 2011.
- LAMARCHE, M. G.; DEZIEL, E. MexEF-OprN efflux pump exports the *Pseudomonas* quinolone signal (PQS) precursor HHQ (4-hydroxy-2-heptylquinoline). **PLoS One**, v.6, n.9, p.e24310, 2011.
- LAMERS, R. P.; CAVALLARI, J. F.; BURROWS, L. L. The efflux inhibitor phenylalanine-arginine beta-naphthylamide (PAbetaN) permeabilizes the outer membrane of gram-negative bacteria. **PLoS One**, v.8, n.3, p.e60666, 2013.
- LAVERTY, G.; GORMAN, S. P.; GILMORE, B. F. Biomolecular Mechanisms of *P. aeruginosa* and *Escherichia coli* Biofilm Formation. **Pathogens**, v.3, n.3, p.596-632, 2014.
- LEE, V. T.; MATEWISH, J. M.; KESSLER, J. L., et al. A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production. **Mol Microbiol**, v.65, n.6, p.1474-84, 2007.

- LI, X. Z.; PLESIAT, P.; NIKAIDO, H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. **Clin Microbiol Rev**, v.28, n.2, p.337-418, 2015.
- LIBISCH, B.; POIREL, L.; LEPSANOVIC, Z., et al. Identification of PER-1 extended-spectrum beta-lactamase producing *P. aeruginosa* clinical isolates of the international clonal complex CC11 from Hungary and Serbia. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v.54, n.3, p.330-8, 2008.
- LIEW, Y. X.; TAN, T. T.; LEE, W., et al. Risk factors for extreme-drug resistant *P. aeruginosa* infections in patients with hematologic malignancies. **Am J Infect Control**, v.41, n.2, p.140-4, 2013.
- LISTER, P. D.; WOLTER, D. J.; HANSON, N. D. Antibacterial-resistant *P. aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. **Clin Microbiol Rev**, v.22, n.4, p.582-610, 2009.
- LIU, Y. Y.; WANG, Y.; WALSH, T. R., et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. **Lancet Infect Dis**, v.16, n.2, p.161-8, 2016.
- LUCZKIEWICZ, A.; KOTLARSKA, E.; ARTICHOWICZ, W., et al. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas* spp. isolated from wastewater and wastewater-impacted marine coastal zone. **Environ Sci Pollut Res Int**, v.22, n.24, p.19823-34, 2015.
- LUZZARO, F.; MANTENGOLI, E.; PERILLI, M., et al. Dynamics of a nosocomial outbreak of multidrug-resistant *P. aeruginosa* producing the PER-1 extended-spectrum beta-lactamase. **J Clin Microbiol**, v.39, n.5, p.1865-70, 2001.
- LYCZAK, J. B.; CANNON, C. L.; PIER, G. B. Establishment of *P. aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. **Microbes Infect**, v.2, n.9, p.1051-60, 2000.
- MA, L.; JACKSON, K. D.; LANDRY, R. M., et al. Analysis of *P. aeruginosa* conditional psl variants reveals roles for the psl polysaccharide in adhesion and maintaining biofilm structure postattachment. **J Bacteriol**, v.188, n.23, p.8213-21, 2006.

MA, L.; LU, H.; SPRINKLE, A., et al. *P. aeruginosa* Psl is a galactose- and mannose-rich exopolysaccharide. **J Bacteriol**, v.189, n.22, p.8353-6, 2007.

MAGIORAKOS, A. P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R. B., et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clin Microbiol Infect**, v.18, n.3, p.268-81, 2012.

MAKIN, S. A.; BEVERIDGE, T. J. The influence of A-band and B-band lipopolysaccharide on the surface characteristics and adhesion of *P. aeruginosa* to surfaces. **Microbiology**, v.142 (Pt 2), p.299-307, 1996.

MANSOUR, W.; DAHMEN, S.; POIREL, L., et al. Emergence of SHV-2a extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a university hospital in Tunisia. **Microb Drug Resist**, v.15, n.4, p.295-301, 2009.

MAO, W.; WARREN, M. S.; LEE, A., et al. MexXY-OprM efflux pump is required for antagonism of aminoglycosides by divalent cations in *P. aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.45, n.7, p.2001-7, 2001.

