

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

STEPHANIE TARGINO SILVA

ANÁLISE FENOTÍPICA E GENÉTICA DE FATORES VIRULÊNCIA DE ISOLADOS
CLÍNICOS DE *Pseudomonas aeruginosa* MULTIDROGA-SENSÍVEL E
MULTIDROGA-RESISTENTE DE RECIFE - PE

RECIFE/PE
2016

STEPHANIE TARGINO SILVA

ANÁLISE FENOTÍPICA E GENÉTICA DE FATORES VIRULÊNCIA DE ISOLADOS
CLÍNICOS DE *Pseudomonas aeruginosa* MULTIDROGA-SENSÍVEL E
MULTIDROGA-RESISTENTE DE RECIFE - PE

Dissertação apresentada ao programa de
Pós-Graduação em Medicina Tropical da
Universidade Federal de Pernambuco, como
parte dos requisitos para obtenção do título
de Mestre em Medicina Tropical.

ORIENTADORA: Prof^a Dr^a Maria Amélia
Vieira Maciel

CO-ORIENTADORA: Prof^a Dr^a Ana Catarina
Souza Lopes

RECIFE/PE
2016

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Gláucia Cândida - CRB4-1662

S586a Silva, Stephanie Targino.
Análise Fenotípica e genética de fatores de virulência de isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* multidroga-sensível e multidroga-resistente de Recife Pernambuco/Stephanie Targino Silva-2016.
69 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Maria Amélia Vieira Maciel.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical. Recife, 2016.
Inclui referências e apêndices.

1. *Pseudomonas aeruginosa*. 2. Virulência. 3. Resistência a Multiplos Medicamentos. I. Maciel, Maria Amélia Vieira (Orientadora). II. Título.

618.9883

CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2016-0153)



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO, NO DIA 29 DE FEVEREIRO DE 2016.

Aos 29 (vinte e nove) dias do mês de fevereiro de dois mil e dezesseis, às 9 horas, na Sala da Disciplina de Microbiologia – 2º. and. do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CCS/UFPE), em sessão pública, teve inicio a defesa da Dissertação intitulada “ANÁLISE FENOTÍPICA E GENÉTICA DOS FATORES DE VIRULÊNCIA DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *Pseudomonas aeruginosa* MULTIDROGA-SENSÍVEL E MULTIDROGA-RESISTENTE DE RECIFE-PE” da aluna Stephanie Targino Silva, na área de concentração Medicina Tropical, sob a orientação da Profa. Dra. Maria Amélia Vieira Maciel e coorientação pela Profa. Dra. Ana Catarina de Souza Lopes. A mestrandona cumpriu todos os demais requisitos regimentais para a obtenção do grau de MESTRA em Medicina Tropical. A Banca Examinadora foi indicada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical, na sua Reunião ordinária e homologada pela Diretoria de Pós-Graduação, através do Processo Nº 23076.008446/2016-70 em 17/02/2016, composta pelos Professores: Célia Maria Machado Barbosa de Castro (Presidente da Banca), do Departamento de Medicina Tropical da UFPE; Paulo Sérgio Ramos de Araújo, do Departamento de Medicina Tropical; Maria Betânia Melo de Oliveira, do Departamento de Bioquímica da UFPE. Após cumpridas as formalidades, a candidata foi convidada a discorrer sobre o conteúdo da Dissertação. Concluída a explanação, a candidata foi arguida pela Banca Examinadora que, em seguida, reuniu-se para deliberar e conceder à mesma a menção (Aprovada/Reprovada/Em exigência) APROVADA _____ da referida Dissertação. E, para constar, lavrei a presente Ata que vai por mim assinada, Secretário de Pós-Graduação, e pelos membros da Banca Examinadora.

Recife, 29/02/2016.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Prof. Dr. Paulo Sérgio Ramos de Araújo

Profa. Dra. Maria Betânia Melo Oliveira

STEPHANIE TARGINO SILVA

ANÁLISE FENOTÍPICA E GENÉTICA DE FATORES VIRULÊNCIA DE ISOLADOS
CLÍNICOS DE *Pseudomonas aeruginosa* MULTIDROGA-SENSÍVEL E
MULTIDROGA-RESISTENTE DE RECIFE - PE

Dissertação apresentada ao programa de
Pós-Graduação em Medicina Tropical da
Universidade Federal de Pernambuco, como
parte dos requisitos para obtenção do título
de Mestre em Medicina Tropical.

COMISSÃO EXAMINADORA

Aprovada em: 29/02/2016

Prof^a Dr^a Célia Maria Machado Barbosa De Castro
DEPTO. DE MEDICINA TROPICAL/CCS/UFPE

Prof^a Dr^a Maria Betania Melo De Oliveira
DEPTO. DE BIOQUÍMICA/CCS/UFPE

Prof^a Dr^o Paulo Sérgio Ramos De Araújo
DEPTO. DE MEDICINA TROPICAL/CCS/UFPE

Aos meus pais pelo amor, compreensão e
apoio incondicional;

Aos meus familiares e amigos que no
convívio tornaram suportáveis as horas
mais difíceis e mais felizes os momentos
de vitória.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar presente em minha vida, proporcionando-me saúde, força e sabedorias para enfrentar os desafios da vida.

À minha mãe, Fátima, e meu pai, Sérgio, pelo amor, carinho, dedicação e apoio, e por estar sempre presente, ajudando e incentivando na conquista dos meus objetivos.

À minha irmã, Caroline pela amizade e companhia essenciais durante essa jornada.

À minha família, por sua capacidade de me apoiar e acreditar em mim, significando segurança e certeza de que não estou sozinha nessa caminhada.

À minha orientadora, Professora Amélia Maciel, pela confiança, orientação, ensinamentos, ajuda, amizade e paciência que me dedicou durante todos esses anos.

À minha coorientadora, Professora Ana Catarina, por toda contribuição.

Aos meus amigos, que estiveram comigo durante todo o tempo me levantando nos momentos difíceis e tornando a vida mais divertida nos momentos de descontração.

Aos professores e funcionários do Departamento de Microbiologia e todos do Laboratório de microbiologia, onde cada um a sua maneira contribuiu para minha formação.

Ao CNPq pelo apoio ao projeto.

A todos àqueles que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste feito. O meu mais sincero e profundo obrigada!

RESUMO

Pseudomonas aeruginosa é um patógeno humano oportunista responsável por causar uma enorme variedade de infecções agudas e crônicas com níveis significativos de morbidade e mortalidade. A sua plasticidade genética e metabólica possibilitou o desenvolvimento de isolados multidroga-resistentes (MDR) e a capacidade de expressar de inúmeros fatores de virulência. Este trabalho teve como objetivo correlacionar o padrão de susceptibilidade antimicrobiana, a produção de fatores de virulência através de técnicas fenotípicas (protease alcalina, hemolisina, fosfolipase C, lipase e pigmentos) e genéticas (genes *aprA*, *lasA*, *lasB*, *plcH* e *toxA*) e a variabilidade genética de 30 isolados clínicos de *P. aeruginosa* isoladas de diferentes sítios de infecção, sendo 15 isolados multidroga-sensível (MDS) e 15 MDR. Nossos resultados revelaram que 50% dos isolados foram resistentes a ceftazidima, sendo as cefalosporinas a classe antimicrobiana com mais isolados resistentes, principalmente entre isolados MDR onde todos foram resistentes. Entre os isolados MDS, todos foram sensíveis a carbapenêmicos e quinolonas. A grande diversidade apresentada no perfil de susceptibilidade às classes de antimicrobianos sugere a existência de associação de diversos mecanismos de resistência. Entre os isolados 53% foram amostras de secreção traqueal, entre estes todos os isolados sensíveis a todos os antimicrobianos testados. Em relação aos fatores de virulência os isolados MDR apresentaram menor produção de piocianina e lipase, e menor detecção dos genes *toxA* e *lasA*, enquanto os MDS, apresentaram menor produção de hemolisina e fosfolipase C. Não houve diferença entre os grupos para produção de protease alcalina e o gene *aprA*. Todos isolados apresentaram produção de piocianina e os genes *lasB* e *plcH*. Em relação ao perfil genético, foi encontrada uma grande diversidade, em um total de 30 isolados foi possível observar 28 perfis genéticos. A presença dos clones ocorreu entre os isolados MDR. Embora alguns estudos relatam que o acréscimo de mecanismos de resistência leva a diminuição dos fatores de virulência, sugerindo assim que, as cepas de *P. aeruginosa* MDR têm a virulência diminuída quando comparada com cepas MDS, neste trabalho dos resultados obtidos não constatamos esta tendência para produção de protease alcalina, hemolisina, fosfolipase C e para a detecção do gene *aprA*, sugerindo que esta correlação seja multifatorial. Contudo, a ocorrência destes fatores de virulência em quase todos os isolados estudados sugere um elevado nível de patogenicidade dos mesmos. Concluímos portanto, que *P. aeruginosa* é um patógeno capaz de acumular inúmeros fatores de virulência e frequentemente associado à multirresistência, o que dificulta o tratamento de infecções causadas por esta bactéria.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*. Virulência. Resistência.

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic human pathogen responsible for causing a wide variety of acute and chronic infections with significant levels of morbidity and mortality. Its genetic and metabolic plasticity enabled the development of multidrug-resistant (MDR) strains and the ability to express countless virulence factors. This paper aimed to correlate the pattern of antimicrobial susceptibility, the production of virulence factors through phenotyping techniques (alkaline protease, hemolysin, phospholipase C, lipase and pigments) and genetic (gene *aprA*, *lasB*, *lasB*, *plcH* e *toxA*) and the genetic variability of 30 clinical isolates of *P. aeruginosa* isolated from different sites of infection, 15 isolates multidrug-sensitive (MDS) and 15 MDR. Our results showed reveal that 50% of the isolates were resistant to ceftazidime, cephalosporin was the antimicrobial class with more resistant isolates, especially isolates MDR that were totally resistant to them. Among the isolated MDS, all were sensitive to carbapenems and quinolones. The large diversity presented in the susceptibility profile to antimicrobial classes suggests the existence of an association of several resistance mechanisms. Among the isolated 53% came from tracheal secretions, among them all isolates susceptible to all antimicrobials tested. Regarding virulence factors MDR isolates presented lower production pyocyanin and lipase, and lower detection *toxA* e *lasA* genes, since the MDS, showed lower production of hemolysin and phospholipase C. There was no difference between groups for the production of alkaline protease and *aprA* gene. All isolates presented pyocyanin production and *lasB* and *plcH* genes. In relation to genetic profile, it was verified a large diversity, in a totality of 30 isolates was observed 28 genetic profiles. The presence of clones occurred among the MDR isolates. Even though some studies to report that the increase of resistance mechanisms leads to the reduction of virulence factors, suggesting that the strains of *P. aeruginosa* MDR have decreased virulence strains compared with MDS, this work the results obtained we have not found this tendency to alkaline protease production, hemolysin, phospholipase C and for detecting *aprA* gene, suggesting that this correlation is multifactorial. However, the occurrence of these virulence factor in almost all isolates studied suggests a high level of pathogenicity the same. Therefore, it can be concluded that, *P. aeruginosa* is a pathogen with ability to accumulate several virulence factors and often associated to multiresistant complicating the treatment of infections caused by this bacterium.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*. Virulence. Resistance.

