



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

FERNANDA CRISTINA GOMES DE LIMA

**Análise da ação do meropenem e Polimixina E com a IgG humana frente  
isolados de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de infecções relacionadas  
à Assistência à Saúde**

RECIFE/2015

FERNANDA CRISTINA GOMES DE LIMA



**Análise da ação do meropenem e Polimixina E com a IgG humana frente isolados de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de infecções relacionadas à Assistência à Saúde**

Dissertação apresentada a Banca Examinadora do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Medicina Tropical.

Orientador: **Prof. Dr. Fabio Andre Brayner dos Santos**

Co-Orientador (a): **Dra. Dyana Leal Veras**

RECIFE/2015

Ficha catalográfica elaborada pela  
Bibliotecária: Mônica Uchôa - CRB4-1010

- L732a Lima, Fernanda Cristina Gomes de.  
Análise da ação do meropenem e Polimixina E com a IgG humana frente isolados de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de infecções relacionadas à assistência à saúde / Fernanda Cristina Gomes de Lima. – Recife : O autor, 2015.  
84 f.: il.; tab.; 30 cm.
- Orientador: Fábio André Brayner dos Santos.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2015.  
Inclui referências e apêndices.
1. *Pseudomonas aeruginosa*. 2. IgG. 3. Antibióticos. 4. Infecções. I. Santos, Fábio André Brayner dos (Orientador). II. Título.

618.9883

CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2015-119)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)  
PRÓ-REITORIA PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO (PROPESQ)  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE (CCS)  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)

**RELATÓRIO DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DA MESTRANDA**

**FERNANDA CRISTINA GOMES DE LIMA**

No dia 23 de fevereiro de 2015, às 09h00, na Sala de Aula do PPGMEDTROP - no Bl. A, Térreo do Hospital das Clínicas da UFPE -, os Membros Doutores: a Profa. Dra. Ana Catarina de Souza Lopes (Presidente da Banca - UFPE), o Prof. Dr. Wagner Luís Mendes de Oliveira (LINAT/UFPE) e o Prof. Dr. Roberto Afonso da Silva (LIKA/UFPE), componentes da Banca Examinadora, em sessão pública, arguíram a mestranda Fernanda Cristina Gomes de Lima sobre a sua Dissertação intitulada "Análise da ação do meropenem e Polimixina E com a IgG humana frente isolados de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de infecções relacionadas à Assistência à Saúde", a qual foi orientada pelo Prof. Dr. Fábio André Brayner dos Santos (CPqAM/FIOCRUZ) e co-orientada pela Pesquisadora Dra. Dyana Leal Veras (CPqAM/FIOCRUZ). Ao final da arguição de cada membro da Banca Examinadora e resposta da mestranda, as seguintes menções foram publicamente fornecidas.

Profa. Dra. Ana Catarina de Souza Lopes

APROVADA

Prof. Dr. Wagner Luís Mendes de Oliveira

Aprovada

Prof. Dr. Roberto Afonso da Silva

APROVADA



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL**

**REITOR**

Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

**PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

Francisco de Souza Ramos

**DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Nicodemos Teles Pontes Filho

**COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM MEDICINA TROPICAL**

Valdênia Maria Oliveira de Souza

**VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM MEDICINA TROPICAL**

Vera Magalhães de Silveira

**CORPO DOCENTE PERMANENTE**

Ana Catarina de Souza Lopes

Ana Lúcia Coutinho Domingues

Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto

Fábio André Brayner dos Santos

Heloísa Ramos Lacerda de Melo

Maria Amélia Vieira Maciel

Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho

Marli Tenório Cordeiro

Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

Valdênia Maria Oliveira de Souza

Vlaudia Maria Assis Costa

Vera Magalhães de Silveira

**CORPO DOCENTE COLABORADOR**

Maria de Fátima Pessoa Militão de Albuquerque

Rejane Pereira Neves

Dedico este trabalho a Deus, ao meu marido Marcelo Assis e minha família.  
Dedico especialmente e com muita alegria, aos meus queridos orientadores: Fabio  
Brayner, Luiz Carlos Alves e a admirável Dyana Leal Veras.  
Dedico também a todos aqueles que contribuíram para a conclusão e o sucesso do  
mesmo, tanto direta ou indiretamente.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS, pela maravilha e honra de ter sido escolhida para receber o dom da vida, pelas oportunidades concedidas, pelo amor incondicional que o pai tem por todos nós, pelo conforto nos momentos de tristezas e inquietações, por me conduzir sabiamente nos momentos de dúvidas e desespero, por colocar em minha vida pessoas tão especiais que hoje me rodeiam, por me permitir ser o que hoje sou e me tornarei e por me dar forças para nunca desistir dessa batalha. Resumindo, ao pai todo agradecimento é insuficiente para à quão grata eu sou a DEUS.

Agradeço ao meu marido, Marcelo Assis por estar em minha vida, por ter me escolhido para ser sua companheira, por ser tão carinhoso e amável comigo, por me socorrer e acalantar em meus momentos de crise, por ser meu alicerce de apoio, por me dar seu amor, por ser companheiro e me ajudar, enfim por ser meu cel.

A minha família, minha mãe, meu pai, meu padrasto, minha vó e meus irmãos que mesmos não morando mais junto com nenhum deles, nunca deixaram de me apoiar, me amar, se preocupar e cuidar de mim. Amo vocês demais.

Aos meus orientadores Luiz Alves, Fabio Brayner e Dyana Leal por serem excelentes pessoas e além disso excelentes guias científicos, por terem me acolhido e escolhido para fazer parte do LBCM, por serem amigos e estarem sempre presentes para ajudar a todos os seus pupilos. Por não agir somente como orientadores e sim como família, tal como um pai e uma irmã (especialmente para Dy), aconselhando, reclamando quando necessário, cuidando, respeitando e se importando com cada um dos seus alunos. Amo vocês de coração.

Um especial agradecimento a Dyana Leal, por ter embarcado comigo neste sonho que foi idealizar esse projeto, por me guiar em cada momento que me vi perdida acreditando que poderia não dar tempo, por ficar extremamente feliz com cada resultado positivo obtido na construção deste trabalho, por nunca desistir de mim e lutar comigo fielmente até o fim, por ser assim do jeitinho que você é amiga, sincera, companheira e uma ótima orientadora. Agradeço a honra de ser sua Co-orientanda oficialmente.

A cada membro que compõe a família LBCM, que sempre estão aptos e se dispendo a ajudar uns aos outros. A Ana Paula Sampaio por ser grande amiga e companheira, ajudando nos momentos de sufoco e nas análises de dados do projeto, a Catarina Fernandes e Amanda Aliança por me ajudar com os experimentos, a Eduarda Mangueira por ajudar com análise de gel, a Iany Raissa por estar ali sempre ajudando com os deveres do laboratório, a Elverson Melo por todo

seu apoio técnico nas tecnologias que a gente não sabe mexer, a Grasielle Vaz por ser minha personal Office Word, a Carmelita Lima, Nairomberg Portela, Rubens Rocha, Alberon Araújo, Jefferson Freitas, Guilherme Varela, Rafael Padilha, Gabriel Gazzoni... enfim a todos que juntos formam a grande família LBCM, um muito obrigada, amo todos vocês.

As colaborações realizadas com Dra Célia Castro e sua aluna Thacianna Costa.

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM), ao Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) e ao LIKA por toda a estrutura disponível, que proporcionou o desenvolvimento deste projeto.

Ao programa de Pós-graduação em Medicina Tropical.

A CAPES pelo auxílio financeiro e pela concessão da minha bolsa.

Por fim , a todos os funcionários do CPqAM e LIKA.

*Sou quem sou,  
porque somos todos nós*

*(Autor desconhecido)*

## RESUMO

*Pseudomonas aeruginosa* é uma importante causa de infecções apresentando, no Brasil, altas taxas de morbidade e mortalidade. Os principais mecanismos de resistência utilizados por *P. aeruginosa* são a produção de  $\beta$ -lactamases e a expressão de bombas de efluxo. O uso de IgG e antibióticos para tratamento destas infecções tem apresentado resultados bem sucedidos, o que motiva a realização de estudos quanto a atividade *in vitro* da IgG humana com antibióticos frente a isolados de *P. aeruginosa*. O objetivo deste estudo foi detectar a presença dos genes de resistência, a relação clonal, o tempo de morte em isolados de *P. aeruginosa* provenientes de Infecções relacionadas à saúde (IrAS) de hospitais públicos do Recife-PE, em 2014, e verificar *in vitro* a taxa de fagocitose e a produção de óxido nítrico (NO) por monócitos humanos quando infectados por *P. aeruginosa* tratada com IgG humana em associação a Meropenem e Polimixina E. Foram avaliados 32 isolados para a detecção de genes de resistência por PCR, e para a avaliação de similaridade genética por ERIC-PCR. Destes, foram selecionados os 5 isolados apresentando maior número de genes de resistência e menor similaridade genética. Esses cinco isolados foram submetidos às associações dos sub-CIMs destes antibióticos com a IgG humana, para a determinação do tempo de morte, da taxa de fagocitose de células bacterianas e para a dosagem de NO por monócitos humanos. Foi detectado a presença do gene *bla*<sub>KPC</sub> em dois isolados de *P. aeruginosa*. Todos os isolados possuem os genes *mexR*, *mexB*, *mexE* e *rpsL*, apenas um isolado foi negativo para os genes *mexA* e *mexF*. Foram detectados 30 perfis genéticos distintos entre os isolados bacterianos. O tempo de morte dos isolados revelou que os tratamentos combinados com antibióticos, principalmente Polimixina E, são mais letais para as células bacterianas. A taxa de fagocitose por monócitos humanos revelou que quando infectados com bactéria tratada com IgG mais antibiótico, os monócitos ficam mais ativos à fagocitose e reduz drasticamente a quantidade de células bacterianas. Houve diferença significativa na produção de NO naqueles tratados com Meropenem e IgG. Com o presente estudo concluiu-se que a combinação de IgG mais antibiótico pode ser uma alternativa para o tratamento dessas infecções, pois a bactéria estará em número reduzido facilitando a fagocitose.

Palavras chaves: *Pseudomonas aeruginosa*. IgG. Antibióticos. Infecções

## ABSTRACT

*Pseudomonas aeruginosa* is a major cause of introducing infections. In Brazil, it has a high rate of morbidity and mortality. The main mechanisms of resistance used for *Pseudomonas aeruginosa* are  $\beta$ -lactamase and efflux pumps expression. The use of IgG and antibiotics to treat these infections has shown successful results, which provides motivation for studies and *in vitro* activity of human IgG with antibiotics against *P. aeruginosa* isolates. The aim of this study was to detect the presence of resistance genes, the genetic relationship, the time of death in isolates of *P. aeruginosa* from health-related infections (HAI) of public hospitals in Recife in 2014, and to evaluate *in vitro* phagocytosis rate and nitric oxide (NO) production by human monocytes infected by *P. aeruginosa* treated with human IgG in association with Meropenem and Polymyxin E. 32 isolates were evaluated for the presence of resistance genes by PCR, and for the assessment of genetic similarity by ERIC-PCR. Five isolates with more resistance genes and low genetic similarity were selected. These strains were subjected to sub-MICs associations of these antibiotics with human IgG, for determining the time of death, phagocytosis rate of the bacterial cells and for the measurement of NO production by human monocytes. *bla*<sub>KPC</sub> gene was detected in two isolates. All isolates were positives to *mexR*, *mexB*, *mexE* and *rpsL*. One isolate was negative for the genes *mexA* and *mexF*. 30 distinct genetic profiles were detected. The time of death test showed that the combined treatments with antibiotics, especially Polymyxin E, are more lethal. The rate of phagocytosis by human monocytes showed that when infected with bacteria treated with another antibiotic IgG, monocytes were more active in phagocytosis and drastically reduces the amount of bacterial cells. There were significant differences in NO production in those treated with Meropenem and IgG. In conclusion, our results reveal that antibiotic and IgG combination can be an alternative for treating such infections because the bacteria will be reduced in number facilitating phagocytosis.

Key boards: *Pseudomonas aeruginosa*. IgG. Antibiotics. Infection

## LISTA DE FIGURAS

|                    |                                                                                                                                                       |    |
|--------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>FIGURA 1 –</b>  | Modelos estruturais e funcionais das bombas de efluxo de <i>P. aeruginosa</i> .....                                                                   | 26 |
| <b>FIGURA 2 –</b>  | Contexto genético de genes codificadores de proteínas constituintes dos sistemas de efluxo MexAB-OprM e MexEF-OprN em <i>P. aeruginosa</i> .....      | 27 |
| <b>FIGURA 3 –</b>  | Imagem ilustrativa de gel de agarose 1,5% mostrando a detecção da presença do gene <i>bla<sub>KPC</sub></i> em isolados de <i>P. aeruginosa</i> ..... | 43 |
| <b>FIGURA 4 –</b>  | Dendograma da genotipagem por ERIC-PCR de 32 isolados de <i>P. aeruginosa</i> provenientes de IrAS de dois hospitais públicos do Recife- PE.....      | 44 |
| <b>FIGURA 5 –</b>  | Imagem ilustrativa de gel de agarose a 1,5% mostrando o padrão de bandas dos isolados de <i>P. aeruginosa</i> obtidos pela técnica de ERIC-PCR.....   | 45 |
| <b>FIGURA 6 –</b>  | Micrografias de monócitos desafiados com isolados de <i>P. aeruginosa</i> submetidos a IgG humana.....                                                | 50 |
| <b>FIGURA 7 –</b>  | Micrografias de monócitos desafiados com isolados de <i>P. aeruginosa</i> submetidos a IgG humana, meropenem e polimixina E..                         | 51 |
| <b>FIGURA 8 –</b>  | Produção de óxido nítrico por monócitos humanos desafiados pelo isolado 685 de <i>P. aeruginosa</i> em diferentes condições-teste.....                | 52 |
| <b>FIGURA 9 –</b>  | Produção de óxido nítrico por monócitos humanos desafiados pelo isolado 257 de <i>P. aeruginosa</i> em diferentes condições-teste.....                | 52 |
| <b>FIGURA 10 –</b> | Produção de óxido nítrico por monócitos humanos desafiados pelo isolado 59 de <i>P. aeruginosa</i> em diferentes condições-teste.....                 | 53 |
| <b>FIGURA 11 –</b> | Produção de óxido nítrico por monócitos humanos desafiados pelo isolado 22 de <i>P. aeruginosa</i> em diferentes condições-teste.....                 | 53 |
| <b>FIGURA 12 –</b> | Figura 10. Produção de óxido nítrico por monócitos humanos desafiados pelo isolado 140 de <i>P. aeruginosa</i> em diferentes condições-teste.....     | 53 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                      |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>TABELA 1</b> – Primers para detecção dos genes de resistência <i>bla</i> <sub>KPC</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX</sub> ,<br><i>bla</i> <sub>VIM</sub> , e <i>bla</i> <sub>IMP</sub> .....            | 34 |
| <b>TABELA 2</b> – Primers para a detecção dos genes que compõem as bombas de<br>efluxo MexAB-OprM e MexEF-OprM e o gene ribossomal<br><i>rpsL</i> .....                                              | 35 |
| <b>TABELA 3</b> – Perfil clonal, fenotípico e genético de resistencia dos isolados de<br><i>P. aeruginosa</i> obtidos em Recife-PE.....                                                              | 40 |
| <b>TABELA 4</b> – Isolados representativos de <i>P. aeruginosa</i> selecionados quanto ao<br>perfil clonal genético e fenotípico de resistência.....                                                 | 46 |
| <b>TABELA 5</b> – Tempo de morte e taxa de fagocitose dos isolados de <i>P.</i><br><i>aeruginosa</i> submetidos por 8 horas ao meropenem, polimixina E<br>eIgG humana, sozinhos e em combinação..... | 47 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|          |                                                                   |
|----------|-------------------------------------------------------------------|
| µg       | Micrograma                                                        |
| µl       | Microlitro                                                        |
| µM       | Micromolar                                                        |
| BHI      | <i>Brain heart infusion</i>                                       |
| AmpC     | adenosina 3',5'-monofosfato cíclico                               |
| CAZ      | Ceftazidima                                                       |
| CDT      | <i>Clostridium difficile toxin</i>                                |
| CIM      | Concentração Inibitória mínima                                    |
| CLSI     | <i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>                    |
| CTX-M    | cefotaximase, primeiramente isolada em Munich                     |
| DNA      | Ácido Desoxirribonucléico                                         |
| EDTA     | Ácido etilenodiamino tetracético                                  |
| ERIC-PCR | <i>Enterobacterial Repetitive Intergenics Consensus-basec PCR</i> |
| ESBLs    | <i>β-Lactamases de espectro estendido</i>                         |
| PFGE     | <i>Pulsed-field gel electrophoresis</i>                           |
| GES      | <i>Guiana-Extended-Spectrum</i>                                   |
| GIM      | <i>German imipenemase</i>                                         |
| IgG      | Imunoglobulina G                                                  |
| IMP      | Impipenemase                                                      |
| IrAS     | Infecções relacionadas à assistência à saúde                      |
| ITU      | Infecções do trato urinário                                       |
| IVIG     | <i>Human intravenous immunoglobulin</i>                           |
| Kb       | Quilo base                                                        |
| KPC      | <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase                        |
| LIKA     | Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami                         |
| LPS      | Lipopolissacarideo                                                |
| M        | Molar                                                             |
| MBLs     | metalo-β-lactamases                                               |
| ml       | Mililitro                                                         |
| mM       | Milimolar                                                         |
| MRSA     | <i>Staphylococcus aureus</i> meticilina resistente                |

|         |                                                                     |
|---------|---------------------------------------------------------------------|
| MSSA    | <i>Staphylococcus aureus</i> suscetível a meticilina                |
| MTT     | <i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i> |
| ng      | nanograma                                                           |
| nm      | Nanômetro                                                           |
| NO      | <i>Nitric Oxid</i>                                                  |
| OXA     | Oxacilinase                                                         |
| Pb      | Pares de bases                                                      |
| PBP     | <i>Penicillin binding proteins</i>                                  |
| PCR     | <i>Polymease Chain Reaction</i>                                     |
| pH      | Potencial de Hidrogênio                                             |
| pmol    | Picomol                                                             |
| PMDR    | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> multidroga-resistente                 |
| ROS     | <i>reactive oxygen species</i>                                      |
| SHV     | <i>Sulfhydryl reagent variable</i>                                  |
| SIM     | <i>Seoul imipenemase</i>                                            |
| SPM     | São Paulo Metallo- $\beta$ -lactamase                               |
| Sub-CIM | Sub-Concentração Inibitória Mínima                                  |
| TBE     | Tris-borato EDTA                                                    |
| UFC     | Unidade Formadora de Colônia                                        |
| UFPE    | Universidade Federal de Pernambuco                                  |
| UTIs    | Unidades de Terapias intensivas                                     |
| UV      | Ultravioleta                                                        |
| VIM     | <i>Verona integron-encoded metallo-<math>\beta</math>-lactamase</i> |

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                                                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b>                                                                                                                                                                                                                       | 15 |
| <b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b>                                                                                                                                                                                                            | 17 |
| 2.1 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>                                                                                                                                                                                                         | 17 |
| 2.2 Antibioticoterapia para infecções por <i>P. aeruginosa</i>                                                                                                                                                                            | 18 |
| 2.3 Resistência de <i>P. aeruginosa</i> a antimicrobianos                                                                                                                                                                                 | 21 |
| 2.4 Tipagem molecular                                                                                                                                                                                                                     | 27 |
| 2.5 Imunoglobulina G (IgG) como adjuvante no tratamento de infecções bacterianas                                                                                                                                                          | 28 |
| <b>3 OBJETIVOS</b>                                                                                                                                                                                                                        | 31 |
| 3.1 Geral                                                                                                                                                                                                                                 | 31 |
| 3.2 Específicos                                                                                                                                                                                                                           | 31 |
| <b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>                                                                                                                                                                                                             | 32 |
| 4.1 Desenho do estudo                                                                                                                                                                                                                     | 32 |
| 4.2 Local do estudo                                                                                                                                                                                                                       | 32 |
| 4.3 População alvo                                                                                                                                                                                                                        | 32 |
| 4.4 Considerações éticas                                                                                                                                                                                                                  | 32 |
| 4.5 Isolados bacterianos                                                                                                                                                                                                                  | 33 |
| 4.6 Extração de DNA                                                                                                                                                                                                                       | 33 |
| 4.7 Quantificação de DNA                                                                                                                                                                                                                  | 33 |
| 4.8 Determinação da presença dos genes de resistência <i>bla</i> <sub>KPC</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX</sub> , <i>bla</i> <sub>VIM</sub> , e <i>bla</i> <sub>IMP</sub> e dos genes que compõem as bombas de efluxo MexAB-OprM e MexEF-OprN | 33 |
| 4.9 ERIC-PCR                                                                                                                                                                                                                              | 35 |
| 4.10 Seleção dos isolados                                                                                                                                                                                                                 | 35 |
| 4.11 Concentração Inibitória Mínima (CIM)                                                                                                                                                                                                 | 36 |
| 4.12 Formação inicial dos grupos experimentais                                                                                                                                                                                            | 36 |
| 4.13 Tempo de morte dos isolados bacterianos                                                                                                                                                                                              | 37 |
| 4.14 Determinação da taxa de fagocitose                                                                                                                                                                                                   | 37 |
| 4.15 Dosagem de Óxido Nítrico (NO)                                                                                                                                                                                                        | 38 |
| 4.16 Análises estatísticas                                                                                                                                                                                                                | 38 |
| <b>5 RESULTADOS</b>                                                                                                                                                                                                                       | 39 |
| 5.1 Determinação do perfil fenotípico e genético de resistência de <i>P. aeruginosa</i>                                                                                                                                                   | 39 |

|                                                                                      |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 5.2 ERIC-PCR .....                                                                   | 43        |
| 5.3 CIM frente ao meropenem e polimixina E e seleção dos isolados representativos... | 46        |
| 5.4 Tempo de morte.....                                                              | 46        |
| 5.5 Taxa de fagocitose (TF).....                                                     | 49        |
| 5.6 Dosagem de Oxido Nítrico (NO).....                                               | 52        |
| <b>6 DISCUSSÃO .....</b>                                                             | <b>54</b> |
| <b>7 CONCLUSÃO.....</b>                                                              | <b>57</b> |
| <b>REFERÊNCIAS .....</b>                                                             | <b>58</b> |
| <b>APÊNDICE .....</b>                                                                | <b>64</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

Os mecanismos de resistência utilizados por *Pseudomonas aeruginosa* a torna capaz de inibir ou driblar a ação de diferentes tipos de antimicrobianos utilizados na prática clínica (GAYATHRI; ERAMMA; DEVARAJA, 2012). Em *P. aeruginosa* os principais mecanismos de resistência incluem a produção  $\beta$ -lactamases, a perda de porinas e a super expressão de bombas de efluxo (DUMAS et al. 2005, NEVES et al. 2011; GAYATHRI; ERAMMA; DEVARAJA, 2012; JÁCOME et al. 2012;).

Estudos realizados no Brasil e em outros países demonstraram a presença de *P. aeruginosa* isolados de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IrAs), produtores de diversas classes de  $\beta$ -Lactamases. Relatando a coexistência de isolados Produzindo Metallo- $\beta$ -lactamases, Metallo- $\beta$ -lactamase juntamente com uma carbapenemase e também a produção de Metallo- $\beta$ -lactamase ou carbapenemase com uma ESBL. O aumento dos relatos da disseminação de infecções por *P. aeruginosa* produtoras de  $\beta$ -Lactamases evidencia a necessidade de mais estudos que possibilitem detectar e analisar genes de resistência para a produção de  $\beta$ -Lactamases em isolados bacterianos dessa espécie.

A expressão de bombas de efluxo também tem demonstrado grande destaque como causa de resistência a potentes antimicrobianos em *P. aeruginosa*, (DUMAS et al. 2005). Sacha et al. (2014) observaram em isolados de *P. aeruginosa*, obtidos de Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) de hospitais na polônia, uma alta prevalência de genes que codificam o sistema de bomba de efluxo MexAB-OprM, chegando a quase cem por cento dos isolados.

Tradicionalmente a Imunoglobulina G Intravenosa Humana (IVIG) tem sido utilizada como terapia de reposição para pacientes com imunodeficiência de imunoglobulinas. Entretanto em alguns países, o tratamento com imunoglobulina G (IgG) e antibióticos para graves infecções por diferentes espécies bacterianas tem revelado resultados bem sucedidos, o que motiva e evidencia a importância da realização de mais estudos quanto a atividade *in vitro* da IgG humana frente isolados de IrAS de diferentes espécies bacterianas, incluindo *P. aeruginosa*. Tanaka et al. (2010) realizaram estudo *in vitro* utilizando uma cepa de *P. aeruginosa* resistente a carbapenêmicos. Este estudo comprovou que a IVIG causa efeitos prejudiciais às células bacterianas, como alterações morfológicas, levando a morte celular, em comparação com a submissão da mesma cepa ao carbapenêmico meropenem.

Farag et al. (2013) demonstraram que a IVIG aumentou significativamente a morte de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA) por neutrófilos em todas as concentrações testadas (0,1-5 mg/mL) com aumento dos níveis de produção de NO e ROS

dependente da dose testada de IVIG e redução da atividade hemolítica e coagulação de MRSA.

O estudo realizado por Laupland (2002) analisou a lógica e evidências para o uso de IVIG para a profilaxia e tratamento de infecções, em estudos dos tipos: prospectivo, randomizado e ensaios clínicos controlado com placebo. Demonstrando taxas de incidência mais baixa de infecção devido ao tratamento com a IVIG, especialmente em casos de pneumonia pós-cirúrgica. Porém esses estudos não têm mostrado diminuição significativa da mortalidade e apresentaram reduções variáveis no uso de antimicrobianos e no tempo de internação em UTIs. Concluindo que o tratamento com IVIG como adjuvante é promissor, mas é ainda conflitante.