MASEDA, H.; UWATE, M.; NAKAE, T. Transcriptional regulation of the mexEF-oprN multidrug efflux pump operon by MexT and an unidentified repressor in nfxC-type mutant of *P. aeruginosa*. **FEMS Microbiol Lett**, v.311, n.1, p.36-43, 2010.

MASUDA, N.; SAKAGAWA, E.; OHYA, S., et al. Substrate specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-oprM efflux pumps in *P. aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.44, n.12, p.3322-7, 2000.

MATSUKAWA, M.; GREENBERG, E. P. Putative exopolysaccharide synthesis genes influence *P. aeruginosa* biofilm development. **J Bacteriol**, v.186, n.14, p.4449-56, 2004.

MATTICK, J. S. Type IV pili and twitching motility. **Annu Rev Microbiol**, v.56, p.289-314, 2002.

MAVROIDI, A.; TZELEPI, E.; TSAKRIS, A., et al. An integron-associated beta-lactamase (IBC-2) from *P. aeruginosa* is a variant of the extended-spectrum beta-lactamase IBC-1. **J Antimicrob Chemother**, v.48, n.5, p.627-30, 2001.

MCLELLAN, J. E.; PITCHER, J. I.; BALLARD, S. A., et al. Superbugs in the supermarket? Assessing the rate of contamination with third-generation cephalosporin-resistant gram-negative bacteria in fresh Australian pork and chicken. **Antimicrob Resist Infect Control**, v.7, p.30, 2018.

MESAROS, N.; GLUPCZYNSKI, Y.; AVRAIN, L., et al. A combined phenotypic and genotypic method for the detection of Mex efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. **J Antimicrob Chemother**, v.59, n.3, p.378-86, 2007.

MEWE, M.; TIELKER, D.; SCHONBERG, R., et al. *P. aeruginosa* lectins I and II and their interaction with human airway cilia. **J Laryngol Otol**, v.119, n.8, p.595-9, 2005.

MIRSALEHIAN, A.; FEIZABADI, M.; NAKHJAVANI, F. A., et al. Detection of VEB-1, OXA-10 and PER-1 genotypes in extended-spectrum beta-lactamase-producing *P. aeruginosa* strains isolated from burn patients. **Burns**, v.36, n.1, p.70-4, 2010.

MONDS, R. D.; O'TOOLE, G. A. The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. **Trends Microbiol**, v.17, n.2, p.73-87, 2009.

MOON, S. Y.; ZHENG, Y. Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. **Trends Cell Biol**, v.13, n.1, p.13-22, 2003.

MORADALI, M. F.; GHODS, S.; REHM, B. H. *P. aeruginosa* Lifestyle: A Paradigm for Adaptation, Survival, and Persistence. **Front Cell Infect Microbiol**, v.7, p.39, 2017.

MULCAHY, H.; CHARRON-MAZENOD, L.; LEWENZA, S. Extracellular DNA chelates cations and induces antibiotic resistance in *P. aeruginosa* biofilms. **PLoS Pathog**, v.4, n.11, p.e1000213, 2008.

MÜRNER, H. Biofilm – Bestandesaufnahme und Lösungsansatz. 1 gravura. Disponível em: < <http://halagchemie.ch/biofilm>>. Acesso em: 15 dezembro 2017.

NIKAIDO, H.; TAKATSUKA, Y. Mechanisms of RND multidrug efflux pumps. **Biochim Biophys Acta**, v.1794, n.5, p.769-81, 2009.

NIKBIN, V. S.; ASLANI, M. M.; SHARAFI, Z., et al. Molecular identification and detection of virulence genes among *P. aeruginosa* isolated from different infectious origins. **Iran J Microbiol**, v.4, n.3, p.118-23, 2012.

NIKOLSKAYA, A. N.; GALPERIN, M. Y. A novel type of conserved DNA-binding domain in the transcriptional regulators of the AlgR/AgrA/LytR family. **Nucleic Acids Res**, v.30, n.11, p.2453-9, 2002.

NORDMANN, P.; RONCO, E.; NAAS, T., et al. Characterization of a novel extended-spectrum beta-lactamase from *P. aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.37, n.5, p.962-9, 1993.

O'TOOLE, G. A. Microtiter dish biofilm formation assay. **J Vis Exp**, n.47, 2011.

OBUOBI, S.; VOO, Z. X.; LOW, M. W., et al. Phenylboronic Acid Functionalized Polycarbonate Hydrogels for Controlled Release of Polymyxin B in *P. aeruginosa* Infected Burn Wounds. **Adv Healthc Mater**, 2018.