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
AMI	Amicacina
Apr	Protease alcalina
ATM	Azitromicina
BHI	Infusão de cérebro e coração
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CAZ	Ceftazidima
CIP	Ciprofloxacina
CPM	Cefepime
CRO	Ceftriaxona
CTX	Cefotaxima
EARS	Europe antimicrobial resistance surveillance
ESBL	β -lactamases de espectro estendido
ERIC-PCR	<i>Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-bases PCR</i>
GEM	Gentamicina
HAM	Hospital Agamenon Magalhães
HC	Hospital das Clínicas
IL-I	Interleucina I
INICC	<i>International Nosocomial Infection Control Consortium</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
M β L	Metalo-beta-lactamase
MDR	Multidroga-resistente
MDS	Multidroga-sensível
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
NOR	Norfloxacina
PBPs	Proteínas ligadoras de penicilina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDR	Panresistente
QS	<i>Quorum sensing</i>
SCOPE	<i>Surveillance Control of Pathogens of Epidemiological Importance</i>
TAC	Ticlarclicina + ácido clavulâmico
FNT	Fator de necrose tumoral
TSA	<i>Trypticase soy ágar</i>
UTI	Unidade de terapia intensiva
Vol	Volume
XDR	Extensivamente resistente

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

DA DISSERTAÇÃO:

Tabela 1.	Sequência de nucleotídeos dos genes de virulência	28
-----------	---	----

DO ARTIGO:

Figura 1.	Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de Isolados clínicos de <i>P. aeruginosa</i>	33
Figura 2.	Perfil de resistência às classes de antimicrobianos entre isolados MDS e MDR de <i>P. aeruginosa</i>	33
Tabela 1	Frequência de isolados resistentes conforme o número de classes de antimicrobianos testados	34
Figura 3.	Distribuição das amostras nosocomiais por <i>P. aeruginosa</i>	35
Figura 4:	Frequência dos fenótipos de virulência de isolados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> de acordo com o padrão de resistência MDS e MDR	35
Figura 5:	Frequência dos genes de virulência de isolados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> de acordo com o padrão de resistência MDS e MDR	36
Figura 6:	Dendrograma de similaridade genética entre todos os isolados de <i>P. aeruginosa</i> estimado pela técnica de ERIC-PCR	37
Figura 7:	Dendrograma de similaridade genética entre os isolados MDS de <i>P. aeruginosa</i> estimado pela técnica de ERIC-PCR	38
Figura 8:	Dendrograma de similaridade genética entre os isolados MDR de <i>P. aeruginosa</i> estimado pela técnica de ERIC-PCR	38

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1	<i>Pseudomonas aeruginosa.....</i>	14
2.2	INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA À SAÚDE POR <i>P. aeruginosa.....</i>	15
2.3	FATORES DE VIRULÊNCIA.....	16
2.3.1	Flagelo e Pili.....	17
2.3.2	Lipopolissacarídeo.....	17
2.3.3	Alginato.....	18
2.3.4	Lectinas.....	18
2.3.5	Toxinas.....	18
2.3.6	Proteases.....	19
2.3.7	Hemolisinas.....	19
2.3.8	Ramnolipídeos.....	20
2.3.9	Lipases.....	20
2.3.10	Pigmentos.....	20
2.3.11	Quorum sensing.....	21
2.4	MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS.....	21
3	OBJETIVOS.....	24
3.1	OBJETIVO GERAL.....	24
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
4	METODOLOGIA.....	25
4.1	DESENHO DO ESTUDO.....	25
4.2	OS ISOLADOS BACTERIANOS.....	25
4.3	ANÁLISES FENOTÍPICAS.....	25
4.3.1	Padrão de resistência.....	25
4.3.2	Produção de pigmentos.....	26
4.3.3	Produção de hemolisina.....	26
4.3.4	Produção de protease.....	26
4.3.5	Produção de fosfolipase C.....	26
4.3.6	Produção de lipase.....	26
4.4	ANÁLISES GENÉTICAS.....	27
4.4.1	Extração de DNA.....	27
4.4.2	Pesquisa da relação clonal.....	27
4.4.3	Detecção dos genes de virulência.....	27
5	RESULTADOS.....	29
5.1	Análise fenotípica e genética de fatores de virulência de isolados clínicos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> multidroga-sensível e multidrogra- resistente de Recife-PE, Brasil.....	29
6	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	45
	REFERENCIAS.....	46
	APÊNDICE.....	53

1 INTRODUÇÃO

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria gram-negativa presente em vários nichos ambientais e capaz de colonizar e infectar diversos organismos (KUNG et al., 2010; BALASUBRAMANIAN et al., 2013). É o micro-organismo oportunista humano mais frequentemente isolado de infecções nosocomiais, sendo citado em uma variedade de infecções agudas e crônicas principalmente em pacientes imunocomprometidos, com queimaduras severas, câncer e AIDS. É o micro-organismo mais mencionado em infecções respiratórias agudas em pacientes submetidos à ventilação mecânica e em infecções respiratórias crônicas em pacientes com fibrose cística, onde causa um nível significativo de morbidade e mortalidade (KIPNIS; SAWA; WIENER-KRONISH, 2006; TRABULSI; LINCOPAN, 2008; BALASUBRAMANIAN et al., 2013).

Nos últimos anos as infecções hospitalares causadas por *P. aeruginosa* têm sido um dos principais desafios para a terapêutica antimicrobiana, visto que comumente estes têm apresentado um amplo espectro de resistência a diferentes classes de agentes antimicrobianos, devido a sua resistência intrínseca e através da aquisição de diversos mecanismos distintos de resistência (FUENTEFRIA et al., 2008; TODAR, 2012).

De acordo com o estudo realizado pelo *International Nosocomial Infection Control Consortium* (INICC), em 36 países da América Latina, Ásia, África e Europa, 47,2% das *P. aeruginosa* isoladas foram resistentes ao imipenem (ROSENTHAL et al., 2012). No Brasil o SCOPE (Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiological Importance) revelou que entre os isolados de *P. aeruginosa* 35,8% eram resistentes a meropenem, 36,8% a imipenem e 36,6% a ceftazidima (MARRA et al., 2011).

A combinação dos mecanismos de resistências originou isolados multidrogaresistentes (MDR) (MAGIORAKOS et al., 2012), que somado a falta de perspectivas para a introdução de novos fármacos que poderiam ser usados contra esse patógeno, propiciou a necessidade de investigações sobre sua fisiologia, principalmente no que se refere a sua versatilidade na produção de fatores de virulência que contribuem para definir o potencial de patogenicidade do processo infeccioso (LANDMAN et al., 2002).

P. aeruginosa produz diversos fatores de virulência, e estes podem contribuir na patogênese do processo infeccioso dependendo do sítio e tipo de infecção (TODAR, 2012). Entre os fatores de virulência com funções de adesinas, destacam-se flagelos, fímbrias e o alginato (KIPNIS; SAWA; WIENER-KRONISH, 2006), nos fatores que promovem o rompimento celular e interferem no sistema imunológico incluem-se elastase, protease alcalina, fosfolipase C. Durante a patogênese envolvem-se ainda exoproductos como a exotoxina A e os pigmentos como piocianina e pioverdina (JAFFAR-BANDJEE et al., 1995)..

Alguns estudos têm demonstrado um alto percentual de fatores de virulência em isolados de *P. aeruginosa*. No estudo realizado na China (WANG et al., 2013) cerca de 80% dos isolados estudados apresentavam produção de elastase, piocianina e protease alcalina; no Brasil Jácome et al (2012) encontraram resultados semelhantes (34.4% colônias mucosas; 70.5% produtores de piocianina; 93.4% produtores de gelatinase; 72.1% produtores de hemolisina), em relação ao padrão de resistência esses isolados apresentaram 54.1% MDR. Contudo, trabalhos que

correlacionem a presença dos fatores de virulência com o perfil de resistência aos antimicrobianos de *P. aeruginosa*s ainda são raros.

Em um estudo realizado na Polônia por Deptuła e Gospodarek (2009) cepas MDR apresentavam menor atividade de lipase, elastase, fosfolipase C e quantidade piocianina quando comparado com cepas multidroga-sensíveis (MDS), não foram observadas diferenças entre a atividade da protease alcalina. Levando a crer que as cepas de *P. aeruginosa* MDR têm a virulência diminuída quando comparada com cepas MDS. Contudo, o presente estudo limitou-se à pesquisa fenotípica desses fatores de virulência, não sendo pesquisados os genes responsáveis pela expressão dos mesmos, e a descrição da relação clonal dos isolados não foi abordada com maior atenção. É importante ressaltar também que o estudo citado foi realizado com isolados oriundos de um único hospital da Polônia, consideração à diversidade dos perfis de *P. aeruginosa* encontradas em diferentes regiões, faz-se necessário estudos locais.

No Brasil, o estudo comparativo de Prado (2009) analisou a presença de fatores de virulência diante de isolados de *P. aeruginosa* com perfis específicos relacionados à metalo-beta-lactamase (MβL). Fenotipicamente, para isolados MβL SPM-1, isolados não produtores de MβL intermediários ou resistentes ao imipenem e isolados não produtores de MβL sensíveis ao imipenem, houve uma alta detecção de protease alcalina, fosfolipase C, piocianina, pioverdina e hemolisinas, com baixa frequência de elastase. Geneticamente todos os perfis analisados apresentaram cerca de 95-100% da presença dos genes de virulência *aprA*, *plcH*, *plcN*, *lasA*, *lasB* e *toxA*. Neste trabalho não foi demonstrado diferenças entre os grupos no que se refere aos fatores de virulência, com exceção para a produção de hemolisina. Além disso, o trabalho correlaciona perfis de *P. aeruginosa* específicos, e segundo Jacome et al. (2012) para Pernambuco o perfil MβL representa apenas 44,8%.

No trabalho de Silva et al. (2014) algumas associações foram demonstradas entre a susceptibilidade e/ou produção virulência com o sítio de infecção. Onde quase todos os isolados de urina eram MDR (85,71%) e apresentavam concentrações mais elevadas de piocianina, 95% dos isolados do reto e 66,57% da boca (66,67%) foram MDS, e este último grupo apresentou uma grande produção de biofilme.