O relato crescente de resistência a antibióticos utilizados na prática clínica em isolados de *P. aeruginosa* tem se tornado um problema comum que pode complicar o tratamento de pacientes infectados com esta espécie bacteriana (HENGZHUANG et al., 2013; JABALAMELI et al., 2012). A dificuldade de tratamento de IrAS causadas por *P. aeruginosa* motiva a investigação do perfil genético de resistência em diferentes locais do mundo e a possível contribuição do uso da IVIG humana associada a antimicrobianos no tratamento destas infecções. Este estudo teve o objetivo de determinar a relação clonal de isolados de *P. aeruginosa* obtidos de IrAS em Recife-PE, detectar a presença dos genes de resistência e analisar a contribuição da IgG humana na modificação da taxa de fagocitose e produção de óxido nítrico *in vitro* por monócitos humanos desafiados com isolados de *P. aeruginosa* submetidos ao meropenem, polimixina E e IgG humana.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria gram-negativa, aeróbica e baciliforme pertencente à família Pseudomonaceae (KONEMAN et al., 2008; FATIMA et al., 2012), a maioria das cepas dessa família apresentam motilidade por meio de um ou mais flagelos polares, utilizam oxidativamente glicose e outros carboidratos e em geral são citocromos oxidases-positivas. Como característica chave *P. aeruginosa* apresenta produção de pigmento hidrossolúvel, a pioverdina, que aparece como uma florescência branca a azul-esverdeada sob a luz ultravioleta e piocianina que produz um característico azul hidrossolúvel (KONEMAN et al., 2008). *P. aeruginosa* é uma bactéria relativamente fácil de ser reconhecida em cultura, levando-se em consideração as características de suas colônias, a formação de pigmento e seu odor típico. Suas colônias têm variação morfológica, podendo ser puntiforme, gelatinosa, rugosa ou mucosa. A forma mucóide ocorre devido à produção de grandes quantidades de um polissacarídeo extracelular, o alginato (FERREIRA H; LALA E. R. P., 2010), *P. aeruginosa* habita comumente solos, água e vegetais, em geral ambientes úmidos, além de fazer parte da microbiota normal de seres humanos, podendo ser encontrado na pele, garganta e nas fezes de indivíduos saudáveis (KONEMAN et al., 2001; MATA; ABEGG, 2007; LOVEDAY et al., 2013;).

*P. aeruginosa* é a espécie bacteriana mais frequentemente associada a doenças em seres humanos, em que atua como um agente patogênico oportunista, com o potencial de causar infecções em quase qualquer órgão ou tecido do corpo e que causa infecções graves como septicemias, infecções pulmonares e urinárias, queratite, endoftalmite, infecção de úlcera córnea que acometem principalmente pacientes queimados, com fibrose cística, leucemia aguda, transplantados de órgãos, e em uso de drogas endovenosas e também pacientes imunossuprimidos (MATA; ABEGG, 2007; KONEMAN et al., 2008; FERREIRA; LALA, 2010; JABALAMELI et al., 2012; LOVEDAY et al., 2013; DJORDJEVIC et al., 2013). Com frequência regular, aparecem na bibliografia casos isolados de endocardite, meningite, abscessos cerebrais e infecções ósseas por disseminação hemática (KONEMAN et al., 2008).

As infecções são em geral observadas em sítios onde existe a tendência de acúmulo de umidade: traqueostomias, cateteres permanentes, queimaduras, ouvido externo e em feridas

cutâneas exsudativas. *P. aeruginosa* produz várias substâncias consideradas como responsáveis pelo aumento de colonização e infecção dos tecidos do hospedeiro. Essas substâncias, junto com uma variedade de fatores de virulência, incluindo lipopolissacarídeo (LPS), exotoxina A, leucocidina, viscosidade extracelular, proteases, fosfolipases e várias outras enzimas, tornam *P. aeruginosa* a bactéria de maior importância clínica entre os bacilos gram-negativos não fermentadores (KONEMAN et al., 2008). Tornando-se cada vez mais difícil tratar infecções por *P. aeruginosa* multidroga-resistente (PMDR) devido à limitação de opções terapêuticas para combater essa bactéria (SATO et al., 2008).

No Reino Unido, *Pseudomonas spp.* é a sétima causa mais frequente de bacteremia, representando aproximadamente 4% dessas infecções e com uma incidência de 7,3 por 100.000 habitantes da população. Há provas da alta incidência de severas doenças causadas por *Pseudomonas spp.* com recente e significativo aumento nos relatos de bacteremia na Inglaterra e País de Gales. Há também uma série de surtos por *P. aeruginosa* que afetam UTIs e que têm destacado o potencial de *Pseudomonas spp.* em estabelecer reservatórios microbianos no ambiente de saúde. Em contraste com outros agentes patogênicos, *P. aeruginosa* prospera no ambiente ao longo de uma ampla gama de temperaturas e são muito hábeis em explorar circunstâncias relativamente pobres em nutrientes. A sua cápsula polissacarídica lhe permite aderir superfícies e sob condições favoráveis as células multiplicam-se rapidamente sobre as superfícies em contato com sistemas de fornecimento de água para formar um biofilme. Embora a maioria das bactérias permaneça retida no interior do biofilme, algumas irão se tornar livres a flutuação na água (planctônicas) especialmente quando a água fica estática por períodos prolongados (LOVEDAY et al., 2013).

No Brasil, *P. aeruginosa* é uma importante causa de infecções, sendo considerada a primeira causa de pneumonia em ambiente hospitalar e a terceira causa de infecções primárias na corrente sanguínea em UTIs (JÁCOME et al., 2012), apresentando altas taxas de morbidade e mortalidade (PICOLI, 2008; DJORDJEVIC et al., 2013; HATTEMER et al., 2013), no qual alguns estudos (JÁCOME et al., 2012) têm associado sua presença a uma disseminação clonal da espécie (NEVES et al., 2011).

## 2.2 Antibioticoterapia para infecções por *P. aeruginosa*

Antimicrobianos são compostos naturais ou sintéticos capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de fungos ou bactérias. Podem ser classificados como bactericidas, quando causam a morte da bactéria, ou bacteriostáticos, quando promovem a inibição do crescimento microbiano (GUIMARÃES, DENISE OLIVEIRA MOMESSO, LUCIANO DA SILVA PUPO, 2010).

O grupo de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos é formado pelas penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas, carbapenêmicos, nocardinas e monobactâmicos. São geralmente obtidos a partir de culturas de microorganismos como fungos e bactérias, sendo produtos naturais que sofreram manipulações químicas, dando origem a um grande número de derivados semi-sintéticos. Há mais de 50 anos, os  $\beta$ -lactâmicos tem demonstrado sua eficiência terapêutica e sua baixa toxicidade. Inicialmente eram mais ativos contra as bactérias gram-positivas, esses antibióticos tiveram seus espectros antibacterianos ampliados, originando novos antibióticos, permitindo o combate também de bactérias gram-negativas. Alguns destes antibióticos se mostram resistentes às  $\beta$ -lactamases. Os carbapenêmicos ainda apresentam uma ampla e potente atividade antibacteriana (PENILDON, 2010).

Os  $\beta$ -lactâmicos formam o grupo de antibióticos que agem sobre as proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs), que são uma classe de enzimas que catalisam as ultimas fases da biossíntese do peptidoglicano dentro do espaço periplasmático e são essenciais para o crescimento e divisão das células bacterianas (LEGAREE; ADAMS; CLARKE, 2007; GUIMARÃES, DENISE OLIVEIRA MOMESSO, LUCIANO DA SILVA PUPO, 2010). Assim, atuam diretamente na membrana celular de bactérias gram-positivas e membranas plasmáticas das bactérias gram-negativas. O antibiótico  $\beta$ -lactâmico penicilina, tem um efeito letal em bactérias (ZEBA, 2005; KONEMAN et al., 2008) devido à ligação às PBPs, fazendo-se passar pelo próximo elemento a ser adicionado à cadeia de glicopeptídeo em formação. Uma vez inserida, a molécula de penicilina impede o alongamento posterior da cadeia glicopeptídica. Os diferentes membros desse grupo apresentam afinidades distintas para as diversas PBPs, podendo ligar-se a mais de uma dessas proteínas (KONEMAN et al., 2008). Os danos causados por  $\beta$ -lactâmicos às bactérias particularmente no estado de crescimento vêm da sua capacidade para se ligar e inativar transpeptidases. Este processo de inativação de enzimas do cross-linking interrompe a constituição fisiológica normal do peptidoglicano da parede celular e induz a lise e a morte celular (ZEBA, 2005).

Os carbapenêmicos são comumente considerados como antibióticos de último recurso e assumem um grande papel no tratamento de graves infecções causadas por bactérias multidroga-resistentes (BREILH et al., 2013; VOULGARI et al., 2013) incluindo *P.*

*aeruginosa* (LINDEN P., 2007). Ao longo da última década, o aparecimento de isolados resistentes aos carbapenêmicos é um fator de grande importância por reduzir as opções terapêuticas atuais, portanto, deixando poucos ou, em alguns casos, nenhuma opção terapêutica ideal para combater esses microorganismos (VOULGARI et al., 2013).

Os carbapenêmicos são uma classe de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos que substituem um átomo de carbono por um de enxofre e acrescentam uma ligação dupla ao núcleo de penicilina. Inibem a síntese da parede celular e possuem um espectro de atividade especialmente amplo (TORTORA, 2005). Os carbapenêmicos, antibióticos  $\beta$ -lactâmicos de amplo espectro, foram introduzidos em 1985 e durante anos tem sido o agente mais importante para o tratamento de infecções causadas por bactérias multidroga-resistentes (ZARRILLI et al., 2009).

Carbapenêmicos antipseudomonas têm desempenhado um útil papel na terapia de infecções por essa espécie bacteriana nos últimos 20 anos. No entanto, a dose ideal de carbapenêmicos pode ser perdida devido a concepções errôneas do risco/benefício, por uma janela terapêutica estreita a patógenos resistentes que requerem doses mais elevadas, e também as questões de custos. Para melhorar a sua utilização, várias iniciativas devem ser consideradas: aumentar a conscientização sobre o tratamento adequado em todos os departamentos do hospital, determinar os regimes ideais de dosagem, o uso de, ou em combinação com um agente antimicrobiano alternativo de farmacocinética e farmacodinâmica mais favorável e administrar carbapenêmicos mais recentes com menor propensão para o desenvolvimento de resistência (BREILH et al., 2013).

Imipenem, meropenem e ertapenem são os carbapenêmicos disponíveis atualmente na prática clínica nos EUA, Europa e Brasil. Apresentam amplo espectro de ação para uso em infecções sistêmicas e são estáveis à maioria das  $\beta$ -lactamases. (ANVISA, 2015).

Meropenem é um antibacteriano carbapenêmico parenteral com excelente atividade antimicrobiana contra uma ampla gama de bactérias Gram-negativas, bactérias gram-positivos e anaeróbicos (LINDEN P., 2007). Apesar de que em relação à atividade antimicrobiana deste carbapenêmico, o meropenem é mais ativo contra bactérias gram-negativas, ao passo que o imipenem apresenta atividade um pouco superior contra gram-positivos. O ertapenem não tem atividade contra *P. aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* (ANVISA, 2015). Os resultados do Mystic (Meropenem anual Suscetibilidade Teste Coleta de Informações) programa, um estudo de resistência global em curso envolvendo 120 centros de denúncia em 32 países, indicam que meropenem continua a exibir sustentável potência e um amplo espectro de atividade contra

cepas bacterianas resistentes a antibacterianos, incluindo *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* e *Acinetobacter spp* (LINDEN P., 2007).

As polimixinas são antimicrobianos polipeptídeos com mecanismo de ação distinto dos demais antimicrobianos utilizados atualmente. Dessa forma, a possibilidade de resistência cruzada com outros antimicrobianos é muito remota, permitindo que as polimixinas sejam ativas contra muitas espécies de bactérias MDR. Há duas polimixinas disponíveis comercialmente, colistina (polimixina E) e polimixina B (ANVISA, 2015).

Dadas às limitações de opções terapêuticas, os médicos voltaram ao uso das polimixinas para a maioria das infecções por bactérias resistentes apesar de sua toxicidade. A colistina age destruindo a membrana celular bacteriana, aumentando assim a permeabilidade, levando a morte celular. A colistina é um antibiótico bactericida contra espécies gram negativas com efeito dependente da concentração. Existem relatos sobre resistência às polimixinas, possivelmente como um resultado das alterações da membrana externa ou mecanismos de bombas de efluxo. Estudos relatam a cura ou melhora pela colistina numa taxa de 57-77% de pacientes em estado grave com infecções por bactérias MDR, incluindo pneumonia, bacteremia, septicemia, infecção intra-abdominal, e infecção do sistema nervoso central (MARAGAKIS; PERL, 2008).

A colistina e outras polimixinas são peptídeos catiônicos cíclicos produzidos pela bactéria *Bacillus polymyxa*. Três mecanismos que conferem resistência à colistina são conhecidos: (1) modificação específica do lipídeo A, um componente da membrana externa, resultando na redução da carga negativa da membrana externa; (2) clivagem proteolítica das drogas; e (3) ativação de uma bomba de efluxo de amplo espectro. (ADAMS et al., 2009).

As polimixinas são ativas contra uma grande variedade de bacilos gram-negativos fermentadores e não-fermentadores incluindo *P. aeruginosa* e *Acinetobacter spp.* e também muitas espécies de enterobactérias, como *Escherichia coli* e *Klebsiella spp.* Desta forma, as polimixinas têm sido utilizadas na prática clínica no tratamento de infecções graves por bacilos gram-negativos MDR como *P.aeruginosa* e *A.baumannii*, principalmente, no tratamento de pneumonias associadas à assistência à saúde, infecções da corrente sanguínea relacionadas a cateteres, nas infecções do sítio cirúrgico e infecções do trato urinário. Entretanto, o pouco conhecimento sobre suas propriedades farmacológicas e eficácia clínica limitam sua utilização (ANVISA, 2015).

### 2.3 Resistência de *P. aeruginosa* a antimicrobianos

A resistência apresentada por diferentes espécies bacterianas aos antimicrobianos tornou-se um problema de saúde pública e de grande preocupação em todos os campos da saúde (NERI, 2010). A importância clínica da infecção por *P. aeruginosa* caracteriza-se pela expressão de múltipla resistência aos antibacterianos associada a uma difícil erradicação da doença, conseqüentemente com elevados índices de morbidade e mortalidade. Esse microrganismo pode apresentar resistência natural ou adquirida à grande número de antibióticos utilizados na prática clínica (NEVES et al., 2011).

*P. aeruginosa* abriga vários mecanismos de resistência, o que proporciona isolados MDR (resistente a três ou mais classes de agentes anti-Pseudomonas), ou isolados pan-resistentes (resistência a todos os antibióticos utilizados clinicamente) (JÁCOME et al., 2012). A perda de sensibilidade aos antimicrobianos pode ser decorrente da: a) perda de porinas; b) presença de proteínas de ligação as penicilinas (PBP) com baixa afinidade por carbapenêmicos; c) super expressão de bombas de efluxo; d) hidrólise enzimática. Entre os mecanismos responsáveis pela resistência aos carbapenêmicos, a impermeabilidade da membrana, devido à perda de porinas ou a super expressão das bombas de efluxo, conferem uma resistência adicional a várias classes de antibióticos, como resultado de um efeito cascata gerado por múltiplos mecanismos de resistência inter-relacionados (NEVES et al., 2011).

Infelizmente para quimioterapia e para o tratamento clínico,  $\beta$ -lactamases podem ser consideradas como absolutas armas moleculares bacterianas. Estas enzimas provavelmente já existiam antes da descoberta dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, e podem desempenhar outros papéis em bactérias. Sobre a origem destas enzimas, hoje é aceita de que as  $\beta$ -lactamases são o resultado da conversão de PBPs por transformação genética. Isto significa que ambos os tipos de proteínas têm uma ancestral comum.  $\beta$ -lactamases foram descritas pela primeira vez, como uma enzima capaz de destruir a penicilina por Abraham et al. em 1940 (ZEBA, 2005).

As  $\beta$ -lactamases estão entre os mais heterogêneos grupos de enzimas de resistência. Mais de 700 distintas  $\beta$ -lactamases já foram descritas. Estas proteínas são globulares compostas por alfa e beta hélices pregueada em forma de folhas. Apesar de uma quantidade significativa de variabilidade de sequências de aminoácidos, as  $\beta$ -lactamases possuem partes comum de uma topologia global (PEREZ et al., 2007).

Um esquema de classificação para  $\beta$ -lactamases com base funcional das características foi apresentado por BUSH; JACOBY; MEDEIROS, em 1995. Três grandes grupos de enzimas são definidos pelo seu substrato e perfis inibitórios: grupo 1 cefalosporinases que não são bem inibidas pelo ácido clavulânico; grupo 2 penicilinases, cefalosporinases e  $\beta$ -

lactamases de amplo espectro, que são geralmente inibidos por  $\beta$ -lactamases dirigida ao sítio ativo; e o grupo 3 incluindo as metallo- $\beta$ -lactamases que hidrolisam as penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos e que são inibidas pelo ácido clavulânico (BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995).

Já em outro estudo de Bush *et al.* realizado em 2010, essa classificação das  $\beta$ -lactamases tem sido tradicionalmente baseada nas características funcionais das enzimas ou na sua estrutura primária. A classificação mais simples é feita pela sequência de proteína, em que as  $\beta$ -lactamases são classificados em quatro classes moleculares: A, B, C, e D, com base na conservação e distinção de aminoácidos. Classes A, C, e D incluem enzimas que hidrolisam os seus substratos por formação de uma enzima acil através de uma serina no sítio ativo, enquanto classe B das  $\beta$ -lactamases são metalo-enzimas que utilizam pelo menos um íon zinco no sítio ativo para facilitar a hidrólise do  $\beta$ -lactâmico. Embora uma abordagem estrutural seja a maneira mais fácil e menos polêmica de se classificar um conjunto tão diverso de enzimas, a classificação funcional proporciona a oportunidade de relacionar estas enzimas variadas para seu papel clínico, isto é, fornecendo resistência seletiva para as diferentes classes de  $\beta$ -lactâmicos (BUSH; JACOBY, 2010).

Juntamente com outros bacilos gram-negativos, *P. aeruginosa* tem apresentado aumento no perfil de resistência as cefalosporinas de espectro ampliado de uso hospitalar, ocasionando uso de antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos de maior potencia, como os carbapenêmicos (PICOLI, 2008). Sendo o desenvolvimento de resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos em isolados clínicos de *P. aeruginosa* um problema comum no tratamento de infecções pulmonares crônicas em pacientes com fibrose cística (HENGZHUANG et al., 2013).

A capacidade de *P. aeruginosa* em causar doença é reforçada por uma resistência tanto inata quanto adquirida a muitos antimicrobianos e desinfetantes, a um alto grau de fatores de virulência e a uma capacidade de se adaptar a uma ampla gama de ambientes (HATTEMER et al., 2013) associada a uma difícil erradicação da doença, e consequentemente com elevados índices de morbidade e mortalidade (NEVES et al., 2011). Estes mecanismos de resistência a torna capaz de destruir ou driblar diferentes tipos de antibióticos, inclusive os antibióticos utilizados na prática clínica, como os  $\beta$ -lactâmicos que são a classe de antibióticos comumente prescritos para o tratamento de infecções bacterianas (GAYATHRI; ERAMMA; DEVARAJA, 2012), para isso esta espécie bacteriana utiliza mecanismos de resistência como a produção  $\beta$ -lactamases (enzimas que degradam os antimicrobianos), a perda de porinas (perda de proteínas que formam um canal na membrana externa da bactéria, que permite a

entrada de antimicrobianos na célula bacteriana) e a super expressão de bombas de efluxo (bombeamento ativo de antimicrobianos do meio intracelular para o extracelular) (NEVES et al., 2011; GAYATHRI; ERAMMA; DEVARAJA, 2012; JÁCOME et al., 2012; ANVISA, 2015).

Resistência a carbapenêmicos nas famílias Enterobacteriaceae e não Enterobacteriaceae, principalmente em *P. aeruginosa* (ANVISA, 2015), tem sido atribuída à aquisição de genes específicos responsáveis pela produção de enzimas que hidrolisam carbapenêmicos; diminuição da absorção de antibióticos, devido a defeitos na permeabilidade da membrana externa em função da coexistência da hiper produção de AmpC  $\beta$ -lactamase, ou expressão de ESBL e bombas de efluxo. Enzimas que hidrolisam carbapenêmicos foram agrupados de acordo com a classificação de Ambler, que se baseia na sequência e homologia estrutural. Atualmente, as espécies de Enterobacteriaceae e não Enterobacteriaceae foram ligadas a enzimas da classe A dos tipos KPC, SME, IMI, NMC e GES, e Carbapenemases classe B da IMP, VIM, NDM, GIM, SPM e categorias SIM e oxacillinases, como o OXA-48 e suas variantes (PICÃO et al., 2008; VOULGARI et al., 2013).

As MBLs demonstraram disseminação mundial. Enzimas dos tipos VIM e IMP têm sido relatadas como endêmica no sul da Europa e na região asiática do Pacífico (VOULGARI et al., 2013). A Carbapenemase do tipo KPC foi identificada inicialmente nos EUA em isolados de *Klebsiella pneumoniae*, tendo apresentado uma gradual expansão global provavelmente devido à sua localização em elementos genéticos moveis como, plasmídeos, transposons e/ou integrons (VOULGARI et al., 2013). Enzimas KPC estão entre os  $\beta$ -lactamases mais comuns mediando resistência aos carbapenêmicos entre os isolados de Enterobacteriaceae. Enzimas KPC são  $\beta$ -lactamases de classe A que além de carbapenêmicos, também conferem resistência a cefalosporinas de espectro estendido (TENOVER et al, 2006).

A membrana externa das bactérias Gram-negativas, assim como outras membranas biológicas, é fundamentalmente formada por uma bicamada lipídica, que apresenta pouca permeabilidade a solutos hidrolíticos, como os nutrientes. A penetração e a expulsão de compostos ocorrem por meio de canais proteicos de difusão inespecíficos, denominados porinas de membrana externa (OMP), que são proteínas capazes de formar canais constituídos de água em seu interior, o que permite a difusão passiva de solutos hidrofílicos através da membrana externa. Esses canais de difusão foram detectados em todas as espécies de bactérias Gram-negativas. As OMP das bactérias Gram-negativas têm sido classificadas e caracterizadas segundo sua atividade, estrutura funcional, regulação e expressão (NEVES, 2011).

Em *P. aeruginosa*, diferentes porinas podem ser encontradas em sua membrana externa, cada qual com sua função, como OprC, OprD, OprE e OprF. Entre elas, a OprF é a mais abundante e, provavelmente, a mais utilizada para difusão da maioria dos betalactâmicos no interior da bactéria. OprC e OprE são canais inespecíficos, utilizados por alguns antimicrobianos. A presença de OprD, também denominada porina D2, tem sido amplamente investigada, uma vez que a ausência ou mesmo a expressão reduzida do gene *oprD*, codificador dessa porina, tem contribuído para a resistência aos carbapenêmicos, especialmente ao imipenem (NEVES, 2011)..

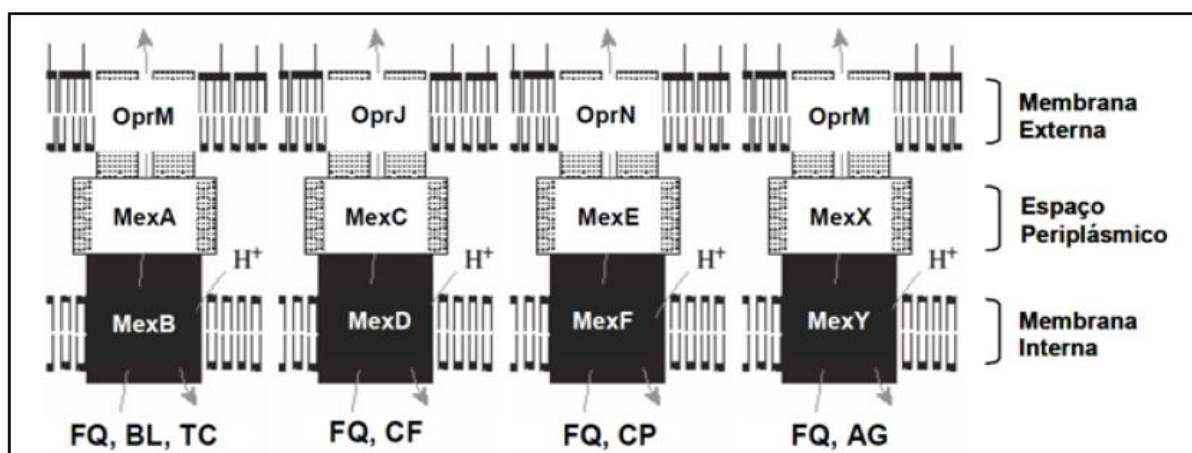
Além das porinas, são partes constituintes das membranas bacterianas, outros canais de difusão constituídos por proteínas triméricas, chamadas bombas de efluxo. A bomba de efluxo é o mecanismo desenvolvido pela bactéria para expelir compostos tóxicos de seu interior, incluindo-se os agentes antibacterianos. Alterações nestes canais poderão dificultar a entrada de antibióticos. Ambos os sistemas podem atuar em conjunto, fato muito comum em amostras de *P. aeruginosa*, potencializando suas ações, tornando a bactéria com resistência plena a alguns antibióticos (FERREIRA; LALA, 2010; NEVES, 2011).