OTTO, M. P.; FOUCHER, B.; DARDARE, E., et al. Severe catheter related bacteremia due to *Pseudomonas luteola*. **Med Mal Infect**, v.43, n.4, p.170-1, 2013.

PALAVUTITOTAI, N.; JITMUANG, A.; TONGSAI, S., et al. Epidemiology and risk factors of extensively drug-resistant *P. aeruginosa* infections. **PLoS One**, v.13, n.2, p.e0193431, 2018.

PAN, Y.-P.; XU, Y.-H.; WANG, Z.-X., et al. Overexpression of MexAB-OprM efflux pump in carbapenem-resistant *P. aeruginosa*. **Archives of Microbiology**, v.198, n.6, p.565-571, 2016.

PARSEK, M. R.; TOLKER-NIELSEN, T. Pattern formation in *P. aeruginosa* biofilms. **Curr Opin Microbiol**, v.11, n.6, p.560-6, 2008.

PASTERAN, F.; FACCONI, D.; PETRONI, A., et al. Novel variant (bla(VIM-11)) of the metallo- β -lactamase bla(VIM) family in a GES-1 extended-spectrum- β -lactamase-producing *P. aeruginosa* clinical isolate in Argentina. **Antimicrob Agents Chemother**, v.49, n.1, p.474-5, 2005.

PEARSON, J. P.; VAN DELDEN, C.; IGLEWSKI, B. H. Active efflux and diffusion are involved in transport of *P. aeruginosa* cell-to-cell signals. **J Bacteriol**, v.181, n.4, p.1203-10, 1999.

PEDERSEN, M. G.; OLESEN, H. V.; JENSEN-FANGEL, S., et al. Colistin resistance in *P. aeruginosa* and *Achromobacter* spp. cultured from Danish cystic fibrosis patients is not related to plasmid-mediated expression of *mcr-1*. **J Cyst Fibros**, 2017.

PENG, J.; CAO, J.; NG, F. M., et al. *P. aeruginosa* develops Ciprofloxacin resistance from low to high level with distinctive proteome changes. **J Proteomics**, v.152, p.75-87, 2017.

PIDDOCK, L. J. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. **Clin Microbiol Rev**, v.19, n.2, p.382-402, 2006a.

PIDDOCK, L. J. Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. **Nat Rev Microbiol**, v.4, n.8, p.629-36, 2006b.

POIREL, L.; BRINAS, L.; FORTINEAU, N., et al. Integron-encoded GES-type extended-spectrum beta-lactamase with increased activity toward aztreonam in *P. aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.49, n.8, p.3593-7, 2005.

POIREL, L.; ROTIMI, V. O.; MOKADDAS, E. M., et al. VEB-1-like extended-spectrum beta-lactamases in *P. aeruginosa*, Kuwait. **Emerg Infect Dis**, v.7, n.3, p.468-70, 2001.

POOLE, K. *P. aeruginosa*: resistance to the max. **Front Microbiol**, v.2, p.65, 2011.

POONSUK, K.; TRIBUDDHARAT, C.; CHUANCHUEN, R. Aminoglycoside resistance mechanisms in *P. aeruginosa* isolates from non-cystic fibrosis patients in Thailand. **Can J Microbiol**, v.59, n.1, p.51-6, 2013.

POONSUK, K.; TRIBUDDHARAT, C.; CHUANCHUEN, R. Simultaneous overexpression of multidrug efflux pumps in *P. aeruginosa* non-cystic fibrosis clinical isolates. **Can J Microbiol**, v.60, n.7, p.437-43, 2014.

POTRON, A.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Emerging broad-spectrum resistance in *P. aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. **Int J Antimicrob Agents**, v.45, n.6, p.568-85, 2015.

PURSELL, A.; POOLE, K. Functional characterization of the NfxB repressor of the mexCD-oprJ multidrug efflux operon of *P. aeruginosa*. **Microbiology**, v.159, n.Pt 10, p.2058-73, 2013.

PUZARI, M.; CHETIA, P. RND efflux pump mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria *Escherichia coli* and *P. aeruginosa*: a major issue worldwide. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.33, n.2, p.24, 2017.

QING, Y.; CAO, K. Y.; FANG, Z. L., et al. Outbreak of PER-1 and diversity of beta-lactamases among ceftazidime-resistant *P. aeruginosa* clinical isolates. **J Med Microbiol**, v.63, n.Pt 3, p.386-92, 2014.