Tendo em vista a falta de trabalhos que estabeleçam a relação entre fatores de virulência e o padrão de resistência, e que em pesquisa recente Beceiro et al. (2013) relatara que a relação entre virulência e resistência em isolados clínicos poderá ser uma nova abordagem para o problema das resistências aos antibióticos causadas por micro-organismos multirresistentes. Este estudo visa descrever a correlação entre a presença dos fatores de virulência através de testes fenotípicos (protease alcalina, lipase, fosflipase C, hemolisina e pigmentos) e genéticos (genes *aprA*, *lasA*, *lasB*, *plcH* e *toxA*) e o padrão de resistência aos antibióticos (MDS e MDR), além de abordar a relação genética e os sítios de infecção, entre isolados clínicos de *P. aeruginosa*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Pseudomonas aeruginosa pertence ao gênero *Pseudomonas*, da família Pseudomonadaceae, ordem Pseudomonadales, classe Gammaproteobacteria, do filo Proteobacteria, do Domínio Bacteria. A família Pseudomonaceae é formada por um grupo de bacilos gram-negativos não fermentadores, patógenos oportunistas de plantas, animais e seres humanos. O gênero *Pseudomonas* é o mais abundante e o mais significativo grupo de bactérias do nosso planeta, visto que seus membros podem ser encontrados em grande número na maioria dos principais ecossistemas naturais, terrestres e aquáticos e, também, em íntima associação com algumas plantas e animais (SPIERS; BUCKLING; RAINY, 2000). *P. aeruginosa* representa em média 75% dos isolados de amostras clínicas, sendo considerada a espécie mais importante do gênero, tanto pela frequência em infecções diversas quanto pelos seus fatores de virulência (TRABULSI, LINCOPAN, 2008).

É um micro-organismo de natureza ubiquitária sendo encontrada no solo, água, vegetais e animais, com predileção por ambientes úmidos, estão presentes nos mais variados ambientes hospitalares (FRANCO et al., 2010; WU et al., 2011). Sua ampla distribuição deve-se a pouca exigência para o crescimento e grande versatilidade metabólica em utilizar uma ampla variedade de substratos orgânicos como fonte de carbono (TODAR, 2012).

Quanto a sua morfologia, *P. aeruginosa* apresenta-se como bastonete gram-negativo não fermentador, reto ou ligeiramente curvo, tipicamente dispostos em pares, de 0,5 – 0,7 µm de espessura por 1,5 – 3,0 µm de comprimento, não formador de esporos e apresenta mobilidade através de flagelo polar monotríquio, podendo também apresentar mobilidade em superfícies sólidas (*twitching*), devido a ação de *pili* presentes na superfície de sua parede celular. Fisiologicamente caracteriza-se pela respiração aeróbia (ainda que possa desenvolver-se em ambientes anaeróbios na presença de nitrato como acceptor final de elétrons), produção de indofenol oxidase (citocromo C oxidase) e arginina dehidrolase (TRABULSI; LINCOPAN, 2008).

As culturas de *P. aeruginosa*s podem produzir colônias com diversos morfotipos, apresentando dois tipos principais de colônias em meios de cultura sólidos: colônias grandes, com margens lisas e centro elevado (tipo “ovo estrelado”) e colônias pequenas, rugosas e convexas. Os isolados clínicos apresentam-se habitualmente como colônias do primeiro tipo e os isolados ambientais, colônias do segundo tipo. Um terceiro tipo de colônias, mucosas, é ainda observado em isolados de secreções respiratórias e urinárias. Frequentemente possuem brilho metálico, com ou sem o odor frutal característico, decorrente da produção de trimetilamina. Não consegue crescer em condições acídicas (inferiores a pH 4,5) e possui um crescimento ótimo em 37°C e a capacidade de crescer a 42°C, o que a distingue de todas as outras espécies do seu gênero. Em termos nutricionais, consegue crescer em meio mínimo, utilizando apenas um único composto orgânico como fonte de carbono e energia, mas também em meios enriquecidos, conseguindo utilizar uma enorme diversidade de fontes de carbono (TODAR, 2012; MURRAY et al., 2010).

A maioria das cepas produz pigmentos hidrossolúveis que se difundem no meio, como piocianina (cor azul) e a pioverdina (cor esverdeada e fluorescência sob luz ultravioleta), que estão também envolvidos na sua patogenicidade, e alguns

isolados podem em menor frequência produzir outros pigmentos como piorrubina (cor vermelha) e piomelanina (cor marrom) (SADER; SILBERT, 2000). Também produzem catalase e várias enzimas extracelulares como lipases, esterases e proteases (TODAR, 2012; MURRAY et al., 2010).

A sua identificação laboratorial é realizada pela avaliação macroscópica dos aspectos das colônias e sua produção de odor e pigmentos característicos, além da análise microscópica por coloração de Gram, e os resultados de testes bioquímicos como ausência de fermentação de açúcares, oxidação de glicose, uso de citrato como fonte única de carbono, lisina descarboxilase negativa e incapacidade de uso do triptofano (indol negativo) (WINN et al., 2008)

Stover et al., 2000 e outros autores (TODAR, 2012; MURRAY et al., 2010), apoiam que o tamanho e a complexidade do genoma de *P. aeruginosa*, um dos maiores genomas bacterianos já sequenciados, refletem uma adaptação evolucionária, permitindo sua tolerância a uma grande variedade de condições ambientais e sua relativa resistência a agentes antimicrobianos que colaboraram no seu eficaz papel como patógeno oportunista e causador de infecções nosocomiais.

2.2 INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA À SAÚDE POR *P. aeruginosa*

Nas ultimas décadas *P. aeruginosa* tem sido cada vez mais relacionada a espectros cada vez mais amplos de infecções humanas (KERR; SNELLING, 2009). As manifestações mais graves ocorrem em ambientes hospitalares, como por exemplo: bacteremias, pneumonias, úlceras de pressão e infecções pós-operatórias, urinárias e gastrointestinais, endocardites, osteomielites e meningites (KERR; SNELLING, 2009; MENA; GERBA, 2009).

Indivíduos neutropênicos, imunodeficientes, queimados e os que apresentam desarranjos metabólicos, são mais susceptíveis ao risco de infecção, visto que a defesa imunológica deficiente, como em situações causadas por incisões cirúrgicas, inserção de cateteres ou tubos endotraqueais, aumenta a predisposição para uma infecção por *P. aeruginosa* (KERR; SNELLING, 2009; STRATEVA; MITOV, 2011). Doenças pulmonares como a fibrose cística, doença pulmonar obstrutiva crônica e bronquiectasias também se apresentam como fatores de predisposição para o desenvolvimento de infecções pulmonares por esta bactéria (BALASUBRAMANIAN et al., 2013). Indivíduos com AIDS estão em grupo de risco, podendo contrair pneumonias e bacteremias por *P. aeruginosa* (KANJ; SEXTON, 2015). *P. aeruginosa* é a principal causa de infecções em pacientes queimados, e nesses casos apresenta níveis constantes de mortalidade por bacteremias ao longo dos anos (MENA; GERBA, 2009).

P. aeruginosa é a principal causa de falhas respiratórias e de morte da maioria dos portadores de fibrose cística, podendo ser isolada da expectoração de cerca de 80% dos adultos com fibrose cística (STRATEVA; MITOV, 2011; FOLKENSSON et al., 2012). É ainda, a bactéria gram-negativa multirresistente que mais gera pneumonias em doentes hospitalizados com suporte ventilatório (FRICKS-LIMA et al., 2011) e nas crianças hospitalizadas em UTI (LISTER; WOLTER; HANSON, 2009). As infecções causadas por *P. aeruginosa* em unidades de cuidados intensivos representam 21% das pneumonias, 13% das infecções oculares e otorrinolaringológicas, 10% das infecções urinárias e 3% das septicemias ocorridas nas UCI dos Estados Unidos da América (EUA). Nas UCI europeias, é

considerado o segundo patogênico mais frequente, responsável por 30% das pneumonias, 19% das infecções urinárias e 10% das septicemias (LISTER et al., 2009).

A importância de *P. aeruginosa* como causa de morbidade e mortalidade associada a pneumonias em pacientes em ventilação mecânica e infecções nosocomiais, de modo geral, continuam elevadas, apesar do aumento na implantação das diversas políticas de controle de infecções nos hospitais. São frequentes as descrições de surtos de infecções nosocomiais causadas por esta bactéria, sendo habitualmente associados à incorreta utilização dos equipamentos médicos e a contaminações cruzadas, muitas vezes com origem nos reservatórios ambientais dos hospitais, sobretudo em torneiras e lavatórios (IVERSEN et al., 2007; LANINI et al., 2011). A multirresistência a antibióticos, característica desta bactéria (BERT et al., 1998; BREATHNACH et al., 2012), é outro fator associado ao sucesso na proliferação deste patogênico em ambiente hospitalar (HOTA et al., 2009).

2.3 FATORES DE VIRULÊNCIA

A capacidade de *P. aeruginosa* causar diversos tipos de infecções em diferentes grupos de indivíduos resulta da combinação da sua versatilidade metabólica com a resistência a antibióticos, seja ela intrínseca e/ou adquirida, com a capacidade de se adaptar à presença destes fármacos, aliada ainda à possibilidade de produzir diferentes fatores de virulência (BALASUBRAMANIAN et al., 2013).

O desenvolvimento de infecções causadas por *P. aeruginosa* inicia-se com a alteração ou neutralização das defesas naturais do hospedeiro. Este processo é multifatorial e causado por uma variedade de fatores de virulência que se desenvolvem ao longo das três fases da infecção: aderência e colonização, invasão local e disseminação sistêmica (TODAR, 2012; STRATEVA; MITOV, 2011).

Muitos dos fatores de virulência e algumas características fenotípicas que favorecem a virulência, além da formação de biofilmes, são regulados por *quorum sensing* (QS), um mecanismo de reconhecimento da densidade celular bacteriana, onde uma bactéria individual produz pequenas moléculas difusíveis que podem ser detectadas por outros micro-organismos. Este mecanismo de comunicação permite que as bactérias atuem em conjunto na regulação coordenada da expressão gênica. Esta expressão regulada dos genes de virulência oferece à bactéria uma vantagem seletiva sobre as defesas do hospedeiro sendo importante para a ação patogênica do micro-organismo (KÖHLER et al., 2010; STRATEVA; MITOV, 2011).

São vários os fatores de virulência, podendo ser divididos em diversos tipos, de acordo com o seu papel no processo de infecção: as exotoxinas causam danos às células do hospedeiro; as modulinas desencadeiam respostas inflamatórias; algumas enzimas destroem os tecidos proporcionando nutrientes a bactéria ou atenuam as respostas imunológicas; as adesinas e estruturas de mobilidade, possuem importância na fixação às células do hospedeiro; as cápsulas, proporcionam proteção contra as defesas do hospedeiro e em alguns casos contribuem na aderência; produção de determinantes de evasão ao sistema do complemento; produção de pigmentos; a capacidade de formar biofilmes auxilia a bactéria a isolar-se dos mecanismos de defesa do hospedeiro e dos antibióticos; os

mecanismos de regulação do crescimento bacteriano atuam sobre a densidade bacteriana e de alterações das condições no meio envolvente; os sistemas secretórios permitem à bactéria excretar para o meio ou para o interior das células do hospedeiro, substâncias associadas à virulência; produz sideróforos para aquisição de ferro; a variação antigênica, que confunde as respostas imunológicas do hospedeiro; e, a termotolerância, que permitiu a infecção de hospedeiros homeotérmicos (CASADEVALL; PIROFSKI, 2009).