A principal função das bombas de efluxo presentes em *P. aeruginosa* é exportar substâncias tóxicas ou metabolitos secundários, assim como a excreção de moléculas sinalizadoras que governam a comunicação celular. Os antibióticos estão entre esses compostos tóxicos e a extrusão dos mesmos compromete a eficácia terapêutica. Muitos genes codificadores de bombas de efluxo para múltiplos antimicrobianos são expressos constitutivamente, conferindo resistência intrínseca aos mesmos (FERREIRA; LALA, 2010; NEVES et al., 2011).

Os sistemas de efluxo de *P. aeruginosa* pertencem à família *resistance-nodulation-cell division* (RND). Esses sistemas têm como base a abertura de um canal que atravessa as membranas interna e externa da bactéria, permitindo a remoção de moléculas para o exterior celular. O genoma de *P. aeruginosa* contém genes que codificam sistemas de efluxo da família RND denominados *multidrug efflux pump* (*mex*), dos quais dez já foram caracterizados: MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN, MexXYOprM, MexGHI, OpmD, MexVW-OprM, MexPQOpmE, MexMN-OprM e TriABC-OpmH. Esses sistemas são denominados *multidrug-resistance* (MDR), pois são capazes de conferir resistência a um amplo espectro de quimioterápicos. Entre as bombas de efluxo caracterizadas em *P. aeruginosa*, a expressão de quatro sistemas (MexABOprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN e MexXY-OprM) foi relatada entre isolados clínicos e relacionados com a resistência a múltiplos antibióticos (NEVES et al., 2011).

As bombas de efluxo de bactérias Gram-negativas constituem um sistema tripartite de proteínas de transporte que se localizam ao longo da membrana interna (proteína constituída por uma bomba de transporte ativo, dependente de energia – *mexB*, *mexD*, *mexF* ou *mexY*), periplasma (proteína transmembrana que une os outros dois componentes – *mexA*, *mexC*, *mexE* ou *mexX*) e membrana externa (proteína formadora de canal extrusor, também denominada porina – *oprJ*, *oprM* ou *oprN*) (figura 1) (NEVES et al., 2011).

Figura 1: Modelos estruturais e funcionais das bombas de efluxo de *P. aeruginosa*.

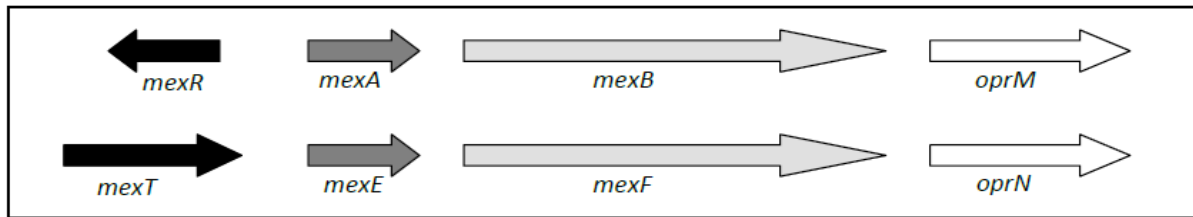


Fonte: NEVES et al., 2011

Nota: Modelos estruturais e funcionais das bombas de efluxo de *P. aeruginosa*, indicando a localização das proteínas constituintes da bomba e ação preferencial a determinados tipos de substratos. FQ: fluoroquinolona; BL: betalactâmico; TC: tetraciclina; CF: cefalosporina; CP: carbapenêmico; AG: aminoglicosídeo.

Entre os substratos preferenciais das bombas de efluxo presentes em isolados clínicos de *P. aeruginosa*, os carbapenêmicos estão presentes nos sistemas MexAB-OprM e MexEF-OprN. MexAB-OprM foi a primeira bomba de efluxo da família RND caracterizada em *P. aeruginosa*. Esse sistema compromete a ação de vários antibacterianos, inclusive meropenem, mas não inclui o imipenem devido às diferenças em sua estrutura molecular. A expressão desse sistema é regulada pela inserção da proteína *mexR* na região entre os genes *mexR* e *mexA* (região promotora), atuando, assim, como repressora (figura 2). MexEF-OprN está relacionado com resistência ao imipenem, pois sua expressão é dependente da presença da proteína *mexT* (codificada pelo gene *mexT*), que atua como ativadora pós-transcricional (NEVES et al., 2011).

Figura 2: Contexto genético de genes codificadores de proteínas constituintes dos sistemas de efluxo MexAB-OprM e MexEF-OprN em *P. aeruginosa*.



Fonte: NEVES et al., 2011

Nota: Cada operon contém os genes que codificam os componentes dos sistemas de efluxo: regulador transcricional (preto) e proteínas de membrana interna (cinza claro), periplasmática (cinza escuro) e de membrana externa (branco). Ambos os sistemas são responsáveis por fenótipos carbapenem-resistentes na espécie estudada.

As bombas de efluxo são codificadas por elementos genéticos localizados em cromossomos como a MexAB-OprM e em algumas espécies elas têm sido detectadas em elementos genéticos móveis como a MexEF-OprN, o que pode facilitar a propagação dos genes de efluxo, contribuindo para a resistência intrínseca e adquirida, permitindo a bactéria sobreviver em ambientes hostis, como, por exemplo, na presença de antibióticos e desinfetantes. A organização genética das bombas de efluxo da família RND em *P. aeruginosa* é governada por operons. Cada operon contém os genes que codificam os componentes dos sistemas de efluxo (proteínas de membrana interna, periplasmática e de membrana externa). O aumento da expressão das bombas de efluxo, ou superexpressão, pode ser mediado por mutações (em um gene regulador proximal [*mexR*, *mexT*] ou na região promotora do gene transportador [*mexB*, *mexF*]) ou por elementos de inserção localizados na região anterior ao gene transportador (NEVES. et al., 2011, PONSUCK et al, 2014).

## 2.4 Tipagem molecular

Um método de tipagem é definido como qualquer método utilizado para diferenciação de isolados bacterianos pertencente à mesma espécie. A essência da utilização de métodos de tipagem é ser capaz de comparar os isolados quanto sua semelhança genética afim de alocar as cepas em grupos que apresentem alta similaridade. Métodos de tipagem devem cumprir três critérios principais, devendo apresentar elevado poder discriminatório entre os isolados não relacionados, alta reprodutibilidade e tipabilidade (OLSEN et al. 2011).

Investigações de IrAS geralmente exigem a tipagem dos isolados bacterianos envolvidos para identificação das cepas relacionadas com o surto e distinção de epidemias de isolados endêmicos ou esporádicos. Dados de tipagem de cepas, particularmente aqueles que

são gerados pela utilização de métodos moleculares mais recentes, têm sido úteis para a investigação de surtos causados por diversos patógenos bacterianos, incluindo *Staphylococcus aureus* metilicina resistente (MRSA), enterococcus vancomicina resistente (VRE), *P. aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*. As abordagens moleculares, que incluem a eletroforese em gel de campo pulsátil (PFGE), reação em cadeia da polimerase com primers arbitrários (PCR-AP), *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* (ERIC-PCR) e *plasmid fingerprint* (PF), têm várias vantagens sobre os métodos de tipagem tradicional, incluindo o maior poder discriminatório, maior aplicabilidade para uma variedade de espécies bacterianas, e em alguns casos velocidade de execução da técnica. Embora muitos desses métodos mais recentes sejam utilizados em laboratórios clínicos e de referência em todo o mundo, muitas vezes há discordância sobre como interpretar os resultados. Na maioria dos casos, o foco da discussão refere-se ao grau de variabilidade nos resultados dos testes. (TENOVER; ARBEIT; GOERING, 1997; SILBERT et al. 2014).

## 2.5 Imunoglobulina G (IgG) como adjuvante no tratamento de infecções bacterianas

Os anticorpos ou imunoglobulinas são proteínas circulantes produzidas pelos vertebrados em resposta à exposição a estruturas não próprias conhecidas como antígenos. São incrivelmente diversos e específicos em sua capacidade de reconhecimento de estruturas moleculares não próprias, sendo mediadores primários da imunidade humoral contra todas as classes de micro-organismos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012).

A IgG, um isótipo de imunoglobulina apresenta as seguintes funções: opsonização, ativação do sistema complemento, citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpo, imunidade neonatal e auto-inibição do linfócito B (ABBAS ; LICHTMAN; PILLAI, 2012).

Tradicionalmente, Imunoglobulina Intravenosa humana (IVIG) tem sido utilizada como terapia de reposição para pacientes com deficiências de imunoglobulinas primárias ou secundárias. Cada vez mais, IVIG estar sendo utilizada (em doses mais elevadas do que para a terapia de reposição) em certas doenças infecciosas bacterianas ou virais (FERRARA; ZUMLA; MAEURER, 2012). Uma variedade de modos de ação tem sido atribuída aos efeitos benéficos da IVIG, incluindo sua interação com a função das células T, células apresentadoras de antígenos, além de maturação das células de apresentação com efeito geral sobre as reações inflamatórias. Mais frequentemente, IVIG está sendo avaliado em ensaios clínicos para o tratamento de infecções crônicas refratárias e difíceis de tratar. A evidência, dos mecanismos moleculares, e as razões para o uso da terapia adjunta com IVIG em doenças infecciosas são

revisadas, e seu uso potencial no tratamento adjunto da tuberculose resistente a medicamentos, difícil de tratar é discutido (FERRARA; ZUMLA; MAEURER, 2012).

No Japão e em outros países, o tratamento com IgG do soro humano e antibióticos para graves infecções por diferentes espécies bacterianas tem revelado resultados bem sucedidos, o que motiva a realização de estudos quanto a atividade *in vitro* da IgG humana frente a isolados de diferentes espécies bacterianas, incluindo *P. aeruginosa*. TANAKA et al., em 2010 realizaram estudo utilizando uma cepa de *P. aeruginosa* resistente a carbapenêmicos, isolada a partir de paciente internado no Hospital Universitário em Tóquio, Japão. Após 2 h de incubação com o carbapenêmico meropenem, a contagem de bactérias em crescimento diminuiu na mesma proporção que a submissão do isolado ao soro humano após 30 min. Também foram observadas nas células bacterianas, alterações morfológicas como a formação de células bacterianas redondas, esferoplastos e protuberâncias tipicamente observadas durante bacteriólise quando submetido ao carbapenêmico meropenem. As células que não estavam em fase de crescimento logarítmico não apresentaram essas alterações morfológicas. Em contraste, no tratamento com soro, ocorreu a coagulação das células bacterianas após 1 minuto em ambas as fases, as células sofreram lise entre 10 e 30 minutos induzida pelo anticorpo do soro. Adicionalmente, quando *P. aeruginosa* foi incubado em soro depletado de IgG, a lise bacteriana e a deposição deste anticorpo não foram observadas.

FARAG et al. em 2013 investigaram o efeito *in vitro* da IVIG na capacidade dos neutrófilos humanos em fagocitar e matar isolados de *Staphylococcus aureus* metilicina resistente (MRSA), utilizando o ensaio de MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) e determinando a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO). Também avaliaram a eficiência da IVIG na neutralização da  $\alpha$  - hemolisina e coagulase dos MRSA e a capacidade de IVIG no tratamento e prevenção de infecções por isolados MRSA utilizando modelo murino de peritonite. Os resultados demonstraram que a IVIG aumentou significativamente a morte de MRSA por neutrófilos em todas as concentrações testadas (0,1-5 mg/mL) por 30-80% dos valores do controle. Foi aumentado significativamente o nível de produção de NO de maneira dependente da dose testada de IVIG. O nível de ROS também aumentou significativamente na presença de IVIG. Além disso, IVIG reduziu significativamente em 10 vezes a atividade hemolítica de MRSA e a sua capacidade de coagulação por 50%. Quando testado *in vivo*, os grupos que receberam IVIG por infusão na veia da cauda não mostrou melhoria significativa na sua sobrevivência, enquanto que os que receberam o IVIG no mesmo local da infecção apresentaram uma melhoria da sobrevivência.

O estudo realizado por LAUPLAND, em 2002 analisou a lógica e evidências para o uso de IVIG para a profilaxia e tratamento de infecção em pacientes adultos em estado crítico, em cinco estudos dos tipos: prospectivo, randomizado e ensaios clínicos controlado com placebo. Estes estudos demonstraram taxas de incidência mais baixa de infecção com o tratamento profilático com a IVIG, especialmente os casos de pneumonia pós-cirúrgica entre pacientes criticamente doentes. Porém, esses estudos não têm mostrado diminuição significativa da mortalidade devido à terapia IVIG e tiveram reduções variáveis no uso de antimicrobianos e no tempo de internação em UTI. Este estudo conclui que o tratamento com IVIG como adjuvante é promissor, mas é ainda conflitante. Ainda assim estes estudos não analisam, no entanto, as alterações induzidas pela submissão de isolados de *P. aeruginosa* a outros  $\beta$ -lactâmicos em associação a IgG humana.

SALCEDO et al. em 1997 examinaram se o tratamento com IVIG pode ser eficaz em pacientes com colite pseudomembranosa grave que não respondem a terapia antimicrobiana padrão. Neste estudo, os dois pacientes responderam rapidamente demonstrando resolução da diarreia, do desconforto abdominal e da distensão. Todas as preparações de imunoglobulinas testadas continham IgG contra toxinas A e B do *Clostridium difficile*, verificada por meio de ELISA que neutralizou a atividade citotóxica de toxinas do *C. difficile in vitro* em concentrações de IgG de 0,4-1,6 mg/ml. Pode-se concluir que a imunoterapia passiva com IVIG pode ser uma útil adição para a terapia antibiótica para colite pseudomembranosa grave e que a antitoxina IgG está presente em preparados de imunoglobulina padrão, com atividade neutralizante evidente em concentrações de IgG facilmente conseguidas no soro por administração de IVIG.

SAITO et al., em 2011 também examinaram a eficácia da IVIG em *C.difficile toxin* (CDT) - medida pela letalidade e lesão celular em camundongos. Todos os ratos do grupo controle morreram dois dias após a injeção do preparado de CDT. Os efeitos máximos de IVIG (100 % de sobrevivência) foram observados quando os ratos foram tratados com IVIG ao mesmo tempo em que a injeção de CDT. Os efeitos IVIG estavam intimamente associados com a melhora da permeabilidade vascular intestinal e danos na mucosa do intestino. Além disso, a redução de um marcador de apoptose (fragmentos de DNA associada à histona) foi demonstrada em ratos tratados com IVIG. Demonstrando que IVIG pode ser protetora contra letalidade do CDT, quando administrada no momento adequado. Os presentes dados sugerem também um aumento da permeabilidade intestinal.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

Análise da ação do meropenem e Polimixina E com a IgG humana frente isolados de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de infecções relacionadas à Assistência à Saúde.

#### 3.2 Específicos

Em isolados de *P. aeruginosa* provenientes de IrAS de hospitais públicos do Recife:

- Determinar a relação clonal;
- Detectar a presença e dos genes de resistência *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>CTX</sub>, *bla*<sub>SPM</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, e *bla*<sub>IMP</sub>;
- Detectar a presença dos genes que compõem e regulam os sistemas de bombas de efluxo MexAB-OprM (*mexA*, *mexB* e *mexR*) e MexEF-OprN (*mexE*, *mexF*);
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos isolados bacterianos selecionados aos antibióticos meropenem e polimixina E;
- Determinar o tempo de morte dos isolados bacterianos selecionados aos antibióticos meropenem e polimixina E;
- Determinar a taxa de fagocitose e a produção de óxido nítrico por monócitos humanos desafiados com isolados de *P. aeruginosa* submetidos aos antibióticos meropenem ou polimixina E e/ou imunoglobulina G.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Desenho do estudo

Este estudo apresenta um desenho do tipo experimental. Este é o tipo de estudo mais adequado para detectar a presença dos genes de resistência e genes que compõem bombas de efluxo MexAB-OprM e MexEF-OprM em isolados de *P. aeruginosa*, assim como para avaliar a taxa de fagocitose das células bacterianas e a produção de óxido nítrico por monócitos humanos quando desafiados *in vitro* com isolados bacterianos previamente submetidos a IgG humana, em associação ou não aos antibióticos polimixina E e meropenem.

### 4.2 Local do estudo

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Departamento de Parasitologia assim como no Núcleo de plataformas Tecnológicas I (NPT I) do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - CPqAM/FIOCRUZ e também no laboratório de Microscopia Eletrônica do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA/UFPE), os quais apresentam estrutura e equipamentos necessários para o cumprimento dos objetivos referentes ao projeto.

### 4.3 População alvo

Isolados bacterianos da espécie *P. aeruginosa* proveniente de IrAS de dois hospitais públicos de Recife-PE, fornecidos pelos laboratórios dos respectivos hospitais.

### 4.4 Considerações éticas

Os procedimentos descritos para a utilização experimental dos referidos isolados bacterianos de *P. aeruginosa* não necessitam serem encaminhados à Comissão de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE), já que os isolados bacterianos se tratam de amostras secundárias cedidas por laboratórios e não dispomos de nenhum contato ou dados de pacientes. Os monócitos humanos utilizados neste estudo foram gentilmente cedidos pela Dra.

Célia Maria Machado Barbosa de Castro do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – UFPE.

#### 4.5 Isolados bacterianos

Para a realização deste estudo foram utilizados 32 isolados bacterianos da espécie *P. aeruginosa* provenientes de pacientes com IrAS, obtidos de dois hospitais públicos da região metropolitana do Recife - PE, nos anos de 2012 e 2014. Todos os isolados bacterianos foram identificados quanto a espécie e perfil de susceptibilidade fenotípica no hospital de origem, utilizando o sistema automatizado VITEK 2 (BioMérieux).

#### 4.6 Extração de DNA

A extração de DNA total dos isolados bacterianos de *P. aeruginosa* foi realizada utilizando o kit *Wizard® Genomic DNA purification Kit* (Promega), segundo instruções do fabricante. As amostras bacterianas foram crescidas em caldo BHI (Brain Heart Infusion) por 24 horas a 37°C e 1 ml da cultura foi utilizado para realização da extração. O DNA total extraído foi reidratado com 50 µl de solução de reidratação de DNA para armazenamento a -20°C.

#### 4.7 Quantificação de DNA

O DNA dos isolados de *P. aeruginosa* foi quantificado utilizando o equipamento Nanodrop Thermo Scientific no Núcleo de Plataformas Tecnológicas - NPT do CPqAM/FIOCRUZ.

#### 4.8 Determinação da presença dos genes de resistência *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>CTX</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, e *bla*<sub>IMP</sub> e dos genes que compõem as bombas de efluxo MexAB-OprM e MexEF-OprN

A análise da presença dos genes para produção de β-lactamases *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>CTX</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, e *bla*<sub>IMP</sub> e dos genes que compõem as bombas de efluxo MexAB-OprM (*mexA*, *mexB* e *mexR*) e MexEF-OprM (*mexE*, *mexF*) nos 32 isolados de *P. aeruginosa*, foi realizada pela técnica de PCR convencional, utilizando primers descritos anteriormente (tabelas 1 e 2). Foi utilizado como controle das reações de PCR a detecção do gene ribossomal *rpsL*. As reações

de amplificação foram realizadas utilizando um volume total de 25 µl por tubo, compreendendo: 1µl de DNA genômico a 20ng/µl, 1U da enzima *Taq* DNA polimerase (Promega), 200 µM do desoxirribonucleotídeo trifosfato (GeHealthcare), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 15 pmol dos primers, além de 2,5 µl de tampão (10x).

As amplificações foram realizadas em termociclador (Biometra), utilizando a seguinte ciclagem: 5 minutos a 96°C para desnaturação, seguido de 35 ciclos consistindo cada ciclo de 1 minuto a 96°C para desnaturação, 1 minuto a temperatura otimizada para anelamento e 1 minuto a 72°C para extensão. Após os 35 ciclos, será realizada uma etapa de alongamento final de 10 minutos a 72°C (BRADFORD et al., 2004). Em todas as reações de amplificação foram utilizados controles positivos e negativos.

Para a visualização dos resultados, os amplicons foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corados com 1 µl de Blue green (LGC Biotecnologia) e migrados com tampão TBE 0,5x em cuba de eletroforese horizontal por 50 minutos, sob as seguintes condições: 100V, 150mA, 400W. Os produtos da amplificação foram visualizados sob luz ultravioleta em transiluminador (Transiluminator LOCCUS biotecnologia – L. PIX) e em seguida fotodocumentados.

Tabela 1: Primers para detecção dos genes de resistência *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>CTX</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, e *bla*<sub>IMP</sub>.

| Primers                | sequência                                                    | Produto de PCR (pb) | Temperatura de anelamento (°C) | Gene                      | Referência                         |
|------------------------|--------------------------------------------------------------|---------------------|--------------------------------|---------------------------|------------------------------------|
| KPC 1F<br>KPC R        | 5'-GCTACACCTAGCTCCACCTTC-3'<br>5'-TATTTTCCGAGATGGGTGAC-3'    | 371                 | 66                             | <i>bla</i> <sub>KPC</sub> | (MOLAND, 2003; YIGIT et al., 2001) |
| MA1<br>MA2             | 5'-SCSATGTGCAGYACCAGTAA-3'<br>5'-CCGCRATATGRTTGGTGGTG-3'     | 543                 | 63                             | <i>bla</i> <sub>CTX</sub> | (SALADIN et al., 2002)             |
| VIM-DIA-F<br>VIM-DIA-R | 5'-CAGATTGCCGATGGTGTGG-3'<br>5'-AGGTGGGCCATTCAGCCAGA-3'      | 523                 | 62                             | <i>bla</i> <sub>VIM</sub> | (DONG et al., 2008)                |
| IMP-DIA-F<br>IMP-DIA-R | 5'-GGAATAGAGTGGCTTAATTCTC-3'<br>5'-GTGATGCGTCYCCAAYTTCACT-3' | 364                 | 60                             | <i>bla</i> <sub>IMP</sub> | (DONG et al., 2008)                |

Tabela 2: Primers para a detecção dos genes que compõem as bombas de efluxo MexAB-OprM e MexEF-OprM e o gene ribossomal *rpsL*.

| Primers                  | Sequência                                                          | Produto de PCR (pb) | Temperatura de anelamento (°C) | Gene        | Referência             |
|--------------------------|--------------------------------------------------------------------|---------------------|--------------------------------|-------------|------------------------|
| mexR1<br>mexR2           | 5'-CGCGAGCTGGAGGGAAGAAACC-3'<br>5'-CGGGGCAAACAACCTCGTCATGC-3'      | 150                 | 57                             | <i>mexR</i> | (DUMAS et al., 2005)   |
| mexA1<br>mexA2           | 5'-CGACCAGGCCGTGAGCAAGCAGC-3'<br>5'-GGAGACCTTCGCCGCGTTGTCGC-3'     | 316                 | 60                             | <i>mexA</i> | (DUMAS et al., 2005)   |
| mexBMRTup<br>mexBMRTdown | 5'-ACTTCTTCAGCTTCAAGGAC-3'<br>5'-GAGCATGAGGAACCTTGTTG-3'           | 155                 | 54                             | <i>mexB</i> | (POONSUK et al., 2014) |
| mexE4<br>mexE5           | 5'-CCAGGACCAGCACGAACCTTCTTGC-3'<br>5'-CGACAACGCCAAGGGCGAGTTCACC-3' | 114                 | 60                             | <i>mexE</i> | (DUMAS et al., 2005)   |
| mexFRTup<br>mexFRTdown   | 5'-CATCGAGATCTCCAACCT-3'<br>5'-GTTCTCCACCACACGAT-3'                | 350                 | 54                             | <i>mexF</i> | (POONSUK et al., 2014) |
| rpsL-F<br>rpsL-R         | 5'-GCAAGCGCATGGTCGACAAGA-3'<br>5'-CGCTGTGCTCTTGCAGGTTGTGA-3'       | 201                 | 60                             | <i>rpsL</i> | (DUMAS et al., 2005)   |

#### 4.9 ERIC-PCR

A determinação da relação clonal dos 32 isolados bacterianos de *P. aeruginosa* foi determinada pela técnica de ERIC-PCR (JÁCOME et al., 2012). As reações de amplificação foram preparadas num volume total de 25 µl por tubo, que compreende: 100ng de DNA genômico, 200 µM de cada desoxirribonucleótido trifosfato (Invitrogen), tampão 10x, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 1.0 U de DNA Taq polimerase (Invitrogen) e 20 pmol dos primers ERIC-1 (5'-ATGTAAGCT CCTGGGGATTAC-3') e ERIC-2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'). Seguindo os seguintes parâmetros de amplificação: 95 ° C durante 3 minutos, seguido por 40 ciclos de desnaturação a 92 ° C durante 1 minuto, hibridação a 36 ° C durante 1 minuto e extensão a 72 ° C durante 8 minutos, seguido por uma extensão final de 16 minutos a 72 ° C. A tipagem foi realizada após eletroforese dos amplicons em gel de agarose a 1,5% corados com *Blue green* (LGC Biotec) sob constante tensão de 100V. A análise dos dados e dendrograma foram realizadas utilizando o software Past 2.17.

#### 4.10 Seleção dos isolados

Para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e tempo de morte dos isolados frente ao meropenem (Sigma) e polimixina E (Sigma) e da taxa de fagocitose e dosagem da produção de Óxido Nítrico (NO) por monócitos humanos, foram selecionados cinco isolados bacterianos de *P. aeruginosa*, usando como critérios para a seleção dos isolados a baixa relação clonal, presença de maior quantidade de genes de resistência e de genes que compõem os sistemas de bombas de efluxo investigados (Tabela 4).