RAJKUMARI, J.; BORKOTOKY, S.; MURALI, A., et al. Attenuation of quorum sensing controlled virulence factors and biofilm formation in *P. aeruginosa* by pentacyclic triterpenes, betulin and betulinic acid. **Microb Pathog**, 2018.

RANELLOU, K.; KADLEC, K.; POULOU, A., et al. Detection of *P. aeruginosa* isolates of the international clonal complex 11 carrying the blaPER-1 extended-spectrum beta-lactamase gene in Greece. **J Antimicrob Chemother**, v.67, n.2, p.357-61, 2012.

RANGEL, S. M.; DIAZ, M. H.; KNOTEN, C. A., et al. The Role of ExoS in Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* during Pneumonia. **PLoS Pathog**, v.11, n.6, p.e1004945, 2015.

REGNI, C.; NAUGHT, L.; TIPTON, P. A., et al. Structural basis of diverse substrate recognition by the enzyme PMM/PGM from *P. aeruginosa*. **Structure**, v.12, n.1, p.55-63, 2004.

RIBEIRO, P. C.; MONTEIRO, A. S.; MARQUES, S. G., et al. Phenotypic and molecular detection of the bla KPC gene in clinical isolates from inpatients at hospitals in Sao Luis, MA, Brazil. **BMC Infect Dis**, v.16, n.1, p.737, 2016.

ROSSI, F. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. **Clinical Infectious Diseases**, v. 52, n. 9, p. 1138–1143, 2011.

SADEGHIFARD, N.; VALIZADEH, A.; ZOLFAGHARY, M. R., et al. Relationship between the Presence of the nalC Mutation and Multidrug Resistance in *P. aeruginosa*. **Int J Microbiol**, v.2012, p.575193, 2012.

SAKURAGI, Y.; KOLTER, R. Quorum-sensing regulation of the biofilm matrix genes (pel) of *P. aeruginosa*. **J Bacteriol**, v.189, n.14, p.5383-6, 2007.

SAMONIS, G.; VARDAKAS, K. Z.; KOFTERIDIS, D. P., et al. Characteristics, risk factors and outcomes of adult cancer patients with extensively drug-resistant *P. aeruginosa* infections. **Infection**, v.42, n.4, p.721-8, 2014.

SANCHEZ, P.; LINARES, J. F.; RUIZ-DIEZ, B., et al. Fitness of in vitro selected *P. aeruginosa* nalB and nfxB multidrug resistant mutants. **J Antimicrob Chemother**, v.50, n.5, p.657-64, 2002.

SAWA, T.; SHIMIZU, M.; MORIYAMA, K., et al. Association between *P. aeruginosa* type III secretion, antibiotic resistance, and clinical outcome: a review. **Crit Care**, v.18, n.6, p.668, 2014.

SEGEV-ZARKO, L. A.; KAPACH, G.; JOSTEN, M., et al. Deficient Lipid A Remodeling by the arnB Gene Promotes Biofilm Formation in Antimicrobial Peptide Susceptible *P. aeruginosa*. **Biochemistry**, 2018.

SINTIM, H. O.; SMITH, J. A.; WANG, J., et al. Paradigm shift in discovering next-generation anti-infective agents: targeting quorum sensing, c-di-GMP signaling and biofilm formation in bacteria with small molecules. **Future Med Chem**, v.2, n.6, p.1005-35, 2010.

SIQUEIRA, V. L. D; et al., High genetic diversity among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp . isolated in a public hospital in Brazil. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, p. 49–56, 2013.

SONNET, P.; IZARD, D.; MULLIE, C. Prevalence of efflux-mediated ciprofloxacin and levofloxacin resistance in recent clinical isolates of *P. aeruginosa* and its reversal by the efflux pump inhibitors 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine and phenylalanine-arginine-beta-naphthylamide. **Int J Antimicrob Agents**, v.39, n.1, p.77-80, 2012.

STAPPER, A. P.; NARASIMHAN, G.; OHMAN, D. E., et al. Alginate production affects *P. aeruginosa* biofilm development and architecture, but is not essential for biofilm formation. **J Med Microbiol**, v.53, n.Pt 7, p.679-90, 2004.