2.3.1 Flagelo e *Pili*

O flagelo é responsável pela mobilidade da célula bacteriana e os *pili* permitem a aderência da bactéria às células epiteliais do hospedeiro, através de ligações em receptores específicos (STRATEVA; MITOV, 2011). Contudo, estes apêndices de superfície possuem um grande potencial imunogênico, funcionando como ligantes para as células fagocíticas do hospedeiro e estimulando o recrutamento de neutrófilos. Assim, após a colonização inicial, ocorre a diminuição da expressão da formação de flagelos e *pili* para reduzir a imunogenicidade da bactéria, voltando a ser expresso simultaneamente a expressão dos genes correlacionados à produção de biofilmes (SADIKOT et al., 2005).

2.3.2 Lipopolissacarídeo

O lipopolissacarídeo (LPS) está presente em todas as bactérias gram-negativas, é um constituinte da membrana externa da parede celular, que contribui para a integridade estrutural da bactéria. É composto por um domínio hidrofóbico (lipídeo A), ligado à bicamada fosfolipídica da membrana externa, o polissacarídeo O, que se prolonga para fora da membrana, e um oligossacarídeo central, que se liga ao lipídeo A e ao polissacarídeo O. O LPS parece estar envolvido na disseminação sistêmica de *P. aeruginosa* e também na aderência aos tecidos do hospedeiro (IVANOV et al., 2011).

O lipídeo A e o polissacarídeo O variam de acordo com as cepas e são bastante imunogênicos, desencadeando processos inflamatórios no hospedeiro por meio da liberação de mediadores vasodilatadores (IL-1, FNT), que ativam o complemento, podendo até levar à síndrome do choque séptico (KANJ; SEXTON, 2015). Em infecções crônicas, *P. aeruginosa* seleciona mutantes com modificações específicas no lipídeo A, com menor capacidade imunogênica para evadir mais facilmente dos peptídeos antimicrobianos produzidos pelo sistema imunitário do hospedeiro e aumentar sua sobrevivência (KIPNIS; SAWA; WIENER-KRONISH, 2006). Devido a grande diversidade de imunotipos, de acordo com o LPS é possível também caracterizar o sorogrupo da bactéria em estudo (WINN et al., 2008).

Mesmo não sendo considerado como um fator de virulência por alguns autores, por estar sempre presente na célula bacteriana, a participação do LPS no processo de patogenicidade de *P. aeruginosa* se destaca, podendo por vezes sofrer adaptações em função do tipo de infecção que a bactéria está para desenvolver (SILVA, 2014).

2.3.3 Alginato

O alginato é um exopolissacarídeo capsular mucoso constituído por repetições de polímeros de ácido manurônico e ácido glucurônico. Encontra-se na matriz dos biofilmes e contribui para a lesão tecidual do hospedeiro além de atenuar a resposta imunitária promovendo uma resistência parcial a mecanismos de defesa do sistema imune inibindo a ligação de anticorpos, a fagocitose e a morte intracelular em leucócitos (KANJ; SEXTON, 2015).

A produção de alginato promove uma maior facilidade na aderência da *P. aeruginosa* à superfície epitelial pulmonar, onde cerca de 85% dos isolados de *P. aeruginosa* obtidos de pacientes com fibrose cística apresentam uma morfologia mucosa, devido à produção excessiva de alginato, enquanto apenas menos de 1% dos isolados obtidos de outros locais apresentam este fenótipo, demonstrando sua importância para a colonização e sobrevivência no ambiente pulmonar associado a um mau prognóstico para estes pacientes, visto que essa alta produção de alginato também protege a bactéria da ação antibiótica e é importante para a arquitetura e desenvolvimento dos biofilmes (KIPNIS; SAWA; WIENER-KRONISH, 2006).

2.3.4 Lectinas

P. aeruginosa produz duas lectinas, que são proteínas sem papel imunológico que se ligam a etítopos glicídicos. A *lecA* se liga à galactose e atua como adesina, participando na invasão e colonização inicial, e também como citotoxinas do epitélio pulmonar, inibindo o batimento ciliar das células epiteliais além de promover aderência da *P. aeruginosa* ao epitélio intestinal ocasionando uma quebra na barreira intestinal, levando a uma maior absorção de toxina A (codificada pelo gene *toxA*) (STRATEVA; MITOV, 2011; FUNKEN et al., 2012). A *LecB*, que se liga a fucose, também participa do processo de aderência e está associada à produção de biofilmes (FUNKEN et al., 2012).

2.3.5 Toxinas

A exotoxina S é uma enzima codificada pelo gene *exoS*, localizada na região perinuclear, é processada a um fragmento solúvel apresentando dois domínios ativos, caracterizando-se como uma citotoxina bifuncional com um domínio com atividade ADP-ribosiltransferase, a qual está atribuído a função patogênica, por gerar uma ruptura na organização do citoesqueleto, e outro agindo como proteína ativadora de RhoGTPase (GAP) (KIPNIS; SAWA; WIENER-KRONISH, 2006; PEDERSON et al., 2000). Mutantes deficientes em *exoS* foram testados em modelo animal de infecções em queimaduras e a virulência apresentada foi ao menos 2000 vezes menor do que da cepa selvagem (NICAS; IGLEWSKI, 1984).

A toxina A é codificada pelo gene *toxA*, pertence ao grupo das exotoxinas bacterianas, onde se incluem a toxina diftérica e a toxina da cólera. Estas, apesar de terem receptores diferentes, catalisam a mesma reação enzimática e partilham uma configuração estrutural comum (JØRGENSEN et al., 2008). A *toxA*, é uma proteína termolábil, ADP-ribosil-transferase, que entra nas células eucarióticas por endocitose, mediada por receptores específicos e, no interior da célula, inibe a síntese proteica por ribosilação do fator de elongamento-2, acarretando a inibição da síntese proteica, levando a morte celular (KIPNIS; SAWA; WIENER-KRONISH,

2006; JØRGENSEN et al., 2008). *ToxA* é muito tóxica e está envolvida na mediação da infecção local e sistêmica, favorecendo o processo de colonização e a invasão por necrotização tecidual além de estar possivelmente associada a processos de imunossupressão (STRATEVA; MITOV, 2011).

2.3.6 Proteases

As enzimas proteolíticas de *P. aeruginosa* são classificadas em proteases neutras (elastases) e proteases alcalinas (apr). Possuem um papel importante no processo de infecção, pois contribuem para a quebra das defesas físicas do hospedeiro e a proliferação bacteriana, fornecendo aminoácidos e peptídeos das proteínas teciduais para as bactérias além de interferirem no mecanismo de defesa imunológico ao degradar imunoglobulinas e outros componentes (STRATEVA; MITOV, 2011).

As elastases são capazes de degradar a elastina, um dos principais componentes dos tecidos, que, além de ser um constituinte importante dos vasos sanguíneos, compõe cerca de 28% do tecido pulmonar e é responsável pela sua expansão e contração (PETERMANN; DOETKOTT; RUST , 2001). A atividade elastolítica de *P. aeruginosa* se dá pela ação combinada das enzimas *LasA* e *LasB*, que são codificadas pelos genes com os mesmos nomes. *LasA* é uma imunoprotease com um centro serina e que opera em sinergia com *apr* e *lasB* na degradação da elastina, quebrando as suas ligações glicina-glicina, tornando-a mais sensível à ação da *apr* ou *lasB* (STRATEVA; MITOV, 2011). *LasB* é uma metaloprotease de zinco que, destrói componentes teciduais do hospedeiro e interfere nos mecanismos de defesa, já que além da elastina degrada a fibrina, a fibronectina, a laminina, o colágeno, a caseína, inativa as imunoglobulinas humanas G e A, a lisozima, a transferrina, a mucina gástrica, o interferon-g e alguns componentes do sistema do complemento e inibidores de proteases presentes nos nossos pulmões (BRADBURY et al., 2010; STRATEVA; MITOV, 2011)

A *Apr* (codificada pelo gene *aprA*) está envolvida na destruição da fibrina, fibrinogénio, laminina, elastina, colágeno, C1q e C3 do sistema do complemento, inibidores de proteases e interferon-g (BRADBURY et al., 2010), afetando os mecanismos de defesa do hospedeiro. Está muito associada a infecções da córnea, podendo também participar na patogênese de infecções pulmonares agudas (KIPNIS; SAWA; WIENER-KRONISH, 2006). Em conjunto, sobretudo com a *LasB*, encontra-se também presente nos isolados recolhidos de secreções pulmonares de doentes com fibrose cística, correlacionando-se elevados teores de *Apr* e *LasB* com uma condição clínica debilitada destes doentes (OLDAK; TRAFNY, 2005).

2.3.7 Hemolisinas

P. aeruginosa produz duas hemolisinas importantes: a fosfolipase C hemolítica (codificada pelo gene *pCH*) e a lectinase. Estas atuam em sinergia na degradação de lipídios e da lecitina, gerando efeitos citotóxicos nas células do hospedeiro (SADIKOT et al., 2005). A fosfolipase C hidrolisa preferencialmente lipídios que contêm grupos de amônio quaternário, encontrados nas membranas eucarióticas e inativando o surfactante pulmonar, que pode ser responsável pelas atelectasias associadas às infecções pulmonares crônicas e agudas por *P. aeruginosa* (KIPNIS; SAWA; WIENER-KRONISH, 2006). Essa espécie produz ainda

uma fosfolipase C não hemolítica, que é 40% idêntica à hemolítica e também hidrolisa a fosfatidilcolina, mas usando um substrato diferente (STRATEVA E MITOV, 2011; TODAR, 2012).

2.3.8 Ramnolipídeos

Os ramnolípidos são constituídos por glicolípidos com ramnose, possuem ação de biossurfactante, possuindo uma estrutura semelhante à dos detergentes. Atuam solubilizando os fosfolípidos do surfactante pulmonar, tornando-o acessível à ação da fosfolipase C hemolítica, podendo levar à atelectasia observada nas infecções pulmonares (STRATEVA; MITOV, 2011). Os ramnolípidos também inibem o transporte muco-ciliar e o batimento ciliar do epitélio pulmonar (READ et al., 1992) e estão envolvidos nos processos de movimento natatório por “swarming” e na formação de biofilmes (CAIAZZA et al., 2005).