#### 4.11 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

As CIMs de meropenem e polimixina E foram determinadas para os cinco isolados de *P. aeruginosa* selecionados. O teste de microdiluição em caldo foi realizado segundo as normas do *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI-2013) utilizando as cepas de referência de *P. aeruginosa* ATCC 27853 e a *E. coli* ATCC 25922 como controle de qualidade.

Os isolados bacterianos foram inoculados em 1 ml de caldo BHI e mantidos por 18 horas em estufa a 37° C. O inóculo foi comparado e ajustado com a escala 0,5 de MacFarland, correspondente a  $10^7$  CFU/ml. Em seguida foi realizada uma diluição seriada 1:1 com caldo Mueller hinton, adicionando-se a quantidade do antibiótico a ser testado no caldo, atingindo a concentração desejada. Por fim foi adicionado em cada poço 2µl de cultura bacteriana ajustada. Os inóculos finais foram mantidos a 37° C em estufa de crescimento por 18 horas para determinação da CIM dos isolados frente os antibióticos testados.

Os CIMs para os isolados bacterianos foram determinados usando concentrações derivadas de diluições duplas seriadas em base 2 (0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 e 256 µg/ml). O critério de sensibilidade e resistência utilizado foi o proposto pelo CLSI (2013).

#### 4.12 Formação inicial dos grupos experimentais

Após análise dos resultados das CIMs dos isolados bacterianos frente ao meropenem e polimixina E (tabela 4), foram selecionadas sub-concentrações Inibitórias Mínimas (sub-CIMs) na qual os isolados apresentaram visualmente crescimento bacteriano (turbidez em relação ao controle negativo), para posterior realização dos experimentos de tempo de morte, taxa de fagocitose e dosagem de NO (Tabela 5). Os isolados bacterianos foram submetidos aos sub-CIMs de meropenem (sigma) e polimixina E (sigma) isoladamente ou em associação com 4mg/µl de imunoglobulina G humana (Endobulin Kiovig - BAXTER).

#### 4.13 Tempo de morte dos isolados bacterianos

Para a determinação do tempo de morte os isolados bacterianos selecionados foram submetidos à sub-CIMs dos antibióticos meropenem e polimixina E isoladamente, combinados e em associação a IgG humana (tabela 5).

Este experimento foi realizado em placas de cultura, com volume final de um ml, contendo caldo Mueller Hinton, antibióticos meropenem, polimixina E e/ou IgG humana atingindo as concentrações desejadas, adicionado de 2 µl de cultura bacteriana ajustada a escala de 0,5 macfarland. Os inóculos finais foram colocados a 37° C em estufa de crescimento e foram realizados semeios em placas contendo meio de cultura solido BHI + Agar bacteriológico, após 2, 5 e 8 horas de incubação, para contagem das unidades formadoras de colônia (UFC).

#### 4.14 Determinação da taxa de fagocitose

Com a análise dos resultados do tempo de morte (Tabela 5), os isolados com as combinações testadas que apresentaram crescimento em meio de cultura sólido, com 8 horas de incubação, foram selecionados para a avaliação da taxa de fagocitose e dosagem de óxido nítrico por monócitos humanos desafiados com os isolados de *P. aeruginosa* dos respectivos grupos experimentais.

A taxa de fagocitose e dosagem de óxido nítrico foi realizada segundo protocolo descrito anteriormente por Moraes et al. (2013). Brevemente, 100 µl de inóculo bacteriano ajustado a escala 0,5 de MacFarland, obtido após crescimento por 8 horas nas diferentes condições testes, foram submetidos aos monócitos em 1 ml de meio de cultura RPMI. Posteriormente, o volume final obtido foi colocado em lâmina de microscopia óptica para incubação a 37°C em atmosfera úmida a 5% de CO<sub>2</sub> por 1 hora. Após a incubação o sobrenadante foi retirado para a dosagem de óxido nítrico e as lâminas foram coradas e montadas para a microscopia óptica. A análise da taxa de fagocitose foi realizada em percentual de monócitos realizando fagocitose de células bacterianas. Em todos os experimentos foi incluso um grupo de monócitos desafiados com células bacterianas sem submissão a antibióticos ou IgG humana e um grupo nas mesmas condições testes sem a presença de células bacterianas.

#### 4.15 Dosagem de Óxido Nítrico (NO)

A produção de NO foi determinada por meio da concentração de nitrito do sobrenadante da cultura celular, conforme protocolo descrito por Moraes et al. (2013), utilizando os mesmos grupos experimentais e concentrações descritas na tabela 5 para a taxa de fagocitose. Brevemente, 50  $\mu$ l dos sobrenadantes coletados dos diferentes grupos experimentais foi adicionado 50  $\mu$ l de reagente de Griess (1,5% de sulfanilamida em 5% de  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 0,1% em  $\text{H}_2\text{O}$  de dicloridrato de etilenodiamina naftil). A dosagem de NO foi realizada em triplicata. Depois de 15 minutos em repouso e à temperatura ambiente, a leitura foi realizada por ELISA (BioRad, Modelo 680) utilizando filtro de 550 nm. A concentração do nitrito foi calculada através da média de absorbância das triplicatas técnicas por comparação com a média da curva padrão. Em todos os experimentos foi incluso um controle constituído de monócitos desafiados com os isolados bacterianos sem submissão a antibióticos ou IgG humana.

#### 4.16 Análises estatísticas

Utilizando o software GraphPad Prism 5.0, a análise de variância (ANOVA) foi aplicada para a comparação das médias entre os diferentes grupos experimentais. Quando os resultados da ANOVA revelaram diferença estatisticamente significativa, foram realizados os testes de significância de Dunnett's para comparar os níveis de NO produzido por monócitos desafiados com bactérias tratadas em relação ao controle (sem tratamento), e teste de Turkey's para comparar aos pares os níveis de NO produzido por monócitos desafiados com bactérias tratadas. Os resultados foram expressos em média. A significância foi definida por  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Determinação do perfil fenotípico e genético de resistências de *P. aeruginosa*

Todos os isolados de *P. aeruginosa* apresentam resistência a pelo menos uma classe de antimicrobianos utilizados na prática clínica (Tabela 3). Os genes de resistência *bla*<sub>CTX</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, e *bla*<sub>IMP</sub> codificantes da ESBL CTX-M e das metallo-β-lactamases VIM e IMP respectivamente, não foram detectados em nenhum dos 32 isolados de *P. aeruginosa* incluídos neste estudo. No entanto, em dois isolados bacterianos (22 e 140) foi detectado a presença do gene *bla*<sub>KPC</sub>, o qual codifica a produção da carbapenemase KPC (Figura 1).

Todos os isolados de *P. aeruginosa* possuem o gene *mexB* e *mexR* respectivamente, codificantes da proteína de transporte ativo *mexB* e do regulador transcricional *mexR*, da bomba de efluxo constitutiva MexAB-OprM. Dos 32 isolados de *P. aeruginosa*, apenas o isolado 140 não apresentou o gene *mexA*, codificante da proteína periplasmática constituinte do sistema de efluxo citado (Tabela 3).

Adicionalmente, todos os isolados de *P. aeruginosa* possuem o gene *mexE*, codificante da proteína de membrana periplasmática *mexE*. No entanto, apenas o isolado 140 não apresentou o gene *mexF* codificante da proteína de transporte ativo da bomba de efluxo MexEF-OprN. Todos os isolados de *P. aeruginosa* apresentaram positividade para o gene ribossomal *rpsL*, utilizado como controle das reações de PCR (Tabela 3).

Tabela 3. Perfil clonal, fenotípico e genético de resistência dos isolados de *P. aeruginosa* obtidos em Recife-PE.

| Isolados | Origem /Ano | Perfil de resistência fenotípica <sup>a</sup>                               | <i>mexA</i> | <i>mexR</i> | <i>mexF</i> | <i>MexE</i> | <i>mexB</i> | <i>rpsL</i> | <i>bla<sub>VIM</sub></i> | <i>bla<sub>IMP</sub></i> | <i>bla<sub>KPC</sub></i> | <i>bla<sub>CTX</sub></i> | ERIC-PCR |
|----------|-------------|-----------------------------------------------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|----------|
| 1026.3   | A / 2012    | CEFO                                                                        | +           | +           | +           | +           | +           | +           | -                        | -                        | -                        | -                        | P24      |
| 1039.3   | A / 2012    | CEFO                                                                        | +           | +           | +           | +           | +           | +           | -                        | -                        | -                        | -                        | P28      |
| 685.3    | A / 2012    | CEFO                                                                        | +           | +           | +           | +           | +           | +           | -                        | -                        | -                        | -                        | P22      |
| 570.3    | A / 2012    | CEFO, CAZ, PIPER                                                            | +           | +           | +           | +           | +           | +           | -                        | -                        | -                        | -                        | P29      |
| 575.3    | A / 2012    | ANIC, AZT, CEFO, CAZ, CIPRO, GENTA, MERO, IMIP, PIPER                       | +           | +           | +           | +           | +           | +           | -                        | -                        | -                        | -                        | P30      |
| 175      | B / 2014    | CEFURO, CEFURA, CAZ, CFT, CFP, MERO, IMIP, AMICA, CIPRO                     | +           | +           | +           | +           | +           | +           | -                        | -                        | -                        | -                        | P13      |
| 194      | B / 2014    | CEFURO, CEFURA, CAZ, CFT, CFP, AMICA, GENTA, CIPRO                          | +           | +           | +           | +           | +           | +           | -                        | -                        | -                        | -                        | P21      |
| 342      | B / 2014    | CEFURO, CEFURA, CAZ, CFT, CFP, AMICA, GENTA, CIPRO                          | +           | +           | +           | +           | +           | +           | -                        | -                        | -                        | -                        | P6       |
| 23.313   | B / 2014    | AMOXIL, CEFURO, CEFURA, CFT, ANALID, NORF, NITROF                           | +           | +           | +           | +           | +           | +           | -                        | -                        | -                        | -                        | P23      |
| 32.313   | B / 2014    | AMOXIL, CEFURO, CEFURA, CFT, ANALID, NITRO, TRIMET                          | +           | +           | +           | +           | +           | +           | -                        | -                        | -                        | -                        | P23      |
| 537a     | B / 2014    | AMOXIL, CEFURO, CEFURA, CFT, CFP, GENTA, ANALID, CIPRO, NORF, NITRO, TRIMET | +           | +           | +           | +           | +           | +           | -                        | -                        | -                        | -                        | P12      |

|      |          |                                                                                   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |     |
|------|----------|-----------------------------------------------------------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|
| 537b | B / 2014 | AMOXIL, CEFURO, CEFURA, CFT, CFP,<br>GENTA, ANALID, CIPRO, NORF,<br>NITRO, TRIMET | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | P10 |
| 682  | B / 2014 | CAZ, CFT, CFP, IMIP, MERO, GENTA,<br>CIPRO                                        | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | P27 |
| 611  | B / 2014 | CAZ, CFT, CFP, AMICA, GENTA, CIPRO                                                | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | P7  |
| 493  | B / 2014 | PIPER, CFT, IMIP, MERO, CIPRO                                                     | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | P14 |
| 59   | B / 2014 | CAZ, CFT, CFP, MERO, IMIP, CIPRO                                                  | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | P20 |
| 23   | B / 2014 | CFT, CAZ, CFP, AMICA, GENTA, CIPRO                                                | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | P19 |
| 22   | B / 2014 | CFT, IMIP, MERO                                                                   | + | + | + | + | + | + | - | - | + | - | P16 |
| 14   | B / 2014 | CAZ, CFT, IMIP, MERO, AMICA,<br>GENTA, CIPRO                                      | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | P15 |
| 91   | B / 2014 | CFT, CFP, IMIP, MERO, GENTA, CIPRO                                                | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | P17 |
| 141  | B / 2014 | CAZ, CFT, CFP, IMIP, MERO, AMICA                                                  | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | P18 |
| 134  | B / 2014 | CFT, IMIP, MERO                                                                   | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | P1  |
| 140  | B / 2014 | CFT, IMIP, MERO                                                                   | - | + | - | + | + | + | - | - | + | - | P2  |
| 209  | B / 2014 | CAZ, CFT, CFP, IMIP, MERO, AMICA,<br>GENTA, CIPRO                                 | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | P3  |
| 203  | B / 2014 | CAZ, CFT, CFP, IMIP, MERO, AMICA,<br>GENTA                                        | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | P4  |

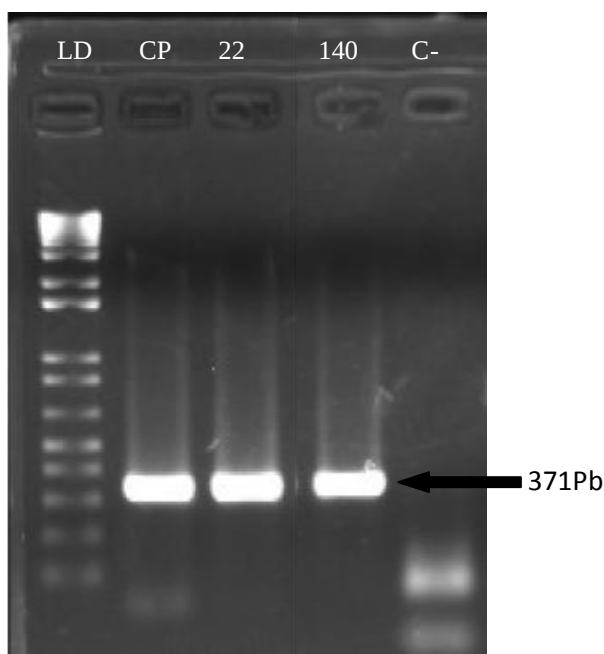
|     |          |                                                          |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |     |
|-----|----------|----------------------------------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|
| 257 | B / 2014 | CAZ, CFT, CFP, IMIP, MERO, AMICA,<br>GENTA, CIPRO, COLIS | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | P25 |
| 287 | B / 2014 | CAZ, CFT, CFP, AMICA, GENTA, CIPRO                       | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | P25 |
| 312 | B / 2014 | CAZ, CFT, CFP, IMIP, MERO, AMICA,<br>GENTA, CIPRO, COLIS | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | P5  |
| 376 | B / 2014 | CAZ, CFT, CFP, IMIP, MERO, AMICA,<br>GENTA, CIPRO        | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | P9  |
| 386 | B / 2014 | CFT, IMIP, MERO                                          | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | P8  |
| 428 | B / 2014 | CFT, IMIP, MERO                                          | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | P11 |
| 422 | B / 2014 | CAZ, CFT, CFP, IMIP, MERO, AMICA,<br>GENTA               | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | P26 |

---

Nota: <sup>a</sup> Perfil fenotípico de resistência dos isolados de *P. aeruginosa* determinados pelo sistema automotizado VITEK 2. CEFO: cefotaxima, CFT: ceftriaxona, CEFURO: cefuroxina, CEFURA: cefuroxinaaxetil, AZT: aztreonam, CAZ: ceftazidima, CFP: cefepima, IMIP: imipenem, MERO: meropenem, GENTA: gentamicina, CIPRO: ciprofloxacina, COLIS: colistina, PIPER: piperacilina/tazobactam, AMICA: amicacina, ANALID: ácido nalidixico, TRIMET: trimetopim/sulfametoxazol, NORF: norfloxacin, NITRO: nitrofurantoína, CFT: ceftriaxona. A e B: Hospitais públicos do Recife, locais de origem dos isolados bacterianos.

+: presente, - : ausente.

Figura 3: Imagem ilustrativa de gel de agarose 1,5% mostrando a detecção da presença do gene *bla<sub>KPC</sub>* em isolados de *P. aeruginosa*.



Fonte: O autor; Nota: LD – Marcador de peso molecular (100Pb), CP – controle positivo, C-: controle negativo, 22 e 140: Isolados bacterianos de *P. aeruginosa*.

## 5.2 ERIC-PCR

A análise da genotipagem dos isolados de *P. aeruginosa* pela técnica de ERIC-PCR demonstrou a presença de 30 perfis genéticos distintos dentre os 32 isolados de *P. aeruginosa*, conforme apresentado nas figuras 4 e 5 e tabela 3. Pudemos evidenciar dois conjuntos de isolados bacterianos apresentando semelhança genética de 100%, os isolados 257 e 287 (clone P25, semelhança de 100%); 23213 e 32313 (clone P23, semelhança de 100%); sendo assim considerados conjuntos clones. Estes resultados demonstram uma grande dispersão clonal de isolados de *P. aeruginosa*, apresentando similaridade genética inferior a 65%, entre dois hospitais públicos do Recife-PE.

Figura 4. Dendograma da genotipagem por ERIC-PCR de 32 isolados de *P. aeruginosa* provenientes de IrAS de dois hospitais públicos do Recife- PE.

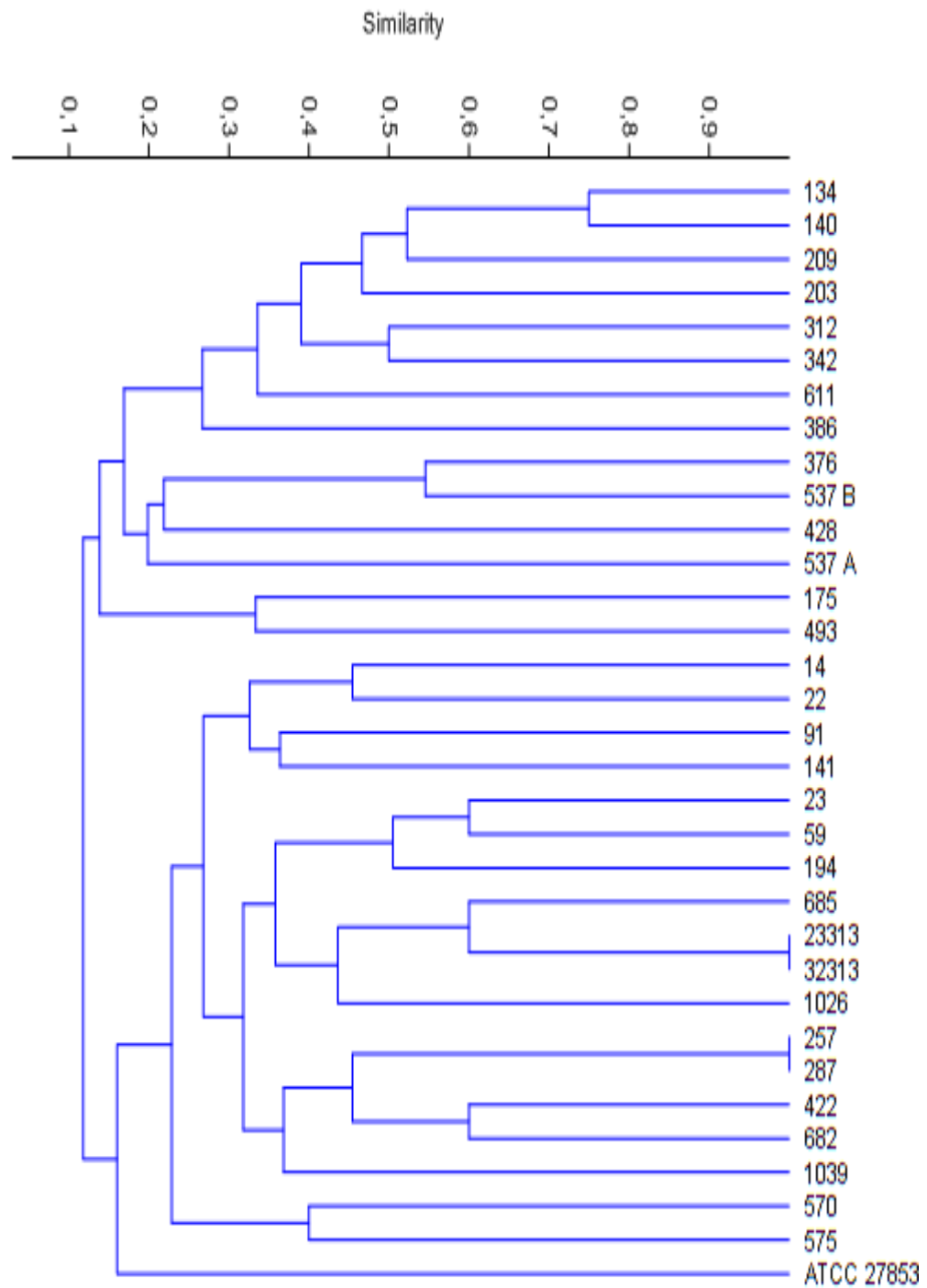
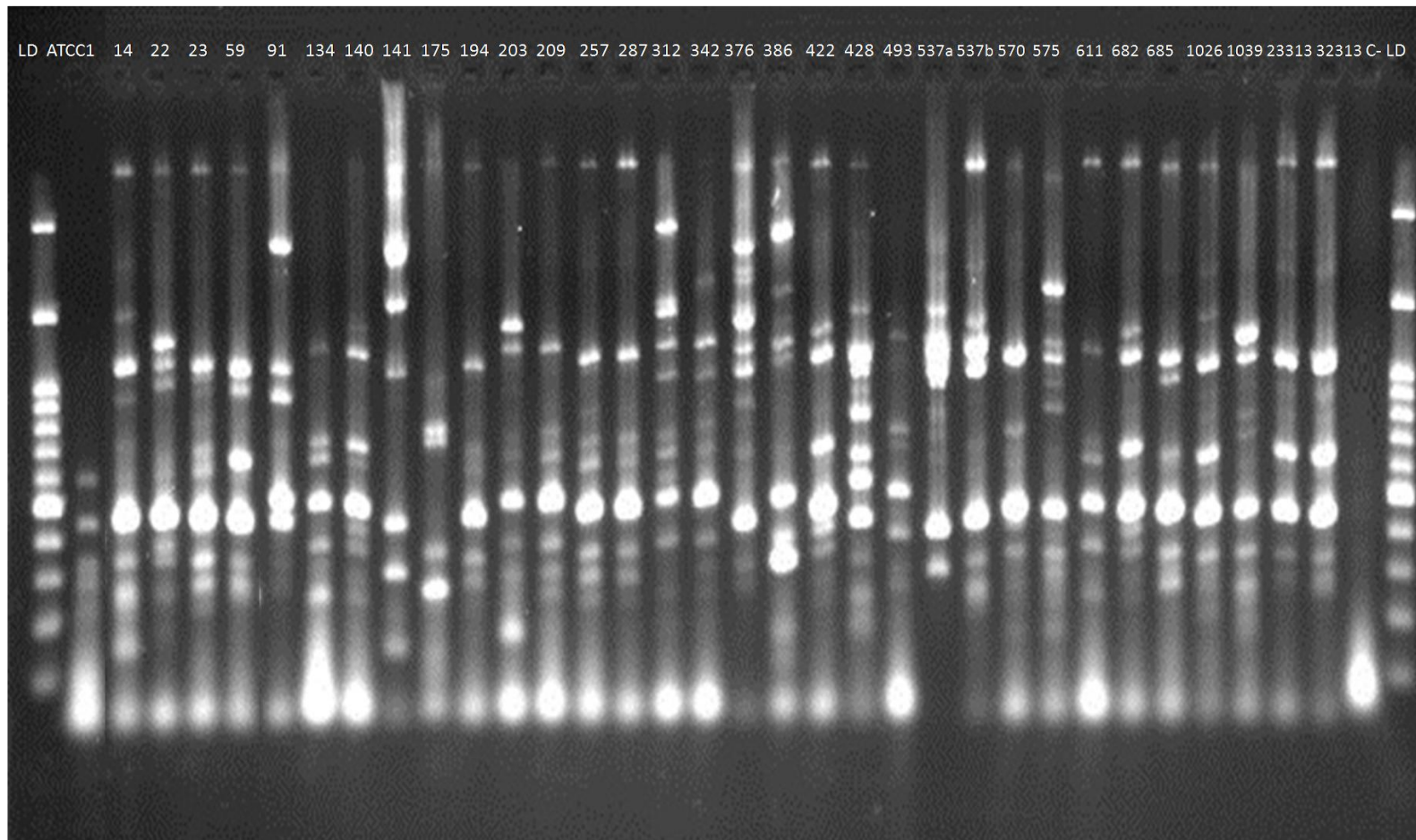


Figura 5. Imagem ilustrativa de gel de agarose a 1,5% mostrando o padrão de bandas dos isolados de *P. aeruginosa* obtidos pela técnica de ERIC-PCR.



Nota: LD: Marcador de peso molecular (100 pb); ATCC1: ATCC 27853 de *P. aeruginosa*; ATCC2, C-: 4 a 36° poço: Isolados bacterianos de *P. aeruginosa*.

### 5.3 CIM frente ao meropenem e polimixina E e seleção dos isolados representativos.

Após análise do perfil clonal e detecção dos genes de resistência, cinco isolados representativos de *P. aeruginosa* foram selecionados quanto às diferentes características genéticas e fenotípicas (Tabela 4). Dos cinco isolados analisados quatro confirmaram resistência fenotípica ao meropenem e sensibilidade a polimixina E.

Tabela 4. Isolados representativos de *P. aeruginosa* selecionados quanto ao perfil clonal genético e fenotípico de resistência.

| Isolados de <i>P. aeruginosa</i> | Gene de resistência      |                                      | CIM (µg/ml) <sup>a</sup> |              | Perfil clonal |
|----------------------------------|--------------------------|--------------------------------------|--------------------------|--------------|---------------|
|                                  | β-lactamase              | Bomba de efluxo                      | Meropenem                | Polimixina E |               |
| 22                               | <i>bla<sub>KPC</sub></i> | <i>mexA, mexB, mexE, mexF e mexR</i> | 8 (R)                    | 0,5 (S)      | P16           |
| 59                               | -                        | <i>mexA, mexB, mexE, mexF e mexR</i> | 8 (R)                    | 0,5 (S)      | P20           |
| 140                              | <i>bla<sub>KPC</sub></i> | <i>mexB, mexE e mexR</i>             | 32 (R)                   | 1 (S)        | P2            |
| 257                              | -                        | <i>mexA, mexB, mexE, mexF e mexR</i> | 8 (R)                    | 1 (S)        | P25           |
| 685                              | -                        | <i>mexA, mexB, mexE, mexF e mexR</i> | 2 (S)                    | 1 (S)        | P2            |

Nota: <sup>a</sup> CIM – Concentração Inibitória Mínima; R- Resistente; S - Sensível.