STOKKOU, S.; GEGINAT, G.; SCHLUTER, D., et al. Direct disk diffusion test using European Clinical Antimicrobial Susceptibility Testing breakpoints provides reliable results compared with the standard method. **Eur J Microbiol Immunol (Bp)**, v.5, n.1, p.103-11, 2015.

STOVER, C. K.; PHAM, X. Q.; ERWIN, A. L., et al. Complete genome sequence of *P. aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. **Nature**, v.406, n.6799, p.959-64, 2000.

STRATEVA, T.; OUZOUNOVA-RAYKOVA, V.; MARKOVA, B., et al. Widespread detection of VEB-1-type extended-spectrum beta-lactamases among nosocomial ceftazidime-resistant *P. aeruginosa* isolates in Sofia, Bulgaria. **J Chemother**, v.19, n.2, p.140-5, 2007.

SUN, J.; DENG, Z.; YAN, A. Bacterial multidrug efflux pumps: mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. **Biochem Biophys Res Commun**, v.453, n.2, p.254-67, 2014.

TATO, M.; VALVERDE, A.; COQUE, T. M., et al. [PER-1 multiresistant *P. aeruginosa* strain in Spain]. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, v.24, n.7, p.472-3, 2006.

TERZI, H. A.; KULAH, C.; CIFTCI, I. H. The effects of active efflux pumps on antibiotic resistance in *P. aeruginosa*. **World J Microbiol Biotechnol**, v.30, n.10, p.2681-7, 2014.

THEURETZBACHER, U. Global antibacterial resistance: The never-ending story. **J Glob Antimicrob Resist**, v.1, n.2, p.63-69, 2013.

TIELKER, D.; HACKER, S.; LORIS, R., et al. *P. aeruginosa* lectin LecB is located in the outer membrane and is involved in biofilm formation. **Microbiology**, v.151, n.Pt 5, p.1313-23, 2005.

TOHIDPOUR, A.; NAJAR PEERAYEH, S.; MEHRABADI, J. F., et al. Determination of the Efflux Pump-Mediated Resistance Prevalence in *P. aeruginosa*, Using an Efflux Pump Inhibitor. **Current Microbiology**, v.59, n.3, p.352-355, 2009.

VAZ-MOREIRA, I.; NUNES, O. C.; MANAIA, C. M. Diversity and antibiotic resistance in *Pseudomonas* spp. from drinking water. **Sci Total Environ**, v.426, p.366-74, 2012.

VANCE, R. E.; RIETSCH, A.; MEKALANOS, J. J. Role of the type III secreted exoenzymes S, T, and Y in systemic spread of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 in vivo. **Infect Immun**, v.73, n.3, p.1706-13, 2005.

WAGNER, V. E.; BUSHNELL, D.; PASSADOR, L., et al. Microarray analysis of *P. aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment. **J Bacteriol**, v.185, n.7, p.2080-95, 2003.

WANG, S.; YU, S.; ZHANG, Z., et al. Coordination of swarming motility, biosurfactant synthesis, and biofilm matrix exopolysaccharide production in *P. aeruginosa*. **Appl Environ Microbiol**, v.80, n.21, p.6724-32, 2014.

WEBBER, M. A.; PIDDOCK, L. J. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. **J Antimicrob Chemother**, v.51, n.1, p.9-11, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO **Workshop on the Containment of Antimicrobial Resistance in Europe**. Geneva, 2004.

WI, Y. M.; GREENWOOD-QUAINTANCE, K. E.; SCHUETZ, A. N., et al. Activity of Ceftolozane-Tazobactam against Carbapenem-Resistant, Non-Carbapenemase-Producing *P. aeruginosa* and Associated Resistance Mechanisms. **Antimicrob Agents Chemother**, v.62, n.1, 2018.

WIMPENNY, J.; MANZ, W.; SZEWZYK, U. Heterogeneity in biofilms. **FEMS Microbiol Rev**, v.24, n.5, p.661-71, 2000.

WOLFGANG, M. C.; KULASEKARA, B. R.; LIANG, X., et al. Conservation of genome content and virulence determinants among clinical and environmental isolates of *P. aeruginosa*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.100, n.14, p.8484-9, 2003.

WONG-BERINGER, A.; WIENER-KRONISH, J.; LYNCH, S., et al. Comparison of type III secretion system virulence among fluoroquinolone-susceptible and -resistant clinical isolates of *P. aeruginosa*. **Clin Microbiol Infect**, v.14, n.4, p.330-6, 2008.