2.3.9 Lipases

As lipases, parecem estar envolvidas na sinalização lipídica, influenciando fenótipos com relevância virulenta em *P. aeruginosa*, sobretudo *LipA* e *LipC*. A primeira está associada à diminuição da produção de pioverdina em meios com privação de ferro e *LipC* parece afetar a mobilidade, a formação de biofilmes e a produção de ramnolípidos (FUNKEN et al., 2011). Apresentam um sinergismo com as fosfolipases, uma vez que a secreção simultânea resulta em efeitos patológicos que não se poderiam explicar pela ação individual de cada uma delas (KÖNIG et al., 1996).

2.3.10 Pigmentos

A piocianina (1-hidroxi-5- metil-fenazina) é um pigmento azul que pertence ao grande grupo dos compostos tricíclicos designados fenazinas e possui atividade bactericida contra ampla variedade de micro-organismos (HASSETT et al., 1992). Estudos *in vitro* demonstraram que a piocianina compromete um grande número de atividades celulares de mamíferos, incluindo a respiração celular, o batimento ciliar, o crescimento das células da epiderme, a homeostase do cálcio, a libertação de prostaciclina no epitélio pulmonar, a libertação de interleucina-2, limitando também o crescimento dos linfócitos-T e a secreção de imunoglobulinas pelos linfócitos-B. Este pigmento promove ainda a apoptose de neutrófilos e desequilibra a atividade antiproteolítica das células das vias respiratórias dos pacientes com fibrose cística (STRATEVA; MITOV, 2011). A sua característica oxido-redutora permite inativar a ação da catalase nas células epiteliais do tecido pulmonar e do endotélio intestinal, participando nos danos causados ao epitélio pulmonar por estresse oxidativo (KIPNIS; SAWA; WIENER-KRONISH, 2006).

A pioverdina é o principal sideróforo produzido por *P. aeruginosa* e é responsável pela fluorescência verde-amarelada das suas colônias em condições de deficiência de ferro. Além da obtenção de ferro, por um mecanismo de excreção, seguido de incorporação após quilar o ferro férrico, tem participação na formação de biofilmes, sendo, nos doentes com fibrose cística, fundamental para o desenvolvimento dos biofilmes nos pulmões (SAHA et al., 2012). A pioverdina está envolvida também na sua própria regulação e na regulação de outros fatores de

virulência, através do reconhecimento do complexo pioverdina-ferro ao nível da membrana externa da célula e que gera uma cascata de sinais citoplasmáticos, que vão regular os genes envolvidos na síntese da pioverdina, *ToxA* e endoprotease (KIPNIS; SAWA; WIENER-KRONISH, 2006; SAHA et al., 2012).

Além da atuação frente ao ferro, os sideróforos conseguem quitar uma série de outros íons de metais pesados, como Ag^+ , Al^{3+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Cr^{2+} , Cu^{2+} , Eu^{3+} , Ga^{3+} , Hg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , Sn^{2+} , Tb^{2+} , Tl^+ e Zn^{2+} para proteção contra sua ação nociva (BRAUD et al., 2009; SAHA et al., 2012)

Os outros pigmentos são mais raros, sendo a piorrubina de cor vermelha e a piomelanina de coloração marrons (FREITAS; BARTH, 2004). Essas substâncias tem uma melhor produção em temperaturas abaixo de 37°C e na presença de ferro, tem demonstrado possuir atividade antibacteriana e efeito na integridade do epitélio respiratório (KONG et al., 2006, TODAR, 2012)

2.3.11 Quorum sensing

Algumas características da célula bacteriana, não são consideradas por alguns autores como sendo fatores de virulência, por não causarem diretamente danos ao hospedeiro, contudo, contribuem também para a sua patogenicidade, por promoverem o seu sucesso em termos de sobrevivência e disseminação, sendo, portanto considerados fatores de virulência *lato sensu* como o *quorum sensing* (STRATEVA; MITOV, 2011).

O *quorum sensing* (QS) é um mecanismo de reconhecimento celular e de regulação da expressão de inúmeros genes das células bacterianas quando estas estão agrupadas, em *P. aeruginosa* é mediado por três sistemas: *Las*, *Rhl* e *Pqs* (HARMSEN et al., 2010). É importante na formação e manutenção de biofilmes, pois permite reconhecer a densidade populacional e as condições do meio em que as células se encontram e promover as alterações para garantir a sua sobrevivência (CHUN et al., 2004).

Muitos dos genes regulados por QS expressam fatores de virulência, assim conclui-se ele desempenha um papel de grande importância para a patogenicidade. O sistema *Las* regula, entre outros, a expressão dos genes *lasI*, *lasA*, *lasB*, *apr* e *toxA*, o sistema *Rhl* controla a expressão de *rhlI*, *rhlA* e *rhlB*, associados à produção de ramanolípidos, e o sistema *Pqs* regula diversos genes com impacto no “fitness” celular e outros associados a elastases, ramanolípidos e piocianina (STRATEVA; MITOV, 2011). Alguns estudos parecem evidenciar que as AHLs podem participar duma forma direta na patogênese, promovendo, em alguns casos, a apoptose em macrófagos e neutrófilos (TATEDA et al., 2003).

2.4 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

A resistência a antimicrobianos em *P. aeruginosa* tem aumentado em todo o mundo. As infecções causadas por *P. aeruginosa* resistente a antibióticos estão associadas ao aumento das taxas de mortalidade, morbidade, necessidade de intervenções cirúrgicas, permanência da estadia hospitalar e cuidados crônicos (HIRSCH;TAM, 2010).

Nos últimos anos as infecções hospitalares causadas por *P. aeruginosa* tem se mostrado um grande desafio para a terapêutica antimicrobiana. Visto que frequentemente os isolados de *P. aeruginosa* tem apresentado um amplo espectro

de resistência, podendo exibir resistência a diferentes classes de agentes antimicrobianos (incluindo cefalosporinas de terceira e quarta geração e carbapenemicos) através da aquisição de diversos mecanismos distintos de resistência aos antimicrobianos ao mesmo tempo (FUENTEFRIA et al., 2008; TODAR, 2012).

Dentre os mecanismos de resistência apresentados por *P. aeruginosa*, encontra-se a baixa permeabilidade da parede celular e da membrana externa. Essa redução de permeabilidade pode ocorrer devido à mutações que reduzem a expressão de porinas, impedindo a entrada de agentes antibacterianos como β-lactâmicos, tetraciclinas, entre outros (LIVERMORE, 2002).

Alterações envolvendo as proteínas ligadoras de penicilina (PBPs), também se destacam como mecanismos de resistência. Essas proteínas possuem grande afinidade pelos β-lactâmicos, antibióticos que bloqueiam a função estrutural das PBPs e estimulam a liberação de autolisinas, levando a lise celular. As modificações das PBPs resultam no bloqueio do efeito dos β-lactâmicos (WINN, 2008).

Outro mecanismo é a hiperexpressão de bombas de efluxo, que reduz a concentração intracelular de diversos antimicrobianos, corantes e detergentes através da ejeção destes para fora da célula (LIVERMORE, 2002).

P. aeruginosa também pode produzir enzimas que se ligam as moléculas antimicrobianas inutilizando-as ou hidrolizando-as, como, cefalosporinases, carbapenemases, aminoglicosidades e betalactamases incluindo as β-lactamases de espectro estendido (ESBL), oxacilinases, carbacilinases e mais recentemente descritas as metalo-β-lactamases (GALES et al., 2002; LIVERMORE, 2002).

A combinação desses mecanismos de resistências pode originar isolados MDR, que apresentam resistência simultânea a três ou mais classes de agentes antimicrobianos, extensivamente-resistente (XDR), que são resistentes a todas as drogas exceto a duas ou menos categorias, ou pan-resistente (PDR), que são resistentes a todos agentes antimicrobianos aprovados. Sendo uma bactéria considerada resistente a uma droga quando apresentar-se resistente ou com resistência intermediaria pelo CLSI (LIVERMORE, 2002; MAGIORAKOS et al., 2012). A introdução destas designações não só na comunidade científica, mas também na prática clínica permitiu uma melhor comparação entre dados e, por consequência, uma melhor compreensão global e generalizada da problemática da multirresistência bacteriana de grau elevado (MAGIORAKOS et al., 2012).

O Programa de Vigilância Antimicrobiana na America Latina e Brasil refere-se a *P. aeruginosa* como uma das bactérias mais preocupantes em relação à multirresistência, o que requer ações contínuas e eficazes de controle de infecções nosocomiais (SADER et al., 2001).

A ocorrência destas cepas limita as opções terapêuticas para o tratamento das infecções por elas causadas e aumenta a probabilidade de transferência e disseminação de genes de resistência entre a população nosocomial. O relatório de 2013 do EARS-Net (ECDC, 2013) revelou que a resistência antimicrobiana em *P. aeruginosa* na Europa, é acima de 10 % para todos os grupos de antimicrobianos sob vigilância. A resistência combinada é comum, sendo 14,3 % dos isolados eram resistentes a pelo menos três grupos antimicrobianos e 4,6% eram resistentes para todos os cinco grupos. No Brasil, Jácome et al. (2012), caracterizaram o perfil de resistência de isolados nosocomiais de *P. aeruginosa* de cinco hospitais públicos do

Recife no período de 2006 a 2010, onde observaram que 4,92% dos isolados eram PDR e 54,09% MDR.

As políticas de prescrição de antibióticos devem considerar estratégias para otimizar a indicação, seleção e periodicidade da antibioticoterapia para maximizar a cura clínica, limitando as consequências indesejadas como a toxicidade para o paciente, e o surgimento de micro-organismos resistentes (GYSSENS, 2011). A antibioticoterapia empírica inicial deve ser suportada por estudos epidemiológicos locais, a caracterização dos patógenos envolvidos deve ser feita o mais rapidamente possível permitindo ajustar de imediato o regime terapêutico para limitar a pressão seletiva dos antibióticos sobre as cepas infecciosas, na tentativa de diminuir a probabilidade de desenvolvimento de resistências (MESAROS et al., 2007).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Descrever a presença dos fatores de virulência fenotípicos e genéticos de acordo com o padrão de resistência aos antimicrobianos (MDS e MDR), estabelecer a relação clonal e descrever a origem dos isolados nosocomiais de *P. aeruginosa*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Classificar os isolados nosocomiais de *P. aeruginosa* quanto ao seu padrão de resistência em MDS, MDR;
- Pesquisar fenotipicamente a presença dos fatores de virulência: protease alcalina, lipase, fosfolipase C, hemolisina e pigmentos;
- Pesquisar geneticamente a presença dos genes de virulência: *aprA*, *lasA*, *lasB*, *plcH* e *toxA*;
- Investigar a relação clonal entre os isolados de *P. aeruginosa*;
- Descrever a correlação entre o perfil de virulência, padrão de resistência, relação clonal e origem entre os isolados em estudo.

4 METODOLOGIA

4.1 DESENHO DO ESTUDO

Estudo descritivo de base laboratorial, onde foram realizadas técnicas fenotípicas e genéticas para detecção dos fatores de virulência, relação clonal e padrão de resistência em isolados clínicos de *P. aeruginosa*. As metodologias utilizadas foram reproduzidas em duplicatas e seguiram protocolos específicos contemplados em artigos científicos sendo realizadas as devidas modificações quando necessário. Os resultados foram expressos em percentagem.