### 5.4 Tempo de morte

Os cinco isolados de *P. aeruginosa* foram submetidos à sub-MICs de polimixina E meropenem associados ou não a IgG humana. Os resultados demonstraram que todos os isolados apresentaram inibição de crescimento nos tempos analisados, em relação ao controle, quando submetidos ao meropenem, a polimixina E e a IgG humana, sozinhos e em combinação, excetuando-se os isolados 685 submetido a IgG/polimixinaE e 22 submetido a IgG humana, os quais tiveram crescimento bacteriano semelhante, nestas condições, ao controle (Tabela 5). A maior inibição do crescimento bacteriano ocorreu quando houve submissão simultânea dos isolados aos antibióticos em associação e quando combinados a IgG humana.

Tabela 5: Tempo de morte e taxa de fagocitose de 5 isolados de *P. aeruginosa* submetidos por 8 horas ao meropenem, polimixina E e IgG humana, sozinhos e em combinação.

| Isolados de <i>P. aeruginosa</i> | Tratamento<br>(concentração) <sup>a</sup>     | Taxa de Fagocitose<br>% | Contagem de UFCs <sup>b</sup> |       |       |
|----------------------------------|-----------------------------------------------|-------------------------|-------------------------------|-------|-------|
|                                  |                                               |                         | 2h                            | 5h    | 8h    |
| 257                              | Sem tratamento                                | 57                      | > 750                         | 1000  | >1000 |
|                                  | IgG (4)                                       | 62                      | 660                           | 648   | 684   |
|                                  | Meropenem (4)                                 | 10                      | 120                           | 49    | 83    |
|                                  | Polimixina E (0,25)                           | 18                      | 26                            | 13    | 111   |
|                                  | IgG (4); Meropenem (4)                        | 23                      | 52                            | 26    | 12    |
|                                  | IgG (4); Polimixina E (0,25)                  | 10                      | SC                            | 2     | 13    |
|                                  | Meropenem (4); Polimixina E (0,25)            | -                       | 2                             | SC    | SC    |
|                                  | IgG (4); Meropenem (0,4); Polimixina E (0,25) | -                       | 2                             | SC    | SC    |
| 685                              | Sem tratamento                                | 53                      | 608                           | >1000 | >1000 |
|                                  | IgG (4)                                       | 77                      | 356                           | >1000 | 396   |
|                                  | Meropenem (1)                                 | 39                      | 118                           | 104   | 328   |
|                                  | Polimixina E (0,25)                           | 25                      | 65                            | 8     | 3     |
|                                  | IgG (4); Meropenem (1)                        | 17                      | 48                            | 98    | 100   |
|                                  | IgG (4); Polimixina E (0,25)                  | 17                      | 136                           | >1000 | >1000 |
|                                  | Meropenem (4); Polimixina E (0,25)            | -                       | 6                             | SC    | SC    |
|                                  | IgG (4); Meropenem (1); Polimixina E (0,25)   | 13                      | 7                             | 2     | 84    |
| 59                               | Sem tratamento                                | 82                      | 242                           | >300  | >1000 |
|                                  | IgG (4)                                       | 51                      | 96                            | >200  | >350  |
|                                  | Meropenem (4)                                 | 9                       | 90                            | >100  | >300  |
|                                  | Polimixina E (0,25)                           | -                       | SC                            | SC    | SC    |
|                                  | IgG (4); Meropenem (4)                        | 41                      | 158                           | 178   | 84    |
|                                  | IgG (4); Polimixina E (0,25)                  | -                       | SC                            | 10    | SC    |
|                                  | Meropenem (4); Polimixina E (0,25)            | -                       | SC                            | SC    | 3     |
|                                  | IgG (4); Meropenem (4);                       | -                       | SC                            | SC    | SC    |

| Polimixina E (0,25) |                                             |    |      |      |       |
|---------------------|---------------------------------------------|----|------|------|-------|
| 140                 | Sem tratamento                              | 40 | >200 | >250 | >1000 |
|                     | IgG (4)                                     | 57 | 220  | 700  | 400   |
|                     | Meropenem (8)                               | 40 | >200 | >400 | 440   |
|                     | Polimixina E (0,5)                          | -  | 3    | SC   | SC    |
|                     | IgG (4); Meropenem(8)                       | 43 | 218  | 300  | 400   |
|                     | IgG (4); polimixina E (0,5)                 | -  | 9    | SC   | SC    |
|                     | Meropenem(8); Polimixina E (0,5)            | -  | 11   | SC   | SC    |
|                     | IgG (4); Meropenem(8); Polimixina E (0,5)   | -  | SC   | SC   | SC    |
| 22                  | Sem tratamento                              | 67 | 306  | 810  | >1000 |
|                     | IgG (4)                                     | 48 | 322  | 540  | >1000 |
|                     | Meropenem (4)                               | 2  | 90   | 56   | 48    |
|                     | Polimixina E (0,25)                         | -  | SC   | SC   | SC    |
|                     | IgG (4); Meropenem (4)                      | 8  | 28   | 25   | 12    |
|                     | IgG (4); Polimixina E (0,25)                | -  | SC   | SC   | SC    |
|                     | Meropenem (4); Polimixina E (0,25)          | -  | SC   | SC   | SC    |
|                     | IgG (4); Meropenem (4); Polimixina E (0,25) | -  | SC   | SC   | SC    |

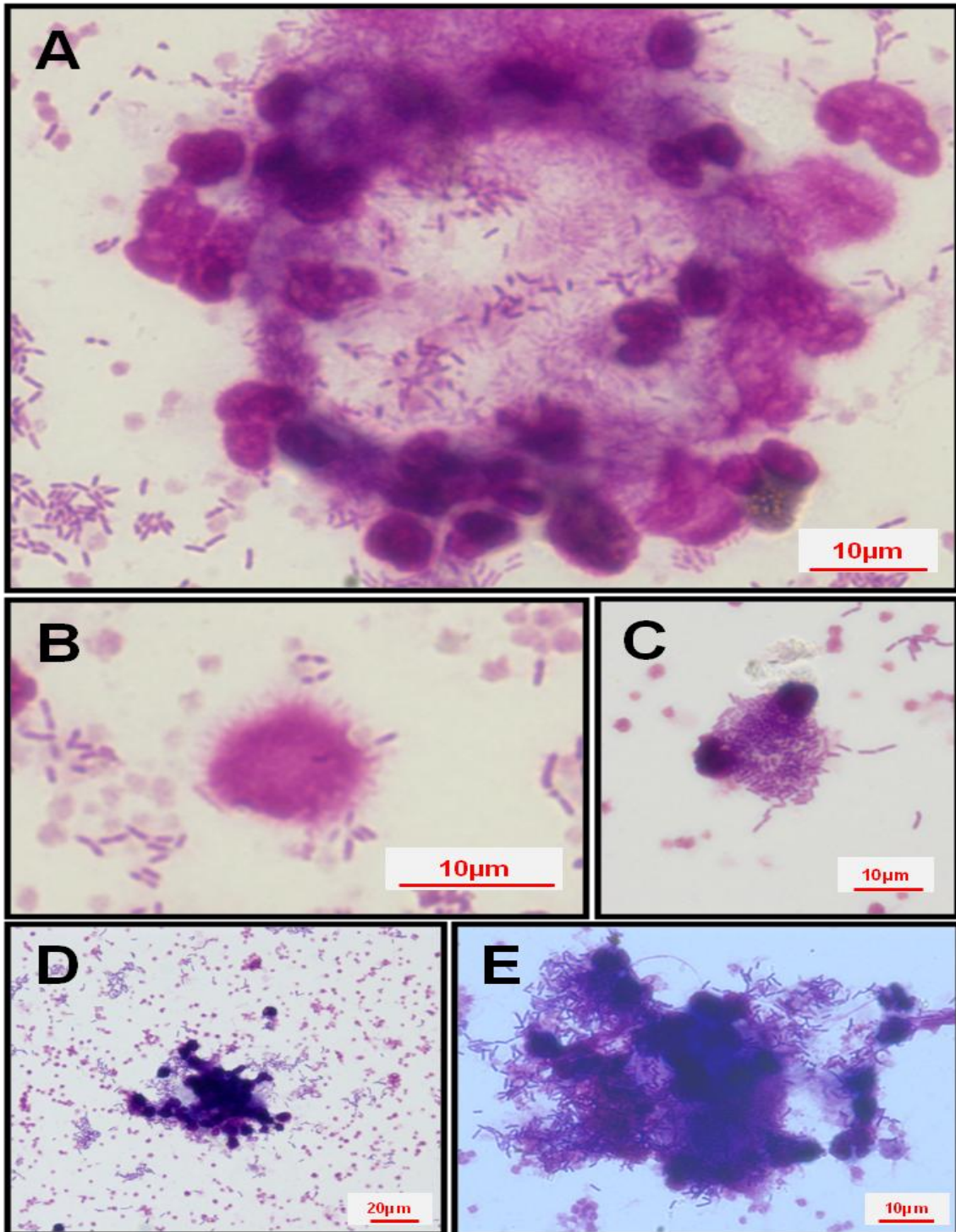
Fonte: Autor; <sup>a</sup>IgG - Imunoglobulina G: concentração -mg/ml; Meropenem; Polimixina E: concentração - µg/ml;  
<sup>b</sup>UFCs- Unidades Formadoras de Colônia; SC – Sem crescimento bacteriano.

### 5.5 Taxa de fagocitose (TF)

Os resultados da TF dos isolados de *P. aeruginosa* submetidos às combinações de antibióticos e IgG humana constam na tabela 5 e estão ilustrados nas figuras 4 e 5.

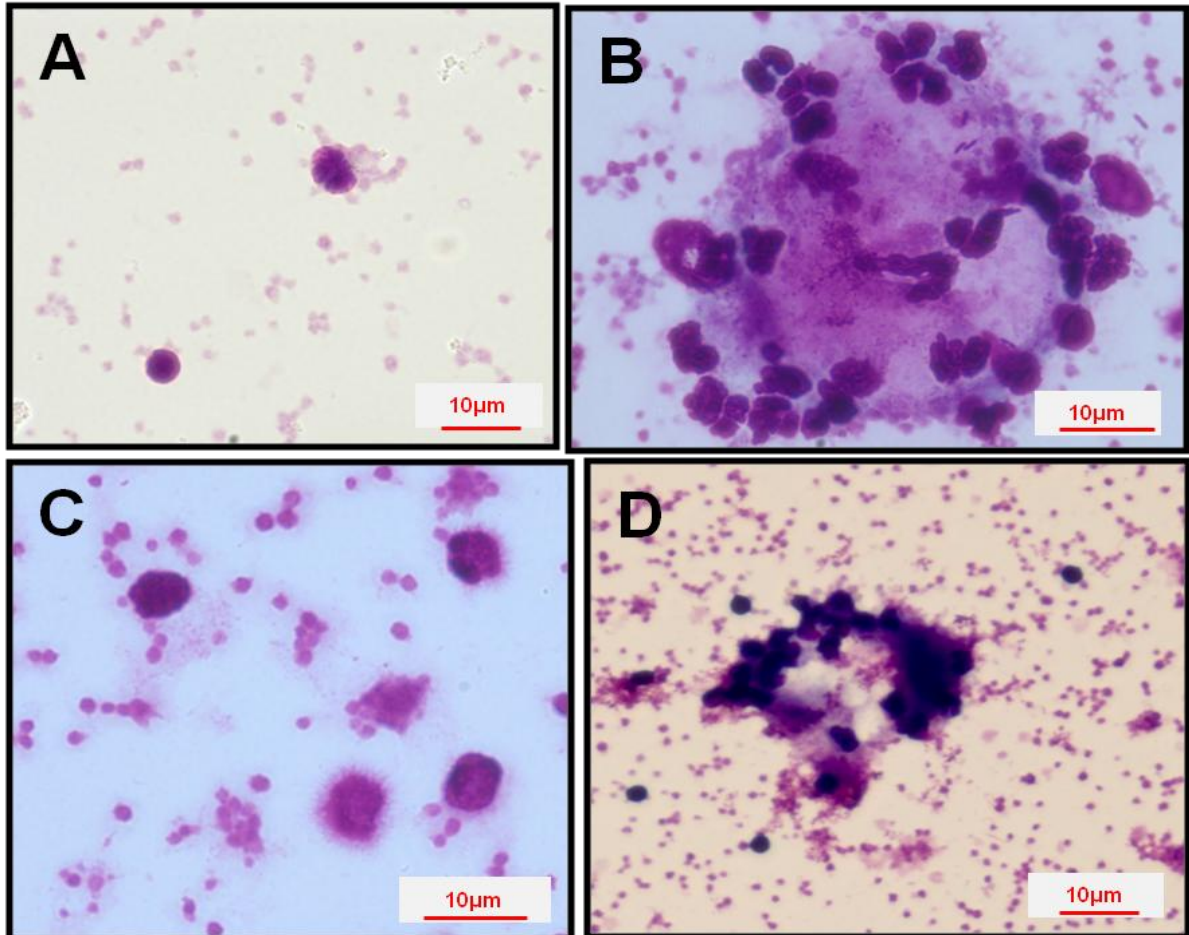
As TF dos isolados de *P. aeruginosa* apresentaram características diferentes de acordo com o teste realizado. Através da comparação da TF dos isolados submetidos a IgG com os controles sem submissão, três isolados (257, 685 e 140) apresentaram maior taxa de fagocitose devido submissão a IgG, elevando o nível de ativação dos monócitos e induzindo a fagocitose, que esteve aumentada independente da inibição do crescimento bacteriano, com menor quantidade de células bacterianas viáveis. No entanto, dois isolados (59 e 22) demonstraram menor TF quando submetidos a IgG humana em relação os controles, o que pode ter ocorrido devido a quantidade de células bacterianas presentes, visto a grande quantidade de monócitos ativados e poucas células a serem fagocitadas. A utilização simultânea do meropenem associada a IgG, demonstrou aumento da TF dos isolados relativa a quantidade de células bacterianas, considerando a ação inibitória intensa do meropenem sobre o crescimento dos isolados. A ação da polimixina E em associação com a IgG não apresentou aumento da taxa de fagocitose dos isolados considerando a inibição do crescimento bacteriano, demonstrando variação da ação da polimixina E no crescimento bacteriano e TF.

Figura 6 (A-E). Micrografias de monócitos desafiados com isolados de *P. aeruginosa* submetidos à IgG humana.



Nota: Monócitos desafiados com os isolados bacterianos 685 (A e B), 140 (C) e 257 (D e E). Observe a presença de monócitos ativados, realizando fagocitose e formando aglomerados.

Figura 7 (A-D): Micrografias de monócitos desafiados com isolados de *P. aeruginosa* submetidos à IgG humana, meropenem e polimixina E.



Nota:(A) Grupo controle: monócitos sem submissão a células bacterianas – observar monócitos isolados e sem ativação; (B) Monócitos desafiados com o isolado 685 após submissão com Polimixina E – notar a presença de poucas células bacterianas sendo fagocitadas por monócitos; (C) Monócitos desafiados como isolado 257 submetido a polimixina E e IgG – observar monócitos ativados sem células bacterianas; (D) Monócitos desafiados com o isolado 685 submetido a IgG, meropenem e polimixina E – observar monócitos ativados realizando fagocitose.

## 5.6 Dosagem de Óxido Nítrico (NO)

A concentração de NO obtida por monócitos desafiados pelos cinco isolados de *P. aeruginosa* em diferentes condições-testes foi variável. Os isolados 685 e 22 aumentaram a produção de NO em relação ao controle, com relevância estatística ( $p < 0,05$ ), apenas quando submetidos ao meropenem (Figuras 6 e 9). Adicionalmente, apenas a submissão do isolado 257 a IgG humana aumentou a dosagem de NO com  $p < 0,001$ , não havendo diferença estatisticamente significativa induzida pelos outros grupos em relação ao controle (Figura 7).

A submissão do isolado 59 a todos os grupos testados (IgG, meropenem, polimixina E, IgG/meropenem, IgG/polimixina E e IgG/meropenem/polimixina E) aumentou a produção de NO em relação ao controle, com  $p < 0,001$  (Figura 8). No entanto, a produção de NO por monócitos desafiados com o isolado 140 não mostrou diferença significativa em nenhum dos grupos testados (figura 10).

Figura 8. Produção de óxido nítrico por monócitos humanos desafiados pelo isolado 685 de *P. aeruginosa* em diferentes condições-teste.

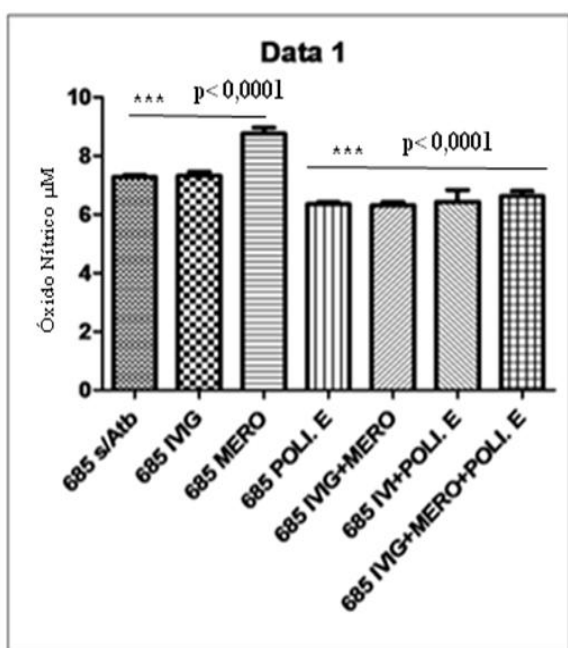


Figura 9. Produção de óxido nítrico por monócitos humanos desafiados pelo isolado 257 de *P. aeruginosa* em diferentes condições-teste.

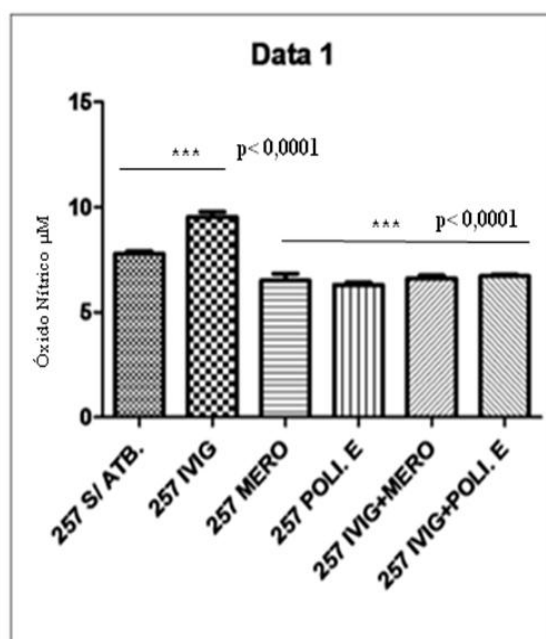


Figura 10. Produção de óxido nítrico por monócitos humanos desafiados pelo isolado 59 de *P. aeruginosa* em diferentes condições-teste.

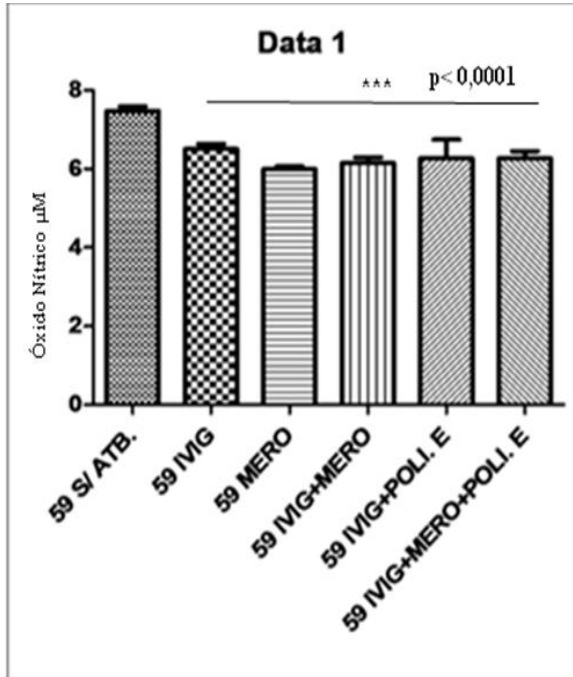


Figura 11. Produção de óxido nítrico por monócitos humanos desafiados pelo isolado 22 de *P. aeruginosa* em diferentes condições-teste.

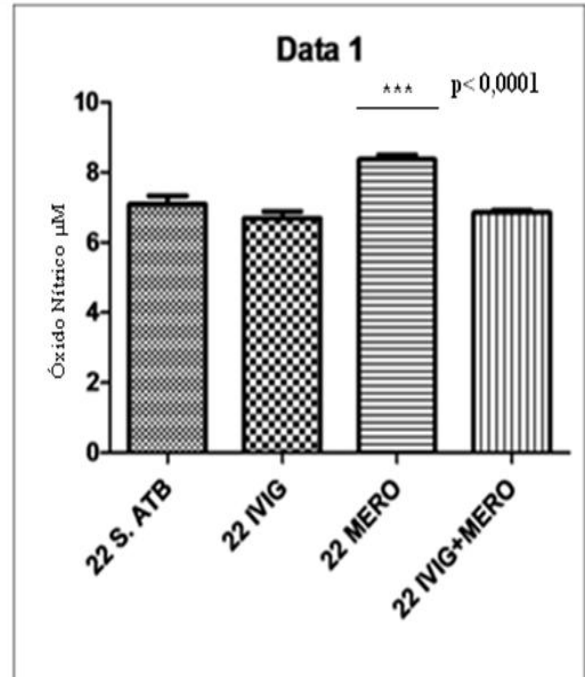
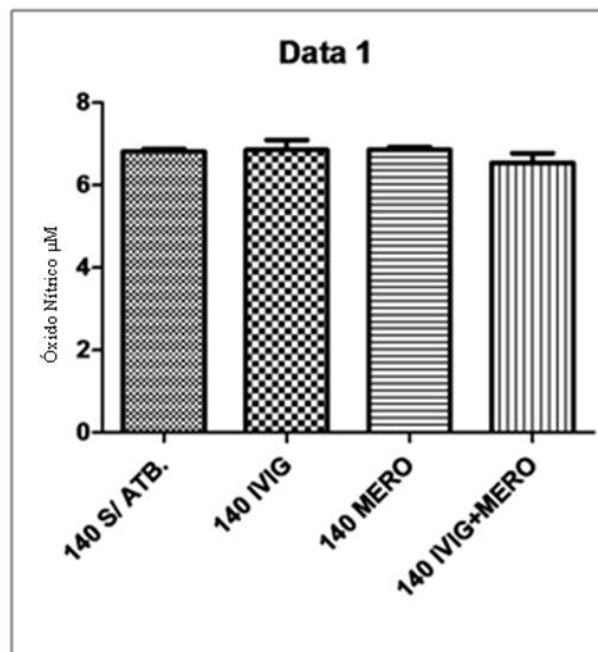


Figura 12. Produção de óxido nítrico por monócitos humanos desafiados pelo isolado 140 de *P. aeruginosa* em diferentes condições-teste.



## 6 DISCUSSÃO

A análise do perfil genético de resistência realizada neste estudo, utilizando 32 isolados bacterianos de *P. aeruginosa* não detectou a presença dos genes *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub> e *bla*<sub>CTX-M</sub>, apesar da resistência fenotípica apresentada às cefalosporinas em todos os isolados e a pelo menos um carbapenêmico em 24 linhagens, que provavelmente é resultado de algum outro mecanismo de resistência presente na espécie *P. aeruginosa*. Em estudo realizado em 2010 por Camargo et al. utilizando 47 isolados de *P. aeruginosa*, obtidos em Hospital Universitário de São Paulo nos anos de 2006 e 2007, o gene *bla*<sub>IMP</sub> foi detectado em 4 isolados analisados. Outros estudos realizados no Brasil, utilizando isolados de *P. aeruginosa* obtidos de IrAS, também detectaram a presença dos genes *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub> e *bla*<sub>CTX-M-2</sub> (FRANCO et al., 2010; POLLOTO et al., 2012).

Apesar de existir uma forte relação entre a presença de genes codificantes de Metallo- $\beta$ -lactamases (MBL) em isolados fenotipicamente resistentes de *P. aeruginosa*, alguns estudos vem relatando uma modificação deste perfil genético em alguns locais do Brasil. Em 2011, Rodrigues et al. demonstraram que nenhum dos isolados de *P. aeruginosa* obtidos de dois hospitais públicos do estado de Mato Grosso do Sul, em 2007 e 2008, continha os genes *bla*<sub>IMP</sub> e *bla*<sub>VIM</sub>. Jácome et al. (2012), também demonstraram esta modificação do perfil de isolados de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos, evidenciando a ausência de envolvimento dos genes codificantes de MBL com a resistência dos isolados de *P. aeruginosa* obtidos em cinco hospitais de Recife-PE.

O gene *bla*<sub>KPC</sub>, frequentemente encontrado em isolados MDR de *Klebsiella pneumoniae*, foi relatado em *P. aeruginosa*, pela primeira vez no Brasil, em estudo realizado com isolados obtidos em Recife-PE (JÁCOME et al., 2012). No presente estudo, dois isolados de *P. aeruginosa*, com perfis clonais diferentes, apresentaram o gene *bla*<sub>KPC</sub>. A presença deste gene em isolados de *P. aeruginosa* com baixa relação clonal, obtidos em anos e hospitais diferentes, pode inferir a possível ocorrência de disseminação deste gene de resistência em isolados bacterianos provenientes de hospitais distintos no município de Recife-PE.