WOZNIAK, D. J.; SPRINKLE, A. B.; BAYNHAM, P. J. Control of *P. aeruginosa* algZ expression by the alternative sigma factor AlgT. **J Bacteriol**, v.185, n.24, p.7297-300, 2003.

YAMANO, Y.; NISHIKAWA, T.; FUJIMURA, T., et al. Occurrence of PER-1 producing clinical isolates of *P. aeruginosa* in Japan and their susceptibility to doripenem. **J Antibiot** (Tokyo), v.59, n.12, p.791-6, 2006.

ZHAO, K.; LIU, M.; BURGESS, R. R. Adaptation in bacterial flagellar and motility systems: from regulon members to 'foraging'-like behavior in *E. coli*. **Nucleic Acids Res**, v.35, n.13, p.4441-52, 2007.

APÊNDICE A – Iniciadores utilizados na reação de PCR para o gene *mcr-1*

| GENE | INICIADOR | SEQUÊNCIA | TAMANHO (pb) | REFERÊNCIA |
|--------------|------------------|--|--------------|------------|
| <i>mcr-1</i> | mcr1-F mcr1-R | 5'-CGGTCAGTCCGTTTGTTC-3' 5'-CTTGGTCGGTCTGTAGGG-3' | 309 | Liu, 2016 |

Fonte: Liu, 2016.

APÊNDICE B – Documento de aprovação do projeto pelo comitê de ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Catarina (continua)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: RASTREAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES EM AMBIENTE HÓSPITALAR

Pesquisador: Thais Cristine Marques Sincero

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 32930514.0.0000.0121

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Catarina

Patrocinador Principal: Universidade Federal de Santa Catarina
NEOPROSPECTA PESQUISA E CONSULTORIA S.A.

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.314.410

Apresentação do Projeto:

Já descrito no "parecer Substanciado" de aprovação por este CEP.

Objetivo da Pesquisa:

Já descrito no "parecer Substanciado" de aprovação por este CEP.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Já avaliado no "parecer Substanciado" de aprovação por este CEP.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Já comentado e considerado no "parecer Substanciado" de aprovação por este CEP.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O Hospital SOS Córdio (Florianópolis/SC) foi excluído do projeto e o Hospital Santa Isabel (Blumenau/SC) foi incluído (carta de anuência da Instituição foi incluída).

Recomendações:

Nenhuma recomendação é necessária, a não ser o lembrete de relatório anual e/ou final do projeto.

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R. Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
 Bairro: Trindade CEP: 88.040-400
 UF: SC Município: FLORIANÓPOLIS
 Telefone: (48)3721-8094 E-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br

APÊNDICE B – Documento de aprovação do projeto pelo comitê de ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Catarina (continuação)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 1.314.410

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Somos pela aprovação da exclusão do Hospital SOS Córdio (Florianópolis/SC) e a inclusão do Hospital Santa Isabel (Blumenau/SC).

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|---|--|------------------------|--------------------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_608393 ET.pdf | 13/10/2015 15:36:59 | | Aoito |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura | declaracao_Hospital_Santa_Isabel_Blu menau.pdf | 13/10/2015 15:33:53 | Thais Cristine Marques Sincero | Aoito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLÉ_v3.docx | 24/07/2014 00:57:20 | | Aoito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | Projeto Plataforma Brasil_v3.docx | 24/07/2014 00:56:05 | | Aoito |
| Outros | Carta CEP.pdf | 24/07/2014 00:55:19 | | Aoito |
| Folha de Rosto | folha de rosto.pdf | 12/03/2014 23:31:39 | | Aoito |
| Outros | declaracao HU.pdf | 12/03/2014 23:28:35 | | Aoito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | Projeto Plataforma Brasil_v2.pdf | 12/03/2014 23:26:30 | | Aoito |
| TCLÉ / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLÉ.docx | 24/02/2014 23:48:56 | | Aoito |

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Rectoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade CEP: 88.040-400
UF: SC Município: FLORIANÓPOLIS
Telefone: (48)3721-8064 E-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br

APÊNDICE B – Documento de aprovação do projeto pelo comitê de ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Catarina (conclusão)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Form. 1.314.410

FLORIANOPOLIS, 09 de Novembro de 2015

Assinado por:
Washington Portela de Souza
(Coordenador)

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R. Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade CEP: 88.040-400
UF: SC Município: FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 E-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br