4.2 OS ISOLADOS BACTERIANOS

O estudo compreende 30 isolados bacterianos provenientes de amostras nosocomiais de *P. aeruginosa*. Estes isolados haviam sido previamente identificados e testados quanto à susceptibilidade antimicrobiana, e foram obtidos a partir de estoque congelado em glicerol 20% à -20°C da bacterioteca do Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular do Departamento de Medicina Tropical da UFPE.

Os isolados foram selecionados aleatoriamente de acordo com seus perfis de susceptibilidade e classificados de acordo com o CLSI 2014 em MDS e MDR, em um total de 15 isolados por grupo.

Para as análises do presente estudo, os isolados foram reativados após inoculação em caldo BHI (Brain Heart Infusion) e incubação de 24 a 48 horas em estufa a 37°C. Após o crescimento bacteriano, os isolados foram semeados em meio Ágar Cetrimide, que é seletivo para o isolamento de *P. aeruginosa*, bem como cultivados em Ágar nutritivo para conservação dos mesmos em estoque.

4.3 ANÁLISES FENOTÍPICAS

4.3.1 Padrão de resistência

Para padronização da resistência MSD e MDR, foi realizada confirmação do padrão de susceptibilidade aos antimicrobianos através da realização do teste de disco difusão, segundo o CLSI 2014.

Os isolados foram inoculados em caldo BHI e incubados a 37°C até obter crescimento com suspensão semelhante ao tubo 0,5 da escala de Mac Farland. Em seguida a suspensão foi semeada de modo uniforme com o auxilio de um swab em meio Ágar Mueller Hinton, e os discos de antimicrobianos dispensados sobre a superfície. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas, e após este período foi realizada a leitura dos halos de inibição conforme recomendação do CLSI 2014.

Os isolados foram testados frente aos seguintes antimicrobianos segundo suas classes, cefalosporinas: ceftazidima (CAZ), cefepime (CPM), cefotaxima (CTX), ceftriaxona (CRO); carbapenemicos: imipenem (IMP), meropenem (MPM); quinolonas: ciprofloxacina (CIP), norfloxacina (NOR), ofloxacina (OFX); macrolídeos: azitromicina (ATM); β-lactâmico + inibidor de β-lactamase: Ticarcilina + ácido clavulânico (TAC); aminoglicosídeos: gentamicina (GEN) e amicacina (AMI).

Os isolados que foram resistentes a menos de três classes de antimicrobianos foram classificados como MDS, e aqueles que foram resistentes a 3 ou mais classes classificados como MDR, conforme Deptuła e Gospodarek (2009).

É importante ressaltar que os isolados já haviam sido testados no momento de sua coleta para a determinação da susceptibilidade, porém foram realizados novos testes para confirmação de que não haviam ocorrido perdas de resistência durante o período de congelação.

4.3.2 Produção de Pigmentos

A avaliação da produção de pigmento (piocianina, pioverdina, piorrubina e piomelanina) foi realizada através da observação da coloração correspondente a cada pigmento apresentada no meio de cultivo ágar cetrímide após 24 horas de incubação à 37°C, a produção de pioverdina foi confirmada ao submeter às culturas à luz ultravioleta e estas emitirem fluorescência (WINN et al., 2008).

4.3.3 Produção de Hemolisinas

Na avaliação da produção de hemolisinas, os isolados foram semeados em Ágar sangue e incubados por 24 horas a 37°C. Foram considerados produtores de hemolisinas os isolados que apresentarem halo translúcido ao redor das colônias, indicando hemólise (WINN et al., 2008).

4.3.4 Produção de Protease

A pesquisa de produção de protease alcalina foi realizada de acordo com o método de JAGGER; BAHNER; WARREN (1983). Os isolados foram inoculados em spots em placas de Ágar *skim Milk* (2%) e incubados à 37°C durante 24 horas. A presença de um halo translúcido ao redor das colônias foi interpretada como resultado positivo, e a ausência deste halo como resultado negativo. Foi utilizada a cepa de referência de *P. aeruginosa* ATCC15692 (PA 01) como controle positivo.

4.3.5 Produção de Fosfolipase C

Para determinar a produção de fosfolipase C, foi utilizado o método descrito por Habermann e Hardt (1972) com algumas modificações. Os isolados foram inoculados em spots em placas contendo meio de cultivo TSA (Trypticase Soy Ágar) enriquecido com 10% (vol/vol) de solução de gema de ovo com telurito. As placas foram incubadas em estufa por 24 horas à 37°C. Para a análise dos resultados a produção de um precipitado negro sobre a zona de crescimento foi considerado como produtores de fosfolipase C, os que não apresentaram como não produtores. Foi utilizada a cepa de referência de *P. aeruginosa* ATCC15692 (PA 01) como controle positivo.

4.3.6 Produção de Lipases

A produção de lipases foi determinada segundo o método descrito em Janda e Bottone (1981). O meio de cultura TSA enriquecido com 1% Tween 80, foram

feitas inoculações em *spots* e a placa foi incubada a 37°C, durante 24 horas. A formação de um halo turvo em torno da zona de crescimento foi considerado positivo para a produção de lítases, e a ausência negativo. Foi utilizada a cepa de referência de *P. aeruginosa* ATCC15692 (PA 01) como controle positivo.

4.4 ANÁLISES GENÉTICAS

4.4.1 Extração de DNA

O protocolo utilizado para obtenção DNA bacteriano seguiu o procedimento descrito pelo fabricante do kit Brazol (LGC-Biotecnologia), em seguida o DNA bacteriano foi quantificado através de espectrofotometria em uma faixa de comprimento de onda entre 260 a 280 nm.

4.4.2 Pesquisa da relação clonal

A relação clonal foi determinada através da técnica de ERIC-PCR, que foram preparadas em um volume de 25 ul por tubo contendo: 100ng de DNA bacteriano, 10 pmol dos primers (ERIC-1: 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3'; ERIC-2: 5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3') (DUAN et al., 2009), tampão 1x, 200 uM de dNTP, 1,5uL de MgCl₂ e 1U de taq DNA polimerase. Os parâmetros da PCR foram: desnaturação inicial 95°C por 3min, seguido de 30 ciclos de 92°C por 1 minuto, anelamento de 36°C por 1 minuto e extensão de 72°C por 8 minutos, seguido de 16 min a 72°C. Os produtos foram corados com o corante blue-green e submetidos a eletroforese a 1,5% em gel de agarose, visualizados em luz ultra violeta e fotodocumentados. A análise dos dados e a construção do dendrograma foram feitas utilizando o software Past.exc.

4.4.3 Detecção dos genes de virulência

A pesquisa de genes de virulência que codificam protease alcalina (*aprA*), elastase A (*lasA*), elastase B (*lasB*), fosfolipase C hemolítica (*plcH*) e exotoxina A (*toxA*) foram detectados por PCR (reação em cadeia da polimerase). As sequências de iniciadores utilizados estão descritos na Tabela 1.

A reação de PCR (reação em cadeia da polimerase) foi realizada como descrito por Lanotte et al. (2004) e Lomholt, Poulsen e Kilian (2001), com modificações. As reações de amplificação foram realizadas num volume final de 25 uL contendo 10 ng de DNA, 0,2 mM de dNTP, 20 pmol de cada iniciador, MgCl₂ 2 mM e 1,0 U Taq polimerase de DNA em tampão de reação 5X. O DNA foi amplificado em um Termociclador utilizando o seguinte protocolo: desnaturação inicial 94°C durante 3 min, 30 ciclos, desnaturação 94°C por 30 s, anelamento 55°C durante 1 min e extensão 72°C durante 1 min 30 s, e extensão final de 72°C por 5 min, cada gene foi amplificado separadamente. A exceção ao protocolo descrito é o gene *aprA* que utilizou uma temperatura de anelamento de 62°C. Os produtos de PCR foram detectados após electroforese em 1% em gel de agarose, corados com corante blue-green (0,05 ug / mL) a 100 V durante 30 min e detectados por transluminação ultra-violeta e fotodocumentados, conforme exemplo da figura 1. A cepa de *P. aeruginosa* ATCC15692 (PA 01) foi utilizada como controle positivo.

Tabela 1: Sequência de nucleotídeos dos genes de virulência

Gene	Sequência	Tamanho do amplicon (BP)	Referência
<i>aprA</i>	F GTCCTATAACCGTCGACCAGGC R GTCGCTACCCGAGCCGCCGAT	928	(Lomholt; Poulsen; Kilian 2001)
<i>lasA</i>	F CGCCATCCAACCTGATGCAAT R AGGCCGGGGTTGTACAACGGA	514	(Lomholt; Poulsen; Kilian 2001)
<i>lasB</i>	F GGAATGAACGAAGCGTTCTC R GGTCCAGTAGTAGCGGTTGG	300	(Lanotte <i>et al.</i> , 2004)
<i>plcH</i>	F GAAGCCATGGCTACTCAA R AGAGTGACGAGGAGCGGTAG	307	(Lanotte <i>et al.</i> , 2004)
<i>toxA</i>	F GGTAACCAGCTCAGCCACAT R TGATGTCCAGGTCATGCTTC	352	(Lanotte <i>et al.</i> , 2004)

F:Ford; R:Reverse

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE FENOTÍPICA E GENÉTICA DE FATORES DE VIRULÊNCIAS DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *Pseudomonas aeruginosa* MULTIDROGA-SENSÍVEL E MULTIDROGRA-RESISTENTE

Introdução

Nos últimos anos as infecções hospitalares causadas por *Pseudomonas aeruginosa* tem sido um dos principais desafios para a terapêutica antimicrobiana, visto que comumente estes bacilos tem apresentado um amplo espectro de resistência a diferentes classes de agentes antimicrobianos através da aquisição de diversos mecanismos distintos de resistência (FUENTEFRIA, et al., 2008; TODAR, 2012). A combinação desses mecanismos de resistências originou isolados multidroga-resistente (MDR) (LIVERMORE, 2002; MAGIORAKOS et al., 2012), que somado a falta de perspectivas para a introdução de novos fármacos que poderiam ser usados contra esse patógeno, propiciou a necessidade de investigações sobre sua fisiologia, principalmente no que se refere aos seus diversos fatores de virulência que também contribuem para definir o potencial de patogenicidade do processo infeccioso, uma vez que favorecem a infecção aumentando a lesão tecidual e protegendo *P. aeruginosa* contra o reconhecimento do sistema imunológico e da ação dos antimicrobianos (LANDMAN et al., 2002; TODAR, 2012).