A aplicação da técnica de tipagem molecular por ERIC-PCR em isolados de *P. aeruginosa* tem se tornado uma ótima alternativa para obtenção de tipagem genética com alto poder discriminatório nesta espécie bacteriana, apresentando eficiência comparada com outras técnicas de tipagem molecular padrão, incluindo-se o PFGE (WOLSKA; SZWEDA, 2008; SILBERT et al., 2014). Portanto, a detecção de 30 perfis clonais entre os 32 isolados de *P.*

*aeruginosa* utilizados neste estudo, pode inferir uma alta heterogeneidade genética entre as linhagens analisadas, o que pode ser atribuído, dentre outros fatores, à aquisição de elementos genéticos móveis entre espécies bacterianas (JÁCOME et al., 2012).

A presença dos genes que compõe as bombas de efluxo MexAB-OprM e MexEF-OprN em mais de 95% dos isolados analisados neste estudo, provavelmente esta relacionada a resistência fenotípica apresentada pelos isolados estudados a pelo menos um carbapenêmico utilizado na prática clínica, para tratamento de infecções por *P. aeruginosa* (PAI et al., 2001; LLANES et al., 2004; DUMAS et al., 2006; MEIYING; PENGYUAN; YUCUN, 2014; ; PONSUCK et al, 2014; SACHA et al., 2014).

A submissão dos isolados representativos de *P. aeruginosa* a IgG humana, meropenem e polimixina E sozinhos e em combinação, demonstrou atividade sinérgica na maioria das condições testadas, com diminuição do crescimento bacteriano em relação ao controle não tratado. Resultados semelhantes foram evidenciados no estudo de Safarika et al. (2014), onde a atividade sinérgica da polimixina E e do carbapenêmico imipenem em associação a levofloxacina foi determinada utilizando 47 isolados de *P. aeruginosa*, obtidos de pacientes do hospital universitário em Atenas – Grécia, concluindo que as combinações de antibióticos utilizando carbapenêmico imipenem pode ser uma boa opção, mas não é 100% eficaz no combate de *P. aeruginosa* resistente.

No presente trabalho, pode-se demonstrar o aumento da taxa de fagocitose da maioria dos isolados submetidos a IgG, meropenem e polimixina E, sozinhos ou em combinação. FARAG et al. (2013), investigando o efeito *in vitro* da imunoglobulina intravenosa (IVIG) na capacidade de neutrófilos humanos em fagocitar e matar isolados de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA), demonstraram que a IVIG aumentou significativamente a morte de MRSA por neutrófilos em todas as concentrações de IgG testadas (0,1-5 mg/mL) por 30-80% dos valores do controle.

TANAKA et al., em 2010 comprovou que o antibiótico meropenem em concentrações sub-inibitórias causa alterações morfológicas prejudiciais as células de *P. aeruginosa* e que a contagem bacteriana diminui com 2 horas de submissão da cepa com o antibiótico. Demonstrou também que as células bacterianas submetidas a soro humano contendo IgG, apresentavam diminuição intensa de crescimento em apenas 30 minutos. Este trabalho não determinou, no entanto, se existe alteração do crescimento bacteriano devido a associação do meropenem a IgG presente no soro humano. No presente estudo, pode-se demonstrar pela primeira vez a atividade sinérgica da IgG humana em combinação com o meropenem em

isolados de *P. aeruginosa* com diferentes perfis clonais e portadores de diferentes genes de resistência.

A maior ativação dos monócitos humanos, na presença da IgG, certamente elevou a fagocitose das células bacterianas *in vitro*, o que pode ser ainda mais evidenciado quando combinado ao meropenem, provavelmente devido a diminuição da quantidade de células bacterianas e indução de sofrimento celular, facilitando ainda mais a fagocitose. Este estudo incentiva a realização de novos trabalhos que investiguem a ação da IgG humana combinada com o meropenem *in vivo*, objetivando determinar a melhora na eficácia do tratamento de infecções causadas por bactérias resistentes aos antibióticos utilizados na prática clínica.

## 7 CONCLUSÃO

- Trinta perfis clonais puderam ser identificados a partir dos 32 isolados de *P. aeruginosa* analisados neste estudo, demonstrando uma alta diversidade genética;
- Nenhum gene de resistência codificante de MBL e ESBL pesquisado foi encontrado nos isolados analisados. Apenas o gene *bla*<sub>KPC</sub> foi identificado em dois dos isolados de *P. aeruginosa*, indicando dispersão deste gene de resistência entre espécies bacterianas;
- Nos dois isolados que não apresentaram todos os genes que compõem os operons das bombas de efluxo MexAB-OprM e MexEF-OprN, a sua resistência fenotípica é devido a outro mecanismo de resistência;
- A alta resistência fenotípica dos isolados de *P. aeruginosa* analisados pode estar relacionada à presença e a super-expressão dos genes que codificam as bombas de efluxo MexAB-OprM e MexEF-OprN. Essas bombas podem conferir resistência a vários agentes antimicrobianos em *P. aeruginosa*;
- O tempo de morte demonstrou que os 5 isolados apresentaram inibição de crescimento nos tempos analisados quando submetidos ao meropenem e a polimixina E em combinação e quando submetidos ao meropenem e a polimixina E em combinação a IgG humana.
- Não houve modificação padrão da produção de NO nos diferentes grupos analisados, o que provavelmente reflete o tempo de análise utilizado;
- Houve aumento na taxa de fagocitose dos 5 isolados de *P. aeruginosa*, com diferentes perfis clonais e portadores de diferentes genes de resistência, devido a atividade sinérgica da IgG humana em combinação com o meropenem.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS A. K; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Molecular e Celular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012. p. 89-108
- ADAMS et al., Resistance to Colistin in *Acinetobacter baumannii* Associated with Mutations in the PmrAB Two-Component System. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, US v. 53, n. 9, p. 3628–3634, 2009.
- AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA,  
[http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede\\_rm/cursos/rm\\_controle/opas\\_web/modulo1/polimixinas5.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/polimixinas5.htm), 04 de janeiro de 2015.
- BRADFORD, P. A et al. Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the class A carbapenem-hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30 beta-lactamases in New York City. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, US, v. 39, n. 1, p. 55-60, 1 jul. 2004.
- BREILH, D. et al. Carbapenems. **Journal of Chemotherapy**. Firenze, US, v. 25, n. 1, p. 1-17, fev. 2013.
- BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of beta-lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, US, v. 54, n. 3, p. 969-76, mar. 2010.
- BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. A Functional Classification Scheme for  $\beta$ -Lactamases and Its Correlation with Molecular Structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, US, v. 39, n. 6, p. 1211-1232, 1995.
- CAMARGO, C. H. et al. Detection of SPM and IMP metallo- $\beta$ -lactamases in clinical specimens of *Pseudomonas aeruginosa* from a Brazilian public tertiary hospital. **Brazilian Journal Infection Disease**, [S.l.] v. 15, n. 5, p. 478-481, 2010.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)**. 2006. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 18th informational supplement. M100-S18. CLSI, Baltimore, MD.
- DJORDJEVIC, Z. et al. Nosocomial urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species: Sensitivity to antibiotics and risk factors. **American Journal of Infection Control**, St. Louis, US, v. 41, n. 12, p. 1182–1187, 2013.
- DONG, F. et al. Characterization of multidrug-resistant and metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a paediatric clinic in China. **Chinese Medical Journal**, Beijing, CN v. 121, n. 17, p. 1611-1616, 2008.
- DUMAS, J. L. et al. Analysis of antibiotic resistance gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* by quantitative real-time-PCR. **FEMS microbiology letters**, v. 254, n. 2, p. 217-25, jan. 2006.

FARAG, N. et al. Assessment of the efficacy of polyclonal intravenous immunoglobulin G (IVIg) against the infectivity of clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in vitro and in vivo. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, Berlin, DE, v. 32, n. 9, p. 1149-60, set. 2013.

FATIMA, A. et al. Antimicrobial susceptibility pattern of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients of lower respiratory tract infections. **SpringerPlus**, Heidelberg, GE v. 1, n. 1, p. 70, dez. 2012.

FERRARA, G.; ZUMLA, A.; MAEURER, M. Intravenous immunoglobulin (IVIg) for refractory and difficult-to-treat infections. **The American Journal of Medicine**, New York, US v. 125, n. 10, p. 1036.e1-8, out. 2012.

FERREIRA, H.; LALA, E. R. P. Um alerta aos profissionais de saúde *Pseudomonas aeruginosa* : An alert to the professionals of health. **Revista Panamerica de Infectologia**, [S.l.] v. 12, n. 2, p. 44-50, 2010.

FRANCO, M. R. G. et al. Metallo-beta-lactamases among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian university hospital. **Clinics**, Sao Paulo, Brazil, v. 65, n. 9, p. 825–829, 2010.

GAYATHRI, D.; ERAMMA, N. K.; DEVARAJA, T. N. Review article New Delhi metallo beta- Lactamase-1 ; Incidence and threats . **International Journal of Biological & Medical Research**, [S.l.] v. 3, n. 2, p. 1870-1874, 2012.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, São Paulo, BR v. 32, n. 3, p. 667-679, 2010.

HATTEMER, A. et al. Bacterial and Clinical Characteristics of Health Care- and Community-Acquired Bloodstream Infections Due to *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, US v. 57, n. 8, p. 3969-75, ago. 2013.

HENGZHUANG, W. et al. High  $\beta$ -lactamase levels change the pharmacodynamics of  $\beta$ -lactam antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, US v. 57, n. 1, p. 196-204, jan. 2013.

JABALAMELI, F. et al. Evaluation of biofilm production and characterization of genes encoding type III secretion system among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. **Burns: Journal of the International Society for Burn Injuries**, [S.l.] v. 38, n. 8, p. 1192-7, dez. 2012.

JÁCOME, P. R. L. DE A. et al. Phenotypic and molecular characterization of antimicrobial resistance and virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Recife , State of Pernambuco , Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, BR, v. 45, n. 6, p. 707-712, 2012.

KONEMAN, E. W. et al. **Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido**. 6. ed. [s.l: s.n.]. p. 263-320

LAUPLAND, K. B. Polyclonal intravenous immunoglobulin for the prophylaxis and treatment of infection in critically ill adults. **The Canadian journal of Infectious Diseases**, [S.l.] v. 13, n. 2, p. 100-6, mar. 2002.

LEGAREE, B. A; ADAMS, C. B.; CLARKE, A. J. Overproduction of penicillin-binding protein 2 and its inactive variants causes morphological changes and lysis in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, Washington, US v. 189, n. 14, p. 4975-83, jul. 2007.

LLANES, C. et al. Clinical Strains of *Pseudomonas aeruginosa* Overproducing MexAB-OprM and MexXY Efflux Pumps Simultaneously. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 5, p. 1797-1802, 2004.

LINDEN, P. Safety profile of meropenem: An updated review of over 6000 patients treated with meropenem. **Drug Safety**, Auckland, NZ, v. 30, n. 8, p. 657–668, 2007.

LOVEDAY, H. P. et al. Association between healthcare water systems and *Pseudomonas aeruginosa* infections: a rapid systematic review. **The Journal of Hospital Infection**, London, GB p. 1-9, 14 out. 2013.

MARAGAKIS, L. L.; PERL, T. M. *Acinetobacter baumannii*: Epidemiology, Antimicrobial Resistance and Treatment Options. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, US, v. 46, p. 1254-1263, 2008.

MATA, P. T. G.; ABEGG, M. A. *Pseudomonas aeruginosa*. **Arquivos do Mudi**, Maringá, BR, v. 11, n. 2, p. 20-25, 2007.

MEIYING Y.; PENGYUAN W.; YUCUN L. Molecular typing and resistance mechanisms of carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a Chinese surgical intensive care unit. **Chinese Medical Journal**, Beijing, CN, v. 127, n. 2002, p. 1071–1076, 2014.

MOLAND, E. S., Plasmid-mediated, carbapenem-hydrolysing beta-lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [S.l.] v. 51, n. 3, p. 711-714, 28 jan. 2003.

MORAIS, N. G. et al. Immunological parameters of macrophages infected by methicillin resistant / sensitive *Staphylococcus aureus*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina**, Rio de Janeiro, BR, v. 49, n. 2, p. 84-90, 2013.

NERI, M. Anvisa/Bactéria KPC: Trincheiras anticontágio. **Clipping**, [S.l.] n. 61, p. 1-217, 2010.

NEVES, P. R. et al. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente : um problema endêmico no Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, BR, v. 47, n. 4, p. 409-420, 2011.

J.E. OLSEN et al. Bacterial typing methods suitable for epidemiological analysis. applications in investigations of salmonellosis among livestock. **Veterinary Quarterly**, [S.l.] v.15, n.4, p. 125-135, 1993.

PAI, H. et al. Carbapenem Resistance Mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Washington, US v. 45, n. 2, p. 480, 2001.

PASTERAN, F. et al. Detection of an international multiresistant clone belonging to sequence type 654 involved in the dissemination of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Argentina. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, [S.l] v. 67, n. 5, p. 1291-3, maio. 2012.

PENILDON, S. **Farmacologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: [s.n.]. p. 953

PEREZ, F. et al. THE CONTINUING CHALLENGE OF ESBLs. **Current opinion in pharmacology**, Oxford, US, v. 7, n. 5, p. 459-469, 2007.

PFEIFER, Y. et al. Molecular characterization of blaNDM-1 in an *Acinetobacter baumannii* strain isolated in Germany in 2007. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [S.l] v. 66, n. 9, p. 1998-2001, set. 2011.

PICÃO, R. C. *et al.* The route of antimicrobial resistance from the hospital effluent to the environment: Focus on the occurrence of KPC-producing *Aeromonas* spp. and Enterobacteriaceae in sewage. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, US, v. 76, n. 1, p. 80–85, 2013.

PICOLI, S. U. Metallo- $\beta$ -lactamase e *Pseudomonas aeruginosa*. **Revista Brasileira de Análise Clínicas**, Rio de Janeiro, BR v. 40, n. 4, p. 273-277, 2008.

POLOTTO, M. et al. Detection of *P. aeruginosa* harboring bla CTX-M-2, bla GES-1 and bla GES-5, bla IMP-1 and bla SPM-1 causing infections in Brazilian tertiary-care hospital. **BMC Infectious Diseases**, London, US v. 12, p. 176, jan. 2012.

POONSUK, K.; CHUANCHUEN, R. Detection of the Mex Efflux Pumps in *Pseudomonas aeruginosa* by Using a Combined Resistance-Phenotypic Markers and Multiplex RT-PCR. **Open Journal of Medical Microbiology**, [S,l] v. 4, p. 153–160, 2014.

RIVEROS, M. et al. First report of a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate coharbouring KPC-2 and IMP-18 carbapenemases. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, NL v. 39, p. 539– 547, abr. 2012.

RODRIGUES, A. C. S. *et al.* Metallo-  $\beta$  -lactamase and genetic diversity of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units in Campo Grande , MS , Brazil. **The Brazilian Journal Infection Disease**, [S,l] v. 15, n. 3, p. 195–199, 2011.

SACHA, P. *et al.* Expression of MexAB-OprM efflux pump system and susceptibility to antibiotics of different *Pseudomonas aeruginosa* clones isolated from patients hospitalized in two intensive care units at University Hospital in Białystok (northeastern Poland) between January 2002 and December 2009. **APMIS: Acta pathologica microbiologica et immunologica scandinavica**, Copenhagen, DK, n. 122, p. 931–940, 2014.

SAFARIKA, A. *et al.* Time–kill effect of levofloxacin on multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: synergism with imipenem and colistin. **European**

**Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, Berlin, DE v. 34, p. 317–323, 2014.

SAITO, T. et al. Evidence of intravenous immunoglobulin as a critical supportive therapy against *Clostridium difficile* toxin-mediated lethality in mice. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [S.l.] v. 66, n. 5, p. 1096-9, maio. 2011.

SALADIN, M. et al. Diversity of CTX-M beta-lactamases and their promoter regions from Enterobacteriaceae isolated in three Parisian hospitals. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, NL v. 209, n. 2, p. 161-8, 9 abr. 2002.

SALCEDO, J. et al. Intravenous immunoglobulin therapy for severe *Clostridium difficile* colitis. **Gut**, London GB v. 41, n. 3, p. 366-70, set. 1997.

SATOH, R. et al. An outbreak and isolation of drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* at Niigata University Hospital, Japan. **Journal of Infection and Chemotherapy** : Tokyo, JP v. 14, n. 4, p. 325-9, ago. 2008.

SILBERT, S. et al. Evaluation of three molecular typing techniques for nonfermentative gram-negative bacilli. **Infection control and hospital epidemiology**, New Jersey, US v. 25, n. 10, p. 847-851, 2014.

TANAKA, J. et al. Complement-mediated bacteriolysis after binding of specific antibodies to drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: morphological changes observed by using a field emission scanning electron microscope. **Journal Infection Chemotherapy**, Tokyo, JP v. 16, p. 383-387, 2010.

TENOVER F. C. et al. Carbapenem Resistance in *Klebsiella pneumoniae* Not Detected by Automated Susceptibility Testing. **Emerging Infectious Diseases**. Atlanta, USA v. 12, n. 8, p. 1209-13, 2006.

TORTORA, G. J., FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia** 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005

VOULGARI, E. et al. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: now that the storm is finally here, how will timely detection help us fight back? **Future Microbiology**, London, GB v. 8, n. 1, p. 27-39, 2013.

WOLSKA, K.; SZWEDA, P. A comparative evaluation of PCR ribotyping and ERIC PCR for determining the diversity of clinical *Pseudomonas Aeruginosa* isolates. **Polish Journal of Microbiology**, Seoul, KR v. 57, n. 2, p. 157–163, 2008.

YIGIT, H. et al. Novel Carbapenem-Hydrolyzing  $\beta$ -lactamase , KPC-1 , from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobiology Agents Chemother**, Washington, US v. 45, n. 4, p. 1151-1161, 2001.

ZARRILLI, R. et al. Carbapenem Resistance in *Acinetobacter baumannii*: the Molecular Epidemic Features of an Emerging Problem in Health Care Facilities. **Journal of Infection in Developing Countries**, Sassari, IT, v. 3, n. 5, p. 325-341, 2009.

ZEBA, BOUKARÉ. Overview of  $\beta$ -lactamase incidence on bacterial drug resistance. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, KE v. 4, n. 13, p. 1559-1562, 2005.

## APÊNDICE

Artigo no formato da revista MICROBIAL DRUG RESISTENCE

Link da revista: <http://www.liebertpub.com/forauthors/microbial-drug-resistance/44/>

### **Meropenem and polymyxin E of action analysis with human IgG front *Pseudomonas aeruginosa* isolates from infections related to Health Care**

authors: Fernanda Cristina Gomes de Lima, Dyana Leal Veras<sup>1</sup>, Catarina Fernandes de Freitas, Amanda Silva dos Santos Aliança, Thacianna Barreto da Costa, Célia Maria Machado Barbosa de Castro<sup>2,3</sup>, Grasielle Vaz da Silva, Eduarda Vanessa Cavalcante Manguiera, Carmelita de Bezerra de Lima Cavalcante<sup>2</sup>, Ana Paula Sampaio Feitosa, Luiz Carlos Alves<sup>1,4</sup>, Fabio Andre Brayner dos Santos<sup>1,3</sup>.

- 1: Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães / Fiocruz-PE
- 2: Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami
- 3: Universidade Federal de Pernambuco
- 4: Universidade de Pernambuco

corresponding author: Fernanda Cristina Gomes de Lima; Endereço: Av. Professor Moraes Rego S/N, Cidade Universitária, Recife-PE, (81)21012693.

*Pseudomonas aeruginosa* is a major cause of infections, showing high morbidity and mortality. Enzyme production and expression of efflux pumps are the major mechanisms of resistance. The use of IgG and antibiotics to treat these infections has been successful. The objective of this study was to determine the action of human IgG with meropenem and Polymyxin front *P. aeruginosa* and the profile clonal and resistance. 32 isolates were analyzed by PCR for the resistance genes and ERIC-PCR for genetic similarity. 5 strains were selected carrying greater amount of resistance genes and low similarity, these were subjected to sub-inhibitory concentrations of antibiotics minimum and IgG to determine the time of death, phagocytosis and rate of nitric oxide (NO) monocytes. Was detected in the two isolates *bla*<sub>KPC</sub> gene. All have *mexR*, *mexB*. 32 have the *stir* and *mexF* genes. 30 genetic profiles were detected. Activation of monocytes is largest, reduction of the amount of bacterial cells infected with bacteria when treated with the antibiotic most IgG. There were significant differences in NO production in those treated with meropenem and IgG. It was concluded that the combination of IgG and antibiotics may be a good alternative for treating infections because the bacteria is reduced in number facilitating phagocytosis.

Keywords: *P. aeruginosa*, IgG, Polimixina E, Meropenem

## INTRODUCTION

In Brazil, *Pseudomonas aeruginosa* is an important cause of infections, being the leading cause of pneumonia and the third cause of primary bloodstream infections in intensive care units (ICUs)<sup>12</sup>, have high rates of morbidity and mortality<sup>21, 11</sup>, in which several studies have associated their presence to a clonal spread of espécie<sup>19</sup>.

The resistance mechanisms used by *P. aeruginosa* makes it able to inhibit or circumvent the action of different types of antibiotics used in practice clinica<sup>10</sup>. In *P. aeruginosa*, the main mechanisms of resistance include metallo- $\beta$ -lactamase, KPC carbapenemase and overexpression pump efluxo<sup>19, 10, 7, 12</sup>.

The carbapenems are commonly considered as a last resort antibiotics and play a big role in the treatment of serious infections caused by multidrug-resistant bacteria (MDR) including *P. aeruginosa*<sup>14, 2, 30</sup>. Imipenem, meropenem and ertapenem are currently available carbapenems in clinical practice in the US, Europe and Brazil, have a broad spectrum of action for use in systemic infections. Have polymyxins have distinct mechanism of action of other antimicrobial agents currently used, allowing them to be active against many species of MDR bacteria. Due to limitations in therapeutic options, the doctors returned to the use of polymyxins for most infections by resistant bacteria, despite their toxicidade<sup>1, 15</sup>.

Human Intravenous Immunoglobulin G (IVIG) has been used as replacement therapy for patients with immunodeficiency immunoglobulins. However in many countries, with treatment the immunoglobulin G (IgG) and antibiotics has shown successful results, which motivates further research as the in vitro activity of human IgG front isolated related to health care of different bacterial species, including *P. aeruginosa*<sup>29</sup>.

The difficulty of treating health care associated infections (HAIs) caused by *P. aeruginosa* isolates under investigation of the genetic profile of resistance isolates of this bacterial species and the possible contribution of the use of human IgG in treating these infections. Porting, the aim of this study was to assess the clonal and resistance as well as the action of human IgG with meropenem and polymyxin E against isolates of *P. aeruginosa* obtained from HAIs in Recife, Pernambuco.

## MATERIALS AND METHODS

### Bacterial isolates

For this study were used 32 bacterial isolates of the species *P. aeruginosa* from HAIs, 2 public hospitals in the metropolitan region of Recife-PE, in the years 2012 and 2014. All isolates were identified and typed phenotypically, still in the hospital of origin using the automated system VITEK 2 BioMérieux.

### DNA extraction

The extraction of total DNA of the bacterial isolates of *P. aeruginosa* was performed using the kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) according to manufacturer's instructions. Bacterial samples were grown in BHI (Brain Heart Infusion) for 24 hours at 37 ° C and 1 ml of the culture was used to accomplish the extraction. The total extracted DNA was rehydrated with 50  $\mu$ l of DNA hydration solution for storage at -20. Subsequently this DNA was quantified using the NanoDrop Thermo Scientific equipment in the Center for Technology Platforms - NPT CPqAM / FIOCRUZ.

### **Determining the presence of resistance genes *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>VIM</sub> and *bla*IMP and genes that make up the efflux pumps MexAB-OprM and MexEF-OprN**

Analysis of the presence of the genes for production of  $\beta$ -lactamases and efflux pumps and ribosomal *rpsL* gene in *P. aeruginosa* isolates was performed by PCR using primers described anteriormente<sup>6, 7, 17, 23, 27</sup>. The amplification reactions were performed using a total volume of 25  $\mu$ l per tube, comprising: 1  $\mu$ l of genomic DNA 20ng /  $\mu$ L, 1U Taq DNA polymerase (Promega), 200 M of deoxyribonucleotide triphosphate (GeHealthcare), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 15pmol of the primers, and 2,5  $\mu$ l buffer (10x). For displaying the results the amplicons were subjected to electrophoresis on agarose gel 1.5%, stained with Blue green (LGC Biotechnology) in a horizontal electrophoresis unit. The amplification products were visualized under ultraviolet transilluminator (Transilluminator LOCCUS Biotechnology - L. PIX) and then photodocumented.

### **ERIC-PCR**

The determination of the clonal relationship of the isolates of *P. aeruginosa* was determined by the technique ERIC-PCR<sup>12</sup>. Amplification reactions were prepared in a total volume of 25  $\mu$ l per well, containing: 100 ng of genomic DNA, a 200 each deoxyribonucleotide triphosphate (Invitrogen), 10x buffer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.0 U Taq DNA polymerase (Invitrogen) and 20 pmol of ERIC-1 primers (5'-ATGTAAGCT CCTGGGGATTAC-3') and ERIC-2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'), previously described<sup>12</sup>. The genetic profile was analyzed from a dendrogram generated by the Palaeontological Statistics software (PAST) version 2.17.