Alguns estudos tem demonstrado um alto percentual da presença dos fatores de virulência em isolados de *P. aeruginosa*. Em um estudo realizado na China (WANG et al., 2013) cerca de 80% dos isolados estudados apresentavam produção de elastase, piocianina e protease alcalina; no Brasil Jácome et al (2012) encontraram resultados semelhantes (34.4% colônias mucosas; 70.5% produtores de piocianina; 93.4% produtores de gelatinase; 72.1% produtores de hemolisina), em relação ao padrão de resistência esses isolados apresentaram 54.1% MDR e 4.9% PDR (pan-resistentes). Contudo, trabalhos que correlacionem a produção dos fatores de virulência com o perfil de resistência aos antimicrobianos de *P. aeruginosa*s ainda são raros.

Estudo realizado na Polônia por Deptuła e Gospodarek (2010) revelou que cepas MDR apresentavam menor atividade de lipase, elastase, fosfolipase C e quantidade piocianina quando comparado com cepas multidroga-sensível (MDS), não foram observadas diferenças significativas na atividade da protease alcalina. Levando a crer que, as cepas de *P. aeruginosa* MDR têm a virulência diminuída quando comparada com cepas MDS. Entretanto este estudo limitou-se a pesquisa fenotípica desses fatores de virulência, não sendo confirmada a detecção dos genes responsáveis pela produção dos mesmos. É importante ressaltar também que o estudo citado foi realizado com isolados oriundos de um único hospital da Polônia, e levando em consideração a diversidade dos perfis de *P. aeruginosa* encontradas em diferentes regiões, faz-se necessário ampliar estudos locais.

Assim, este estudo visa descrever a correlação entre a presença dos fatores de virulência através de testes fenotípicos (protease alcalina, lipase, lecitinase, hemolisina, pigmentos) e genéticas (genes *aprA*, *lasA*, *lasB*, *plcH*, *plcN* e *toxA*) e o padrão de resistência aos antibióticos (MDS e MDR), a variabilidade genética e a origem entre isolados clínicos de *P. aeruginosa*.

Metodologia

Isolados Bacterianos

Para realização do estudo foram analisados 30 isolados bacterianos provenientes de amostras nosocomiais de *P. aeruginosa*. Estes isolados haviam sido previamente identificados e testados quanto à susceptibilidade antimicrobiana, e foram obtidos a partir de estoque congelado em glicerol 20% à -20°C da bacterioteca do Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular do Departamento de Medicina Tropical da UFPE.

Os isolados foram selecionados aleatoriamente de acordo com seus perfis de susceptibilidade e classificados de acordo com o CLSI (2014) em MDS (multidrogasensível) e MDR, em um total de 15 isolados por grupo.

Para as análises do presente estudo, os isolados foram reativados após inoculação em caldo BHI (Brain Heart Infusion) e incubação de 24 a 48 horas em estufa a 37°C. Após o crescimento bacteriano, os isolados foram semeados em meio Ágar Cetrimide, que é seletivo para o isolamento de *P. aeruginosa*, bem como cultivados em Ágar nutritivo para conservação dos mesmos em estoque.

Padrão de resistência

Para padronização da resistência MSD e MDR, foi realizada confirmação do padrão de susceptibilidade aos antimicrobianos através da realização do teste de disco difusão, segundo o CLSI 2014.

Os isolados foram inoculados em caldo BHI e incubados a 37°C até obter crescimento com suspensão semelhante ao tubo 0,5 da escala de Mac Farland. Em seguida a suspensão foi semeada de modo uniforme com o auxílio de um swab em meio Ágar Mueller Hinton, e os discos de antimicrobianos dispensados sobre a superfície. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas, e após este período foi realizada a leitura dos halos de inibição conforme recomendação do CLSI 2014.

Os isolados foram testados frente aos seguintes antimicrobianos segundo suas classes, cefalosporinas: ceftazidima (CAZ), cefepime (CPM), cefotaxima (CTX), ceftriaxona (CRO); carbapenemicos: imipenem (IMP), meropenem (MPM); quinolonas: ciprofloxacina (CIP), norfloxacina (NOR), ofloxacina (OFX); macrolídeos: azitromicina (ATM); β-lactâmico + inibidor de β-lactamase: Ticarcilina + ácido clavulânico (TAC); aminoglicosídeos: gentamicina (GEN) e amicacina (AMI).

Os isolados que foram resistentes a menos de três classes de antimicrobianos foram classificados como MDS, e aqueles que foram resistentes a três ou mais classes classificados como MDR, conforme Deptuła e Gospodarek (2009).

Produção de Pigmentos

A avaliação da produção de pigmento (piocianina, pioverdina, piorrubina e piomelanina) foi realizada através da observação da coloração correspondente a cada pigmento apresentada no meio de cultivo Ágar cetrimide após 24 horas de

incubação à 37°C, a produção de pioverdina foi confirmada ao submeter às culturas à luz ultravioleta e estas emitirem fluorescência (WINN et al., 2008).

Produção de Hemolisinas

Na avaliação da produção de hemolisinas, os isolados foram semeados em ágar sangue e incubados por 24 horas a 37°C. Foram considerados produtores de hemolisinas os isolados que apresentarem halo translúcido ao redor das colônias, indicando hemólise (WINN et al., 2008).

Produção de Protease alcalina

A pesquisa de produção de protease alcalina foi realizada de acordo com o método de JAGGER; BAHNER; WARREN (1983). Os isolados foram inoculados Ágar *skim milk* (2%) e incubados à 37°C durante 24 horas. A presença de um halo translúcido ao redor das colônias foi interpretada como resultado positivo, e a ausência deste halo como resultado negativo. Foi utilizada a cepa de referência de *P. aeruginosa* ATCC15692 (PA 01) como controle positivo.

Produção de Fosfolipase C

Para determinar a produção de fosfolipase C, foi utilizado o método descrito por Habermann e Hardt (1972) com modificações. Os isolados foram inoculados em spots em placas contendo meio de cultivo TSA (*Trypticase Soy Ágar*) enriquecido com 10% (vol/vol) de solução de gema de ovo com telurito. As placas foram incubadas em estufa por 24 horas à 37°C. A produção de um precipitado negro sobre a zona de crescimento foi considerado positivo para redução de fosfolipase C, os que não apresentaram negativo. Foi utilizada a cepa de referência de *P. aeruginosa* ATCC15692 (PA 01) como controle positivo.

Produção de Lipases

A produção de lipases foi determinada segundo o método descrito em Janda e Bottone (1981). Os isolados foram inoculados em TSA enriquecido com 1% Tween 80, e incubados a 37°C, durante 24 horas. A formação de um halo turvo em torno da zona de crescimento foi considerada positiva para a produção de lipases, e a ausência deste negativo. Foi utilizada a cepa de referência de *P. aeruginosa* ATCC15692 (PA 01) como controle positivo.

Pesquisa da relação clonal

A relação clonal foi determinada através da técnica de ERIC-PCR, que foram preparadas em um volume de 25 ul por tubo contendo: 100ng de DNA bacteriano, 10 pmol dos primers (ERIC-1: 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3'; ERIC-2: 5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3') (DUAN et al., 2009), tampão 1x, 200 uM de DNTP, 1,5uL de MgCl₂ e 1U de taq DNA polimerase. Os parâmetros da PCR foram: desnaturação inicial 95°C por 3min, seguido de 30 ciclos de 92°C por 1 minuto,

anelamento de 36°C por 1 minuto e extensão de 72°C por 8 minutos, seguido de 16 min a 72°C. Os produtos foram corados com o corante blue-green e submetidos a eletroforese a 1,5% em gel de agarose, visualizados em luz UV e fotodocumentados. A análise dos dados e a construção do dendrograma foram feitas utilizando o software Past.exc.

Detecção dos genes de virulência

A pesquisa de genes de virulência que codificam protease alcalina (*aprA*) F (5'-GTCCTATAACCGTCGACCAGGC-3'), R (5'-GTCGCTACCCGAGGCCGCCAT-3'), 928 bp (LOMHOLT; POULSEN; KILIAN, 2001); elastase A (*lasA*) F (5'-CGCCATCCAACCTGATGCAAT-3'), R (5'-AGGCCGGGGTTGTACAACGGA-3'), 514 bp ((LOMHOLT; POULSEN; KILIAN, 2001)); elastase B (*lasB*) F (5'-GGAATGAACGAAGCGTTCTC-3'), R (5'-GGTCCAGTAGTAGCGGTTGG-3'), 300 bp (LANOTTE et al., 2004); fosfolipase C hemolítica (*plcH*) F(5'-GAAGCCATGGGCTACTTCAA-3'), R (5'-AGAGTGACGAGGAGCGGTAG-3'), 307 bp (LANOTTE et al., 2004) e exotoxina A (*toxA*) F (5'-GGTAACCAGCTCAGCCACAT-3'), R (5'-TGATGTCCAGGTCATGCTTC-3'), 352 bp (LANOTTE et al., 2004), foram detectados por PCR (reação em cadeia da polimerase).

A reação de PCR (reação em cadeia da polimerase) foi realizada como descrito por Lanotte et al. (2004) e Lomholt, Poulsen e Kilian (2001), com modificações. As reações de amplificação foram realizadas num volume final de 25 uL contendo 10 ng de DNA, 0,2 mM de dNTP, 20 pmol de cada iniciador, MgCl₂ 2 mM e 1,0 U Taq polimerase de DNA em tampão de reação 5X. O DNA foi amplificado em um Termociclador utilizando o seguinte protocolo: desnaturação inicial 94°C durante 3 min, 30 ciclos, desnaturação 94°C por 30 s, anelamento 55°C durante 1 min e extensão 72°C durante 1 min 30 s, e extensão final de 72°C por 5 min, cada gene foi amplificado separadamente. A exceção ao protocolo descrito é o gene *aprA* que utilizou uma temperatura de anelamento de 62°C. Os produtos de PCR foram detectados após electroforese em 1% em gel de agarose, corados corante blue-green (0,05 ug / mL) a 100 V durante 30 min e detectados por transluminação UV e fotodocumentados. A cepa de *P. aeruginosa* ATCC15692 (PA 01) foi utilizada como controle positivo.

Resultados

Padrão de resistência

Os dados do perfil de susceptibilidade estão apresentados na Figura 1. Os maiores percentuais de resistência (considerando resultados resistentes e intermediários) foram observados entre às cefalosporinas, ceftazidima com 50% (15/30), enquanto que a norfloxacina, apresentou a menor frequência de isolados resistentes 16,67% (5/30).