### **Selection of isolates**

To determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), the death time of isolates against meropenem and polymyxin E, phagocytosis rate of production and dosing of Nitric Oxide (NO) production by human monocytes, we selected five strains of *P. aeruginosa*, using as criteria for selecting the low clonally, the presence of a larger amount of resistance genes and genes for efflux pumps (Table 1).

### **Minimum Inhibitory Concentration (MIC)**

MICs of meropenem and polymyxin E were determined for five selected *P. aeruginosa* isolates. The macrodilution broth test was performed according to the standards of the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI-2013)<sup>4</sup>, using the *P. aeruginosa* ATCC 27853 reference strains and *Escherichia coli* ATCC 25922 as quality control. Bacterial isolates were inoculated in 1 ml BHI and maintained for 18 hours in an oven at 37° C. The inoculum was adjusted to 0.5 MacFarland scale corresponding to 10<sup>7</sup> CFU / ml. Then a dilution series was made 1: 1 with Mueller Hinton broth.

### **Initial training of the experimental groups**

After analyzing the results of the MIC of the bacterial isolates against meropenem and polymyxin E, sub-minimum inhibitory concentrations (sub-MICs) were determined for achieving the time kill experiments, phagocytosis rate of NO and dosing (Table 2). Bacterial isolates were subjected to sub-MICs of meropenem and

polymyxin E alone or in combination with 4 mg/microl human immunoglobulin G (Endobulin Kiovig - BAXTER).

#### **Time-kill of the bacterial isolates**

To determine the kill time of the selected bacterial isolates were subjected to sub-MICs of meropenem and polymyxin antibiotics and isolation, combination and in combination with human IgG (Table 2). This experiment was performed in culture plates with a final volume of one ml containing Mueller Hinton broth and meropenem antibiotic, polymyxin E and/or human IgG in the desired concentrations. After 2, 5 and 8 hours of incubation at 37 ° C was performed to counting the colony forming units (CFUs).

#### **Determination of phagocytosis rate**

The analysis time of death results (Table 2) showed that the test groups growth, with 8 hours of incubation, were selected for the evaluation and the phagocytosis rate of nitric oxide production by human monocytes challenged with isolates of *P. aeruginosa* respective experimental groups. The phagocytosis rate and of nitric oxide were performed according to protocol described by Morais et al.<sup>18</sup>. 100ul of bacterial inoculum adjusted to 0.5 MacFarland scale obtained after growth for 8 hours at different testing conditions were subjected to monocytes in 1 ml of RPMI. Subsequently, the final volume obtained was placed on slides for light microscopy incubation at 37 ° C for 1 hour. After incubation the supernatant was removed to a dosage of nitric oxide and the slides were mounted and stained for light microscopy. Analysis of phagocytosis rate was measured as a percentage of monocytes carrying bacterial cell phagocytosis. In all experiments included a group was challenged monocytes to bacterial cells without subjection to antibiotics or human IgG and a group under the same test conditions without the presence of bacterial cells.

#### **Nitric Oxide dosage (NO)**

The production of NO was determined by the cell culture supernatant nitrite concentration using the same experimental groups described in Table 2, according to the protocol described by Morais et al.<sup>18</sup>. 50 ul of the supernatants collected from the different experimental groups was added 50 l of Griess reagent (1.5% sulfanilamide in 5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0.1% in H<sub>2</sub>O naphthyl ethylenediamine dihydrochloride). The dosage level was evaluated in triplicate technique. After 15 minutes at rest and at ambient temperature, the measurement was performed by ELISA (Bio-Rad, Model 680) using 550 nm filter. The concentration of nitrite was calculated using the mean absorbance of triplicate techniques compared to the average of the standard curve.

#### **Statistical analysis**

Using GraphPad Prism 5.0 software, analysis of variance (ANOVA) was used to compare the means between the different experimental groups. When the ANOVA results showed a statistically significant difference, the Dunnett's significance tests and Turkey's test were performed. The results were expressed in mean. Significance was set at  $p < 0.05$ .

## **RESULTS**

### Determining the phenotypic and genetic profile of *P. aeruginosa* resistance

All *P. aeruginosa* isolates with resistance to at least one class of antimicrobials used in clinical practice (Table 3). The *bla*<sub>CTX</sub> resistance genes, *bla*<sub>VIM</sub> and *bla*<sub>IMP</sub> coding of ESBL CTX-M and metallo- $\beta$ -lactamase VIM and IMP were not detected in any of the 32 isolates of *P. aeruginosa* included in this study. However, two bacterial isolates (22 and 140) detected the presence of *bla*<sub>KPC</sub> gene, which codes for the production of carbapenemase KPC.

All *P. aeruginosa* isolates have the *mexB* and *mexR* gene, encoding the active *mexB* transport protein and transcriptional regulator *mexR*, the constitutive efflux pump MexAB-OprM. Of the 32 *P. aeruginosa* isolates, only isolate 140 showed no *mexA* gene encoding the protein constituent of said periplasmic efflux system (Table 3).

Additionally, all *P. aeruginosa* isolates have *mexE* gene encoding the periplasmic membrane protein *mexE*. However, only 140 isolate had not the gene *mexF* coding active transport protein efflux pump MexEF-OprN. All *P. aeruginosa* isolates were positive for ribosomal gene *rpsL* as control of the PCR reactions (Table 3).

### ERIC-PCR

Genotyping analysis of *P. aeruginosa* isolated by ERIC-PCR demonstrated the presence of distinct genetic profiles 30 out of 32 isolates of *P. aeruginosa*, as shown in Figures 4 and 5 and Table 3. We were able to show two sets of isolates presenting bacterial genetic similarity of 100%, the isolates 257 and 287 (clone P25, similarity 100%); 23213 and 32313 (clone P23, similarity 100%); therefore considered to be clones sets. These results demonstrate a wide dispersion of clonal isolates of *P. aeruginosa*, showing genetic similarity less than 65%, between two public hospitals in Recife-PE.

### MIC against meropenem and polymyxin E and selection of representative isolates.

After clonal profile analysis and detection of resistance genes, five representative strains of *P. aeruginosa* were selected as the various genetic and phenotypic characteristics (Table 1) to confirm the phenotypic resistance to meropenem and polymyxin E by the macrodilution broth test and analysis of variance and the phagocytosis rate nitric oxide production by monocytes challenged with these bacterial isolates when submitted or not to human IgG alone and in combination with meropenem and polymyxin E. Of the five strains tested four confirmed phenotypic resistance to meropenem and sensitivity polymyxin E.

### Time-Kill

The five isolates of *P. aeruginosa* were subjected to sub-MIC of polymyxin E and meropenem associated or not with human IgG. The results showed that all isolates inhibited growth in the times analyzed, compared to the control, when subjected to meropenem, polymyxin E and human IgG, alone and in combination, except for the 685 isolates submitted to IgG/polimixina E and 22 subjected to human IgG, which had similar bacterial growth under these conditions to the control (Table 2). Most bacterial growth inhibition occurred when

there was simultaneous submission of isolates to antibiotics in combination and when combined with human IgG.

### Phagocytosis rate (PR)

The results of the PR *P. aeruginosa* isolates of the subject antibiotic combinations and human IgG are shown in Table 2 and are illustrated in Figures 2 and 3.

The PR of *P. aeruginosa* isolates showed different characteristics according to the test performed. PR by comparing the isolated IgG underwent with the controls without submission, three isolates (257, 685 and 140) showed a higher phagocytosis rate due submission IgG, raising the level of activation of monocytes and inducing phagocytosis, which was increased independent of bacterial growth inhibition obtained with the lowest amount of viable bacterial cells. However, two isolates (59 and 22) demonstrated less PR when subjected to human IgG over the controls, which may have occurred because the amount of bacterial cells present, as the large amount of activated monocytes and few bacterial cells present to be phagocytosed. The simultaneous use of meropenem associated with IgG showed increased PR on the amount of isolated bacterial cells, considering the strong inhibitory action on the growth of meropenem isolated. The action of polymyxin E in combination with IgG showed no increased rate of phagocytosis of bacterial isolates considering the inhibition of the growth of the bacterial cells, demonstrating the action of polymyxin E variation on bacterial growth and PR.

### Dosage Nitric Oxide (NO)

The concentration of NO produced by monocytes challenged by five isolates of *P. aeruginosa* in different conditions-testing was variable. Isolates 685 and 22 increased NO production compared to the control group, with statistical significance ( $p < 0.05$ ) only when subjected to meropenem (Figures 4 and 5). Additionally, only the submission of 257 isolated human IgG increased the dosage of NO with  $p < 0.001$ , with no statistically significant difference induced by the other groups compared to control (Figure 6).

Submission isolated 59 to all groups tested (IgG, meropenem, polymyxin E, IgG/meropenem, IgG/polymyxin E and IgG/meropenem/polymyxin E) increased NO production compared to the control,  $p < 0.001$  (Figure 7). However, the production of by monocytes challenged with the 140 isolate showed no significant difference in any of the groups tested (Figure 8).

## DISCUSSION

The analysis of the genetic profile of resistance performed in this study using 32 isolates of *P. aeruginosa* bacterial obtained from HAIs public hospitals in Recife in 2014, did not detect the presence of genes *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub> and *bla*<sub>CTX-M</sub>, despite the phenotypic resistance cephalosporins presented in all isolates and at least one carbapenems 24 strains. In a study conducted in 2010 by Camargo et al.<sup>3</sup> using 47 isolates of *P. aeruginosa*, obtained in the University Hospital of Sao Paulo in 2006 and 2007, the *bla*<sub>IMP</sub> gene was detected in 4 isolates analyzed. Other studies conducted in Brazil, using *P. aeruginosa* isolates obtained from HAIs also detected the presence of genes *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub> and *bla*<sub>CTX-M-2</sub><sup>9,22</sup>.

Although there is a strong relationship between the presence of genes encoding Metallo- $\beta$ -lactamase (MBL) in phenotypically resistant isolates of *P. aeruginosa*, some studies have reporting a modification of this

genetic profile in some parts of Brazil. In 2011, Rodrigues et al.<sup>24</sup> showed that none of the isolates of *P. aeruginosa* obtained from two public hospitals in the state of Mato Grosso do Sul, in 2007 and 2008, contained the *bla<sub>IMP</sub>* and *bla<sub>VIM</sub>* genes. Jacome et al.<sup>12</sup> also demonstrated that modification of *P. aeruginosa* isolates resistant to carbapenems profile, indicating the absence of involvement of MBL genes encoding the resistance of *P. aeruginosa* isolates obtained from hospitals in five Recife -PE.

The *bla<sub>KPC</sub>* gene, often found in MDR isolates of *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa* was reported in for the first time in Brazil, in a study of isolates from Recife-PE12 [1]. In this study, two isolates of *P. aeruginosa* with different clonal profiles showed *bla<sub>KPC</sub>* the gene. The presence of this gene in *P. aeruginosa* isolates with low clonally obtained in different years and hospitals can infer the possible occurrence of spread of the resistance gene in bacterial isolates from different hospitals Recife-PE municipality.

The application of the technique of molecular typing by ERIC-PCR in *P. aeruginosa* isolates has become a great alternative to obtaining genetic typing with high discriminatory power in this bacterial species, with efficiency compared with other standard molecular typing techniques, including The PFGE<sup>28, 31</sup>. Therefore, the detection of 30 clonal profiles among the 32 isolates of *P. aeruginosa* used in this study, can infer a high genetic heterogeneity between strains analyzed, which can be attributed, among other factors, the acquisition of mobile genetic elements across species bacterianas<sup>12</sup>.

The presence of the genes that make up the efflux pumps MexAB-OprM and MexEF-OprN more than 95% of the isolates analyzed in this study probably related to this resistance displayed by isolates at least one carbapenem used in clinical practice for treating infections *P. aeruginosa*<sup>7,13,16,20,23,25</sup>

The submission of representative isolates of *P. aeruginosa* human IgG, meropenem and polymyxin E alone and in combination showed synergistic activity in most of the tested conditions, with decreased bacterial growth compared to untreated control. Similar results were highlighted in the study Safarika et al.<sup>26</sup> in 2014, where the synergistic activity of polymyxin E and carbapenem imipenem in combination with levofloxacin was determined using 47 isolates of *P. aeruginosa*, obtained from the university hospital patients Athens - Greece, concluding that the combinations of antibiotics using carbapenem imipenem may be a good option but it is not 100% effective in *P. aeruginosa* resistant combat.

In the present work can be demonstrated increased phagocytosis rate of most isolates underwent IgG, meropenem and polymyxin E, alone or in combination Farag et al<sup>8</sup> investigated the in vitro effect of intravenous immunoglobulin (IVIG) the ability of human neutrophils to phagocytose and kill *Staphylococcus aureus* methicillin-resistant (MRSA), have shown that IVIG significantly increased killing of MRSA neutrophils in all tested IgG concentrations (0.1-5 mg / ml) for 30-80% of control values.

Tanaka et al.<sup>29</sup> demonstrated that the antibiotic meropenem sub-inhibitory concentrations causing detrimental morphological changes of *P. aeruginosa* cells, and the bacterial count decreases with strain of 2 hours with the antibiotic submission. It also demonstrated that bacterial cells subjected to human serum containing IgG, had intense decrease in growth in just 30 minutes. This work is not determined, however, if there is modification of bacterial growth due to the association of meropenem IgG present in human serum. In the present study, it is demonstrated for the first time synergistic activity in combination with human IgG meropenem for *P. aeruginosa* isolates with different clonal profiles and having different resistance genes.

The increased activation of human monocytes in the presence of IgG certainly increased the phagocytosis of the bacterial cells *in vitro*, which can be even more evident when combined to meropenem,

probably due to the decreased amount of bacterial cells and cell injury induced by facilitating further phagocytosis. This study encourages the need for new research to investigate the action of human IgG combined with meropenem *in vivo*, in order to determine the improvement in efficacy of treatment of infections caused by bacteria resistant to antibiotics used in clinical practice.

### acknowledgments

The whole cell biology laboratory staff and molecular Fiocruz Pernambuco. Especially to pesquisadores doctors Fábio André Brayner dos Santos, Dyana Leala Veras and Luiz Carlos Alves. Thank you Dr. Célia Maria Barbosa Machado de Castro for the collaboration by donating human monocytes.

### REFERENCIAS

1. Agencia nacional de vigilância sanitária, 2015. Antimicrobianos - principais grupos disponíveis para uso clínico.  
[http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede\\_rm/cursos/rm\\_controle/opas\\_web/modulo1/polimixinas5.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/polimixinas5.htm) (online).
2. Breilh, D., Texier-Maugein, J. Allaouchiche, B., Saux, MC., Boselli, E. 2013. Carbapenems. *Jour. of Chemo.* 25:1-17 .
3. Camargo, C. H., Nascimento, A. B., Mondelli, A. L., Montelli, A. C., Sadatsune T., 2010. Detection of SPM and IMP metallo- $\beta$ -lactamases in clinical specimens of *Pseudomonas aeruginosa* from a Brazilian public tertiary hospital. *Braz. Jour. Infec. Dis.* 15:478-481.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2006. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 18th informational supplement. M100-S18. CLSI, Baltimore, MD.
5. Djordjevic, Z., Folic, MM., Zivic, Z., Markovic V., Jankovic S.M. 2013 Nosocomial urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species: Sensitivity to antibiotics and risk factors. *Amer. Jour. of Inf. Cont.*, 41:1182–1187.
6. Dong, F., Xu X., Song, W., Lü P., Yu S., Yang, Y., Shen X. (2008) Characterization of multidrug-resistant and metallo-beta-lactamase- producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a paediatric clinic in China. *Chinese Medi. Jour.* 121:1611-1616.
7. Dumas JL. Delden CV. Perron K. Koehler T. (2006) Analysis of antibiotic resistance gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* by quantitative real-time-PCR. *FEMS micro. Let.* 254:217-25.
8. Farag, N., Mahran, L., Abou-Aisha, K., El-Azizi, M., 2013. Assessment of the efficacy of polyclonal intravenous immunoglobulin G (IVIG) against the infectivity of clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in vitro and in vivo. *Europ. Jour. of Clin. Micro. & Infec. Dis.*, 32:1149-60.
9. Franco, M. R. G., Caiaffa-Filho, H. H., Burattini, M. N., Ross, F., 2010. Metallo-beta-lactamases among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian university hospital. *Clinics.* 65:825–829.
10. Gayathri, D. Eramma, N.K., Devaraja, T.N. 2012 Review article New Delhi metallo beta- Lactamase-1 ; Incidence and threats . *Inter. Jour. of Biol. & Med.l Res.* 3:1870-1874.
11. Hattemer, A., Hauser, A., Diaz, M., Scheetz, M., Shah, N., Allen J.P., Porhomayon, J., El-Solh, A.A. 2013 Bacterial and Clinical Characteristics of Health Care-and Community-Acquired Bloodstream Infections Due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Antim. Age. and Chemo.y* 57:3969-75.

12. Jácome, P.R.L.A., Alves, L.R., Cabral, A.B., Lopes, A.C.S., Maciel, M.A.V. 2012 Phenotypic and molecular characterization of antimicrobial resistance and virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Recife, State of Pernambuco, Brazil. *Ver da Soc Bras de Med Trop*, 45:707-712.
13. Llanes, C., Hocquet, D., Vogne, C., Benali-Baitich, D., Neuwirth, C., Plésiat, P. 2004. Clinical Strains of *Pseudomonas aeruginosa* Overproducing MexAB-OprM and MexXY Efflux Pumps Simultaneously. *Antim. Ag. and chemo.* 48:1797-1802.
14. Linden, P. 2007 Safety profile of meropenem: An updated review of over 6000 patients treated with meropenem. *Drug Safety* 30: 657–668.
15. Maragakis, L.L., PERL, T.M. 2008 *Acinetobacter baumannii*: Epidemiology, Antimicrobial Resistance and Treatment Options. *Clin. Infec. Dis.* 46:1254-1263.
16. Meiying, Y., Pengyuan, W., Yucun, L. 2014. Molecular typing and resistance mechanisms of carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a Chinese surgical intensive care unit. *Chin. Med. Jour.* 127:1071–1076.
17. Moland, E.S., Hanson, N.D., Herrera, V.L., Black, J.A., Lockhart, T.J., Hossain, A., Johnson, J. A., Goering, R.V., Thomson, K.S., 2003 Plasmid-mediated, carbapenem-hydrolysing beta-lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Jour. of Antim. Chemo.* 51:711-714.
18. Morais, N.G., Costa, T.B., Almeida, T.M., Severo, M.S., Castro, C.M.M.B. 2013 Immunological parameters of macrophages infected by methicillin resistant / sensitive *Staphylococcus aureus*. *Jour. Bras. de Pato. e Med.* 49: 84-90.
19. Neves, P.R., Mamizuka, E.M., Levy, C.E., Lincopan, N. 2011 *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. *Jornal Brasileiro de Patologia e Med. Lab.* 47:409-420.
20. Pai, H., Kim, J. W., Kim, J., Lee, J. H., Choe, K. W., Gotoh, N. 2001. Carbapenem Resistance Mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates Carbapenem. *Antim. Ag. Chemo.*, 45:480.
21. Picoli, S.U., 2008 Metallo- $\beta$ -lactamase e *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Bras de Anál Clín* 40:273-277.
22. Polotto, M., Casella, T., Oliveira, M. G. L., Rúbio, F. G., Nogueira, M. L., Almeida, M. T. G., Nogueira, M. C. L. 2012. Detection of *P. aeruginosa* harboring bla CTX-M-2, bla GES-1 and bla GES-5, bla IMP-1 and bla SPM-1 causing infections in Brazilian tertiary-care hospital. *BMC Infec. Dis.*, 12:176.
23. Poonsuk, K., Chuanchuen, R., 2014 Detection of the Mex Efflux Pumps in *Pseudomonas aeruginosa* by Using a Combined Resistance-Phenotypic Markers and Multiplex RT-PCR. *Open Jour. of Med. Micro.* 4:153–160.
24. Rodrigues, A. C. S. Chang, M. R., Nobrega, G. D., Rodrigues, M. S., Carvalho, N. C. P., Gomes, B. G., Almeida, D. L., Carvalho, K. R., Asensi, M. D., 2007. Metallo-  $\beta$  -lactamase and genetic diversity of *Pseudomonas aeruginosa* in intensive care units in Campo Grande, MS, Brazil. *The Braz. Jour. Infec. Dis.* 15:195–199.
25. Sacha, P., Wieczorek, P., Ojdana, D., Hauschild, T., Milewski, R., Czaban S., Poniatowski, B., Tryniszewska E. B. 2014. Expression of MexAB-OprM efflux pump system and susceptibility to antibiotics of different *Pseudomonas aeruginosa* clones isolated from patients hospitalized in two intensive care units at University Hospital in Białystok (northeastern Poland) between January 2002 and December 2009. *APMIS: Acta pathol. Microb. et immuno. Scand.*, 122:931–940.

26. Safarika, A., Galani, I., Pistiki, A., Giamarellos-Bourboulis, E. J. 2014. Time–kill effect of levofloxacin on multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: synergism with imipenem and colistin. *Europ. Jour. of Clin. Micro. & Infec. Dis.*, 34:317–323.
27. Saladin, M., Cao, V.T.B., Lambertet, T., Donay J., Herrmann, J.L., Ould-Hocine, Z., Verdet C., Delisle, F., Philippon, A., Arlet, G., 2002 Diversity of CTX-M beta-lactamases and their promoter regions from *Enterobacteriaceae* isolated in three Parisian hospitals. *FEMS Micro. Let.* 209:161-168.
28. Silbert, S., Pfaller, M. A., Hollis, R. J., Barth, A. L., Sader, H. S., 2014. Evaluation of three molecular typing techniques for nonfermentative gram-negative bacilli. *Infec. control and hosp. Epidem.*, 25:847-851.
29. Tanaka, J., Nakae, T., Takatoshi O., Horiuchi, Y., Miyamoto, H., Adan-Kubo, J., Adachi, H., Ono, Y., 2010 Complement-mediated bacteriolysis after binding of specific antibodies to drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: morphological changes observed by using a field emission scanning electron microscope. *Jour. Infec. Chemo.* 16:383-387
30. Voulgari E. Poulou A. Koumaki V. Tsakris A. (2013) Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: now that the storm is finally here, how will timely detection help us fight back? *Fut. Micro.* 8:27-39.
31. Wolska, K.; Szweda, P. 2008. A comparative evaluation of PCR ribotyping and ERIC PCR for determining the diversity of clinical *Pseudomonas Aeruginosa* isolates. *Polish Jour. of Micro.*, 57:157–163.

Table 1. Selected *P. aeruginosa* isolates representative on the profile clonal, genetic and phenotypic

| isolates <i>P. aeruginosa</i> | Resistance gene           |                                      | MIC (µg/ml) <sup>a</sup> |             | Clonal profile |
|-------------------------------|---------------------------|--------------------------------------|--------------------------|-------------|----------------|
|                               | β-lactamase               | Efflux pump                          | Meropenem                | polymyxin E |                |
| 22                            | <i>bla</i> <sub>KPC</sub> | <i>mexA, mexB, mexE, mexF e mexR</i> | 8 (R)                    | 0,5 (S)     | P16            |
| 59                            | -                         | <i>mexA, mexB, mexE, mexF e mexR</i> | 8 (R)                    | 0,5 (S)     | P20            |
| 140                           | <i>bla</i> <sub>KPC</sub> | <i>mexB, mexE e mexR</i>             | 32 (R)                   | 1 (S)       | P2             |
| 257                           | -                         | <i>mexA, mexB, mexE, mexF e mexR</i> | 8 (R)                    | 1 (S)       | P25            |
| 685                           | -                         | <i>mexA, mexB, mexE, mexF e mexR</i> | 2 (S)                    | 1 (S)       | P22            |

MIC<sup>a</sup> - Minimum Inhibitory Concentration; R - Resistant; S - sensitive.

Table 2. Time Kill and phagocytosis rate of *P. aeruginosa* isolates submitted for 8 hours to meropenem, polymyxin E and human IgG, alone and in combination.

| Isolates <i>P. aeruginosa</i> | Treatment ( concentration ) <sup>a</sup>     | Phagocytosis rate % | Count CFUs <sup>b</sup> |       |       |
|-------------------------------|----------------------------------------------|---------------------|-------------------------|-------|-------|
|                               |                                              |                     | 2h                      | 5h    | 8h    |
| 257                           | untreated                                    | 57                  | > 750                   | 1000  | >1000 |
|                               | IgG (4)                                      | 62                  | 660                     | 648   | 684   |
|                               | Meropenem (4)                                | 10                  | 120                     | 49    | 83    |
|                               | polymyxin E (0,25)                           | 18                  | 26                      | 13    | 111   |
|                               | IgG (4); Meropenem (4)                       | 23                  | 52                      | 26    | 12    |
|                               | IgG (4); polymyxin E (0,25)                  | 10                  | SC                      | 2     | 13    |
|                               | Meropenem (4); polymyxin E (0,25)            | -                   | 2                       | SC    | SC    |
|                               | IgG (4); Meropenem (0,4); polymyxin E (0,25) | -                   | 2                       | SC    | SC    |
| 685                           | untreated                                    | 53                  | 608                     | >1000 | >1000 |
|                               | IgG (4)                                      | 77                  | 356                     | >1000 | 396   |
|                               | Meropenem (1)                                | 39                  | 118                     | 104   | 328   |
|                               | polymyxin E (0,25)                           | 25                  | 65                      | 8     | 3     |
|                               | IgG (4); Meropenem (1)                       | 17                  | 48                      | 98    | 100   |
|                               | IgG (4); polymyxin E (0,25)                  | 17                  | 136                     | >1000 | >1000 |
|                               | Meropenem (4); polymyxin E (0,25)            | -                   | 6                       | SC    | SC    |
|                               | IgG (4); Meropenem (1); polymyxin E (0,25)   | 13                  | 7                       | 2     | 84    |
| 59                            | untreated                                    | 82                  | 242                     | >300  | >1000 |
|                               | IgG (4)                                      | 51                  | 96                      | >200  | >350  |
|                               | Meropenem (4)                                | 9                   | 90                      | >100  | >300  |
|                               | polymyxin E (0,25)                           | -                   | SC                      | SC    | SC    |
|                               | IgG (4); Meropenem (4)                       | 41                  | 158                     | 178   | 84    |
|                               | IgG (4); polymyxin E (0,25)                  | -                   | SC                      | 10    | SC    |
|                               | Meropenem (4); polymyxin E (0,25)            | -                   | SC                      | SC    | 3     |
|                               | IgG (4); Meropenem (4); polymyxin E (0,25)   | -                   | SC                      | SC    | SC    |
| 140                           | untreated                                    | 40                  | >200                    | >250  | >1000 |
|                               | IgG (4)                                      | 57                  | 220                     | 700   | 400   |
|                               | Meropenem (8)                                | 40                  | >200                    | >400  | 440   |
|                               | polymyxin E (0,5)                            | -                   | 3                       | SC    | SC    |
|                               | IgG (4); Meropenem(8)                        | 43                  | 218                     | 300   | 400   |
|                               | IgG (4); polymyxin E (0,5)                   | -                   | 9                       | SC    | SC    |
|                               | Meropenem(8); polymyxin E (0,5)              | -                   | 11                      | SC    | SC    |

|    |                                               |    |     |     |       |
|----|-----------------------------------------------|----|-----|-----|-------|
|    | IgG (4); Meropenem(8);<br>polymyxin E (0,5)   | -  | SC  | SC  | SC    |
|    | untreated                                     | 67 | 306 | 810 | >1000 |
|    | IgG (4)                                       | 48 | 322 | 540 | >1000 |
|    | Meropenem (4)                                 | 2  | 90  | 56  | 48    |
| 22 | polymyxin E (0,25)                            | -  | SC  | SC  | SC    |
|    | IgG (4); Meropenem (4)                        | 8  | 28  | 25  | 12    |
|    | IgG (4); polymyxin E (0,25)                   | -  | SC  | SC  | SC    |
|    | Meropenem (4); polymyxin E<br>(0,25)          | -  | SC  | SC  | SC    |
|    | IgG (4); Meropenem (4);<br>polymyxin E (0,25) | -  | SC  | SC  | SC    |

<sup>a</sup>IgG - Immunoglobulin G: concentration -mg / ml; Meropenem; Polymyxin E: concentration - ug / ml; <sup>b</sup>CFU - Colony Forming Units; SC - No bacterial growth.

Table 3. Profile clonal, phenotypic and genetic resistance of *P. aeruginosa* isolates obtained in Recife.

| Isolados | Origem /Ano | Perfil de resistência fenotípica <sup>a</sup>                               | <i>mexA</i> | <i>mexR</i> | <i>mexF</i> | <i>MexE</i> | <i>mexB</i> | <i>rpsL</i> | <i>bla<sub>VIM</sub></i> | <i>bla<sub>IMP</sub></i> | <i>bla<sub>KPC</sub></i> | <i>bla<sub>CTX</sub></i> | ERIC-PCR |
|----------|-------------|-----------------------------------------------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|----------|
| 1026.3   | A / 2012    | CEFO                                                                        | +           | +           | +           | +           | +           | +           | -                        | -                        | -                        | -                        | P24      |
| 1039.3   | A / 2012    | CEFO                                                                        | +           | +           | +           | +           | +           | +           | -                        | -                        | -                        | -                        | P28      |
| 685.3    | A / 2012    | CEFO                                                                        | +           | +           | +           | +           | +           | +           | -                        | -                        | -                        | -                        | P22      |
| 570.3    | A / 2012    | CEFO, CAZ, PIPER                                                            | +           | +           | +           | +           | +           | +           | -                        | -                        | -                        | -                        | P29      |
| 575.3    | A / 2012    | ANIC, AZT, CEFO, CAZ, CIPRO, GENTA, MERO, IMIP, PIPER                       | +           | +           | +           | +           | +           | +           | -                        | -                        | -                        | -                        | P30      |
| 175      | B / 2014    | CEFURO, CEFURA, CAZ, CFT, CFP, MERO, IMIP, AMICA, CIPRO                     | +           | +           | +           | +           | +           | +           | -                        | -                        | -                        | -                        | P13      |
| 194      | B / 2014    | CEFURO, CEFURA, CAZ, CFT, CFP, AMICA, GENTA, CIPRO                          | +           | +           | +           | +           | +           | +           | -                        | -                        | -                        | -                        | P21      |
| 342      | B / 2014    | CEFURO, CEFURA, CAZ, CFT, CFP, AMICA, GENTA, CIPRO                          | +           | +           | +           | +           | +           | +           | -                        | -                        | -                        | -                        | P6       |
| 23.313   | B / 2014    | AMOXIL, CEFURO, CEFURA, CFT, ANALID, NORF, NITROF                           | +           | +           | +           | +           | +           | +           | -                        | -                        | -                        | -                        | P23      |
| 32.313   | B / 2014    | AMOXIL, CEFURO, CEFURA, CFT, ANALID, NITRO, TRIMET                          | +           | +           | +           | +           | +           | +           | -                        | -                        | -                        | -                        | P23      |
| 537a     | B / 2014    | AMOXIL, CEFURO, CEFURA, CFT, CFP, GENTA, ANALID, CIPRO, NORF, NITRO, TRIMET | +           | +           | +           | +           | +           | +           | -                        | -                        | -                        | -                        | P12      |
| 537b     | B / 2014    | AMOXIL, CEFURO, CEFURA, CFT, CFP, GENTA, ANALID, CIPRO, NORF, NITRO, TRIMET | +           | +           | +           | +           | +           | +           | -                        | -                        | -                        | -                        | P10      |
| 682      | B / 2014    | CAZ, CFT, CFP, IMIP, MERO, GENTA, CIPRO                                     | +           | +           | +           | +           | +           | +           | -                        | -                        | -                        | -                        | P27      |
| 611      | B / 2014    | CAZ, CFT, CFP, AMICA, GENTA, CIPRO                                          | +           | +           | +           | +           | +           | +           | -                        | -                        | -                        | -                        | P7       |
| 493      | B / 2014    | PIPER, CFT, IMIP, MERO, CIPRO                                               | +           | +           | +           | +           | +           | +           | -                        | -                        | -                        | -                        | P14      |
| 59       | B / 2014    | CAZ, CFT, CFP, MERO, IMIP, CIPRO                                            | +           | +           | +           | +           | +           | +           | -                        | -                        | -                        | -                        | P20      |

|     |          |                                                          |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |     |
|-----|----------|----------------------------------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|
| 23  | B / 2014 | CFT, CAZ, CFP, AMICA, GENTA, CIPRO                       | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | P19 |
| 22  | B / 2014 | CFT, IMIP, MERO                                          | + | + | + | + | + | + | - | - | + | - | P16 |
| 14  | B / 2014 | CAZ, CFT, IMIP, MERO, AMICA,<br>GENTA, CIPRO             | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | P15 |
| 91  | B / 2014 | CFT, CFP, IMIP, MERO, GENTA, CIPRO                       | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | P17 |
| 141 | B / 2014 | CAZ, CFT, CFP, IMIP, MERO, AMICA                         | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | P18 |
| 134 | B / 2014 | CFT, IMIP, MERO                                          | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | P1  |
| 140 | B / 2014 | CFT, IMIP, MERO                                          | - | + | - | + | + | + | - | - | + | - | P2  |
| 209 | B / 2014 | CAZ, CFT, CFP, IMIP, MERO, AMICA,<br>GENTA, CIPRO        | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | P3  |
| 203 | B / 2014 | CAZ, CFT, CFP, IMIP, MERO, AMICA,<br>GENTA               | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | P4  |
| 257 | B / 2014 | CAZ, CFT, CFP, IMIP, MERO, AMICA,<br>GENTA, CIPRO, COLIS | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | P25 |
| 287 | B / 2014 | CAZ, CFT, CFP, AMICA, GENTA, CIPRO                       | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | P25 |
| 312 | B / 2014 | CAZ, CFT, CFP, IMIP, MERO, AMICA,<br>GENTA, CIPRO, COLIS | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | P5  |
| 376 | B / 2014 | CAZ, CFT, CFP, IMIP, MERO, AMICA,<br>GENTA, CIPRO        | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | P9  |
| 386 | B / 2014 | CFT, IMIP, MERO                                          | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | P8  |
| 428 | B / 2014 | CFT, IMIP, MERO                                          | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | P11 |
| 422 | B / 2014 | CAZ, CFT, CFP, IMIP, MERO, AMICA,<br>GENTA               | + | + | + | + | + | + | - | - | - | - | P26 |

Note: <sup>a</sup> Phenotypic profile of resistance of *P. aeruginosa* isolates determined by the system automatoizado VITEK 2. CEFO: cefotaxima, CFT: ceftriaxona, CEFURO: cefuroxina, CEFURA: cefuroxinaaxetil, AZT: aztreonam, CAZ: ceftazidima, CFP: cefepima, IMIP: imipenem, MERO: meropenem, GENTA: gentamocina, CIPRO: ciprofloxacina, COLIS: colistina, PIPER: piperacilina/tazobactam, AMICA: ampicilina, ANALID: ácido nalidixico, TRIMET: trimetoprim/sulfametoxazol, NORF: norfloxacina, NITRO: nitrofurantoína, CFT: ceftriaxona. A e B: Public hospitals in Recife, places of origin of bacterial isolates.

+: present, -: Missing.

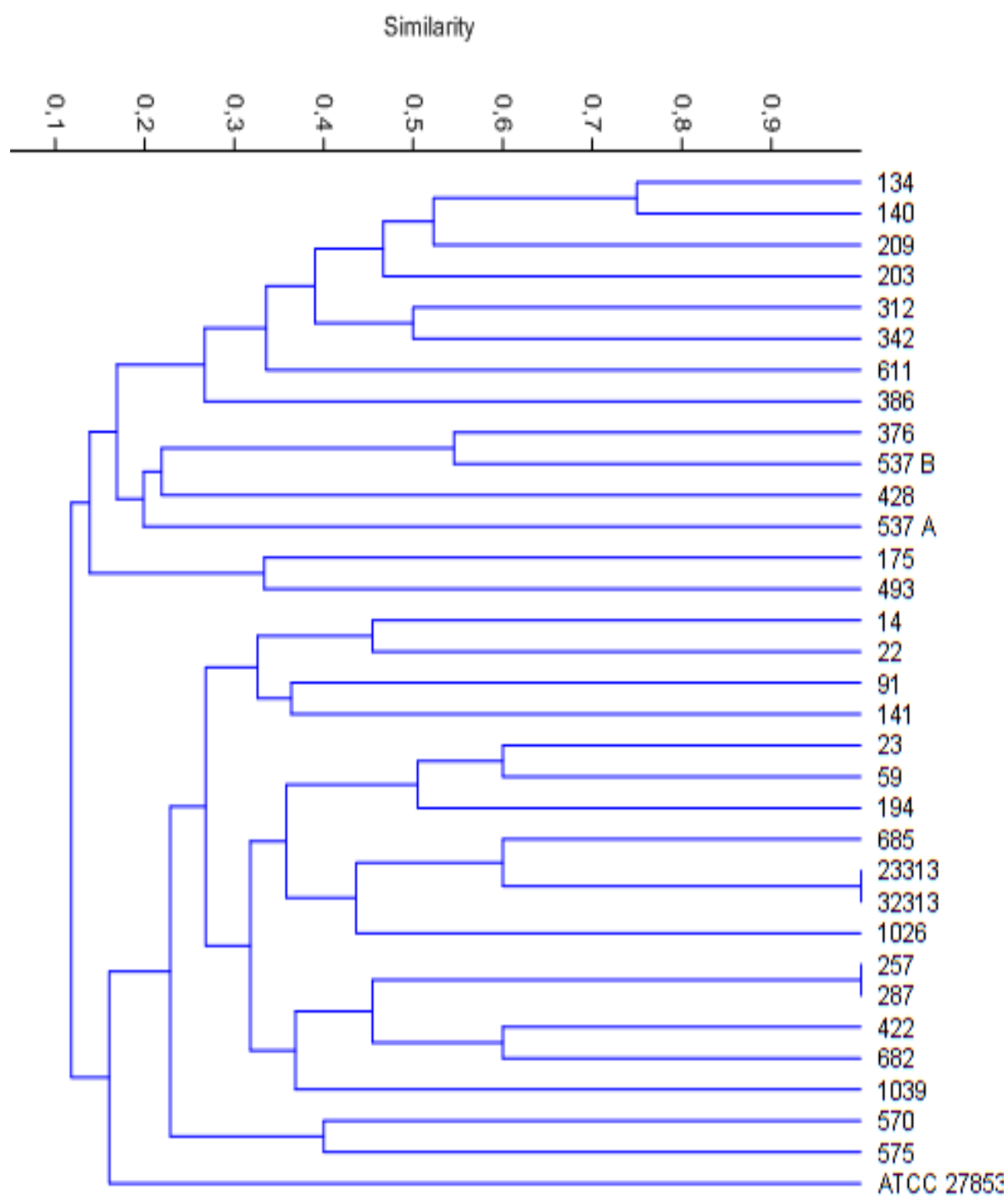


Figure 1. Dendrogram genotyping by ERIC-PCR of 32 isolates of *P. aeruginosa* from HAIs two public hospitals in Recife PE.

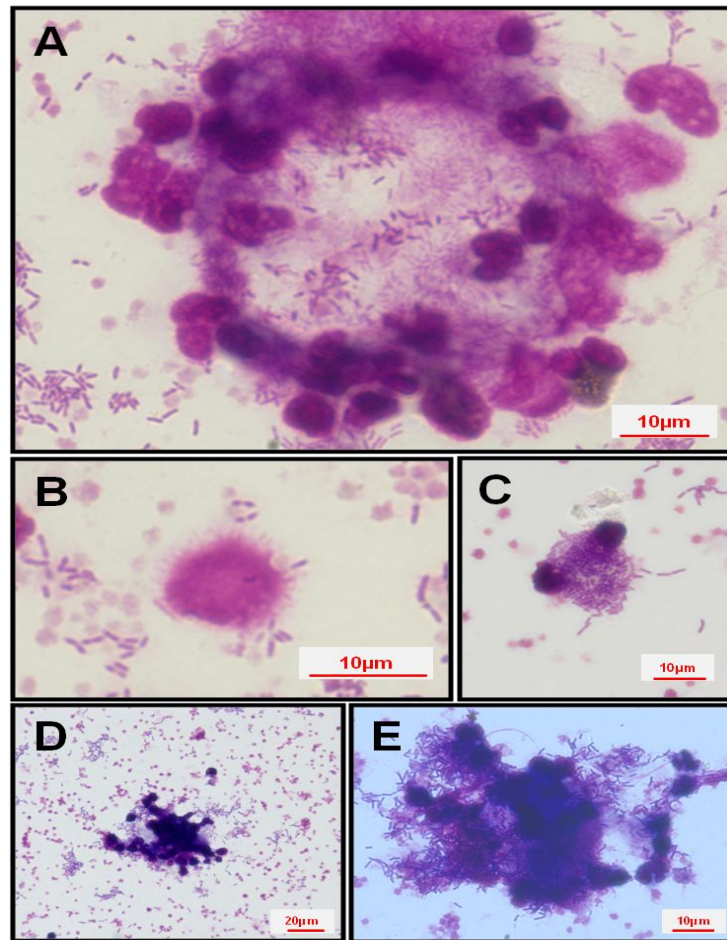


Figure 2 (A-E). Micrographs of monocytes challenged with isolates of *P. aeruginosa* undergoing human IgG. Monocytes challenged with 685 bacterial isolates (A and B), 140 (C) and 257 (D and E). Note the presence of activated monocytes, performing phagocytosis and forming clusters.

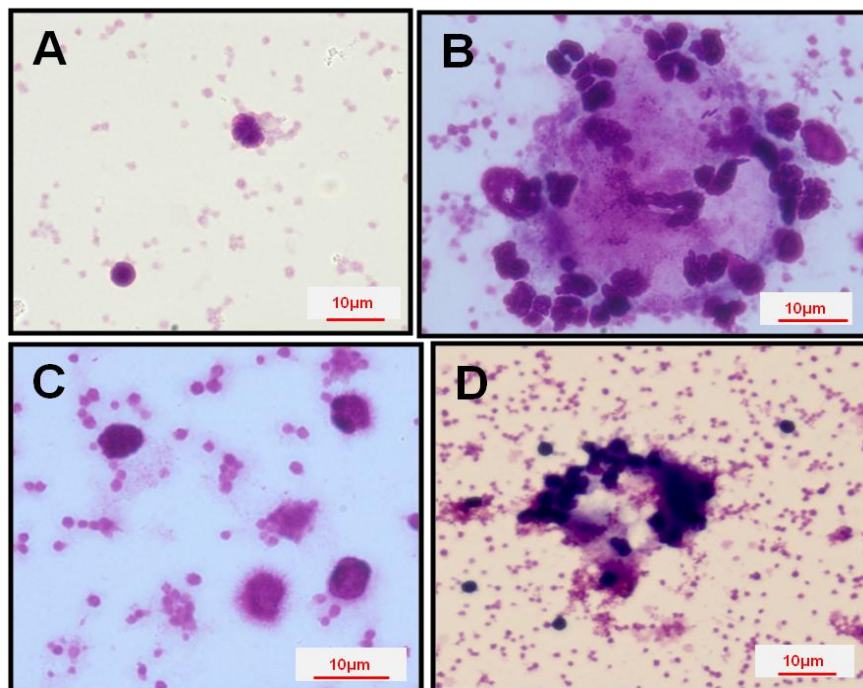


Figure 3 (A-D). Micrographs of monocytes challenged with isolates of *P. aeruginosa* undergoing human IgG, meropenem and polmyxin E (A) Control group: no submission monocytes to bacterial cells - without activation observed and isolated monocytes; (B) monocytes challenged with the isolated 685 after submission with polmyxin E - note the presence of a few bacterial cells being engulfed by monocytes; (C) monocytes challenged as isolated 257 subjected to polmyxin E and IgG - observe monocytes activated without bacterial cells; (D) monocytes challenged with the isolated 685 subjected to IgG, meropenem and polmyxin E - observe activated monocytes performing phagocytosis.

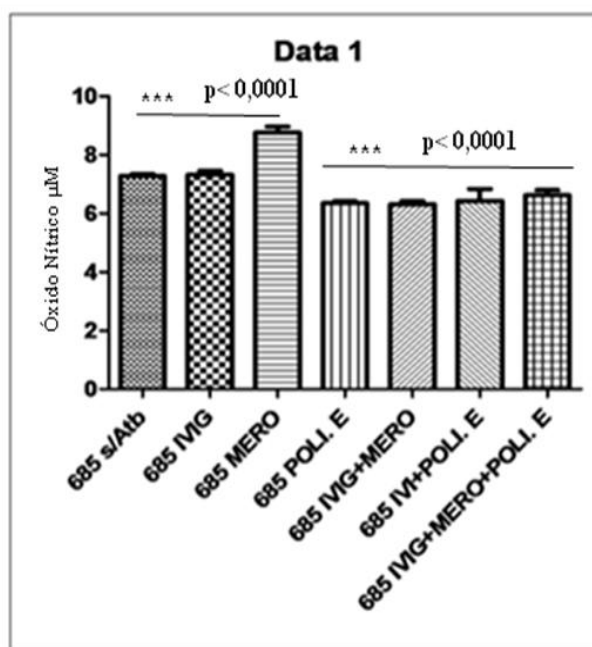


Figure 4. Nitric oxide production by human monocytes isolated challenged by 685 of *P. aeruginosa* in different test conditions.

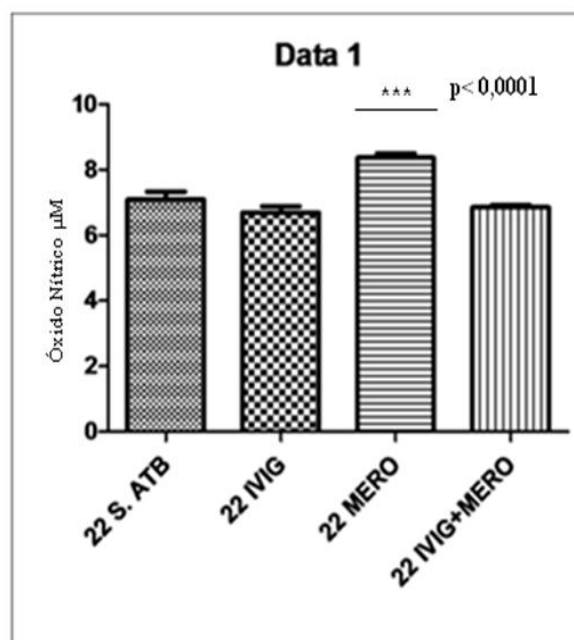


Figure 5. Nitric oxide production by human monocytes isolated challenged by *P. aeruginosa* in 22 different test conditions.

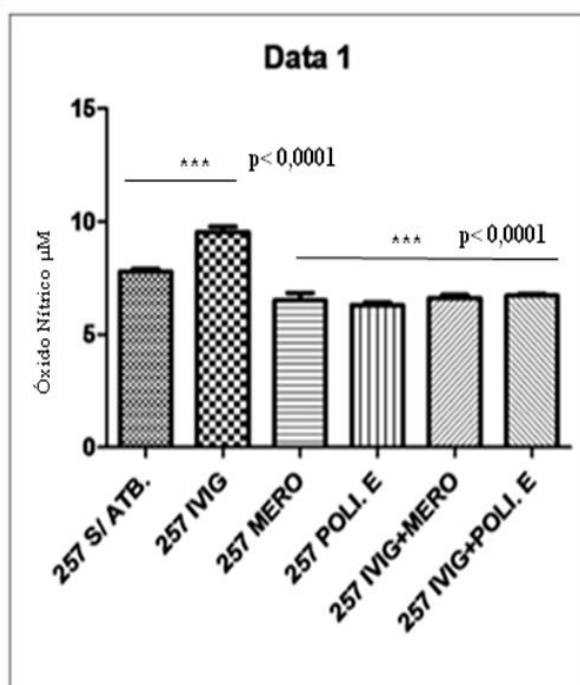


Figure 6. Nitric oxide production by human monocytes isolated challenged by 257 of *P. aeruginosa* in different test conditions.

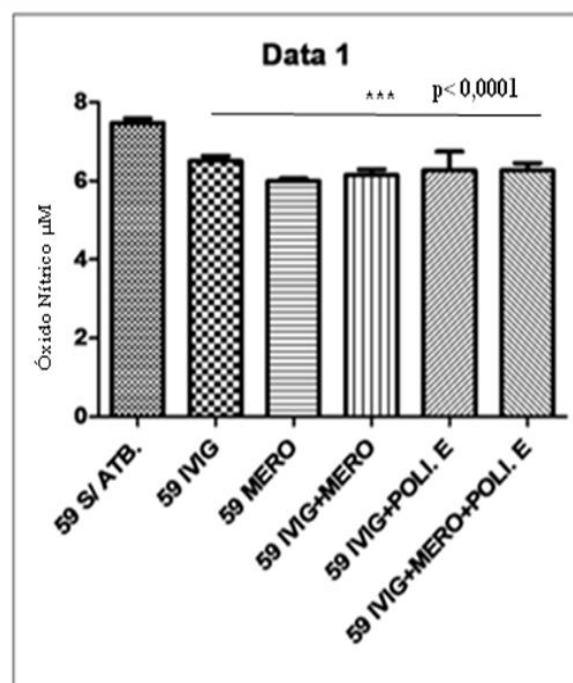


Figure 7. Nitric oxide production by human monocytes isolated challenged by *P. aeruginosa* in 59 different test conditions.

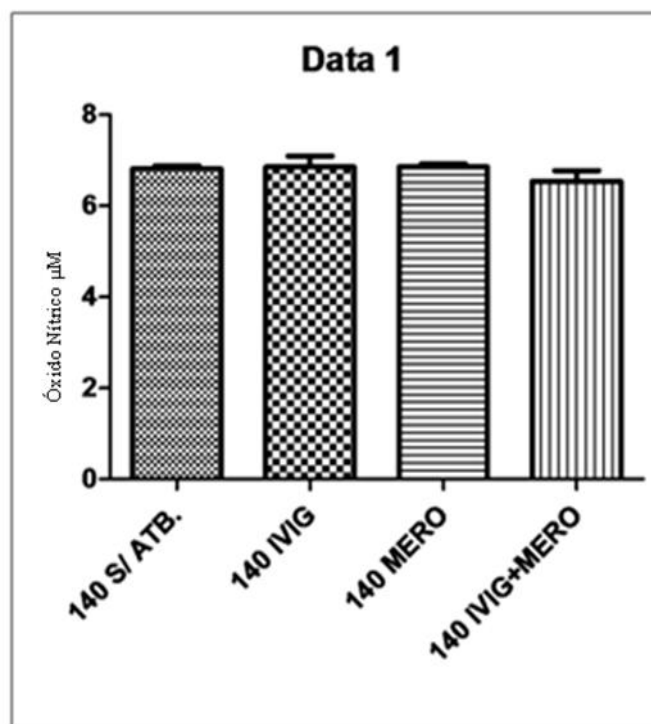


Figure 8. Nitric oxide production by human monocytes isolated challenged by 140 of *P. aeruginosa* in different test conditions.