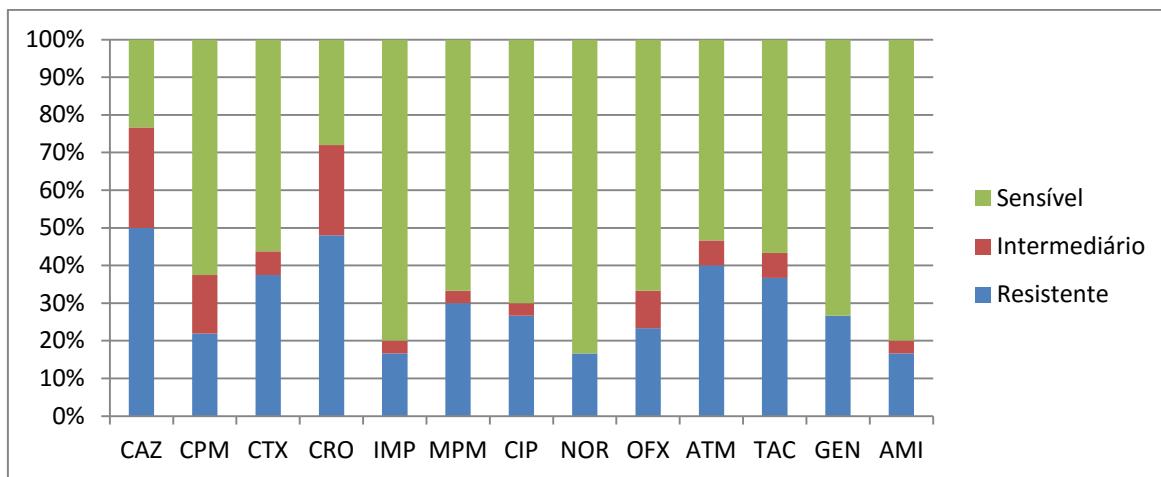


Figura 1. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de Isolados clínicos de *P. aeruginosa*
Nota: ceftazidima (CAZ), cefepime (CPM), cefotaxima (CTX), ceftriaxona (CRO);

imipenem (IMP), meropenem (MPM); quinolonas: ciprofloxacina (CIP), norfloxacina (NOR), ofloxacina (OFX); azitromicina (ATM); Ticarcilina + ácido clavulâmico (TAC); gentamicina (GEN), amicacina (AMI).

A frequência da resistência às classes de antimicrobianos entre isolados MDS e MDR está representada na figura 2 e a distribuição da frequência dos isolados conforme o número de classes a qual eles foram resistentes está descrita na tabela 1. Nota-se que entre isolados MDS houve uma maior frequência de isolados resistentes a cefalosporinas 66,67% (10/15) e todos os isolados testados foram sensíveis aos carbapenêmicos e quinolonas, e entre isolados MDR todos os isolados apresentaram resistência à classe das cefalosporinas, e uma menor frequência da resistência aos aminoglicosídeos 53,34% (8/15).

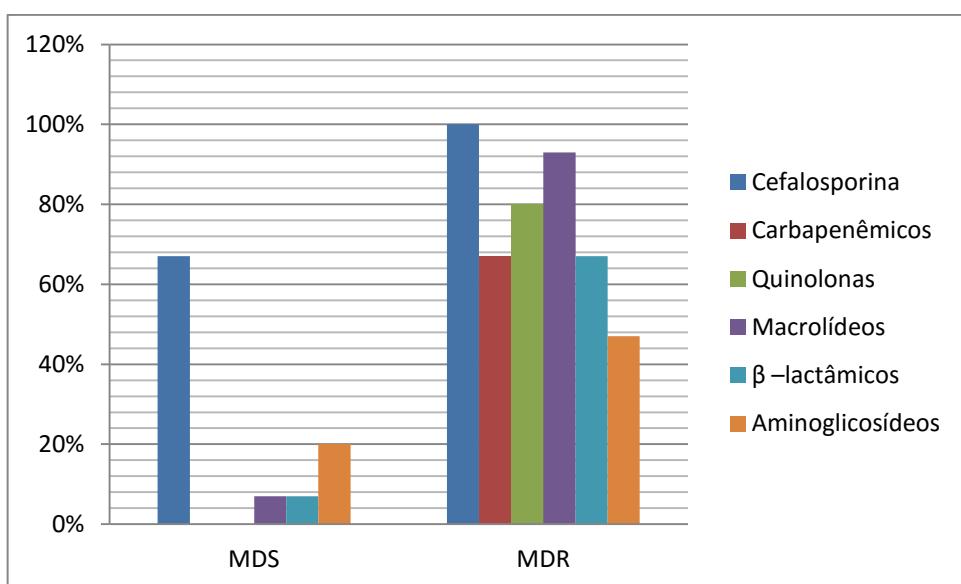


Figura 2. Perfil de resistência às classes de antimicrobianos entre isolados MDS e MDR de *P. aeruginosa*

Tabela 1. Frequência de isolados resistentes conforme o número de classes de antimicrobianos testados

MDS	N	%
Sensíveis a todas as classes	5	33,4
Resistente a 1 classe		
Cefalosporinas	5	33,4
Resistentes a 2 classes		
Cefalosporinas + Aminoglicosídeos	3	20
Cefalosporinas + Macrolídeos	1	6,7
Cefalosporinas + β -lactâmicos	1	6,7
Total	5	100
MDR		
Resistentes a 3 classes		
Cefalosporinas + β –lactâmicos + Macrolídeos	3	20
Cefalosporinas + Carbapenêmicos + Quinolonas	1	6,7
Resistentes a 4 classes		
Cefalosporinas + Quinolonas + Macrolídeos + β –lactâmicos	2	13,4
Cefalosporinas + Carbapenemicos + Quinolonas + Macrolídeos	1	6,7
Resistentes a 5 classes		
Cefalosporina+Carbapenemicos+Quinolona+Macrolídeo+ Aminoglicosídeos	3	20
Cefalosporinas + Carbapenemicos +Quinolonas + Macrolídeos + β –lactâmicos	1	6,7
Resistentes a todas as classes	4	26,7
Total	5	100

Nota: N = número de isolados

Origem dos isolados bacterianos

A figura 3 mostra a distribuição das origens das amostras nosocomiais de *P. aeruginosa*. Mais da metade dos isolados foram oriundos de amostras de secreções traqueais.

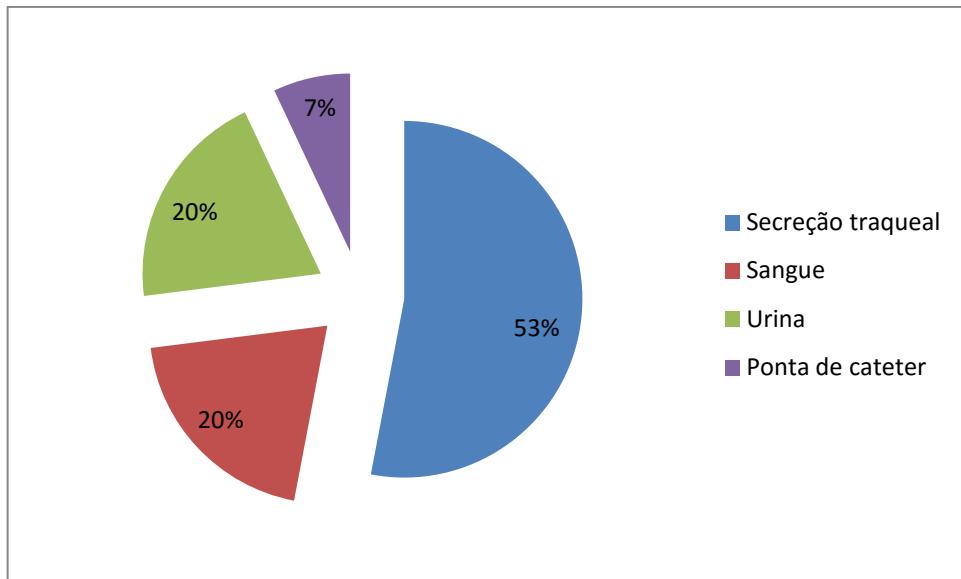


Figura 3. Distribuição das amostras nosocomiais por *P. aeruginosa*

Fatores de virulência fenotípicos

Foi feita a pesquisa fenotípica de 7 características associadas a virulência, com os resultados expressos na forma nominal (presente/ausente): piocianina, pioverdina, piomelanina, hemolisina, protease, lipase e fosfolipase C. Os resultados estão apresentados na figura 4. Onde é possível visualizar que entre os isolados MDS houve uma maior produção de fosfolipase e entre os isolados MDR houve uma maior produção de lipase. Para a produção de proteases e pioverdina ambos os grupos obtiveram a mesma frequência, sendo que para a pioverdina todos os isolados estudados apresentaram sua produção.

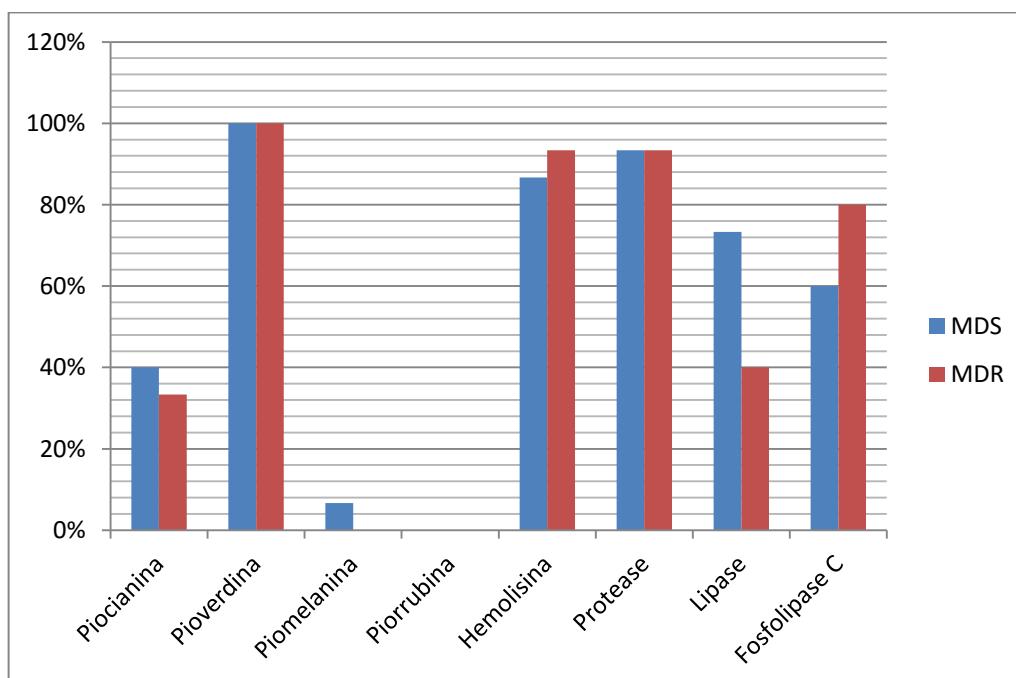


Figura 4: Frequência dos fenótipos de virulência de isolados clínicos de *P. aeruginosa* de acordo com o padrão de resistência MDS e MDR

Genes de virulência

Os resultados na figura 5 apresentam a distribuição da frequência dos genes de virulência de acordo com o padrão de resistência. Os isolados MDS obtiveram uma frequência 20% menor dos genes *toxA* e *lasA*, que os isolados MDR. Todos os isolados em estudo apresentaram os genes *lasB* e *plcH*.

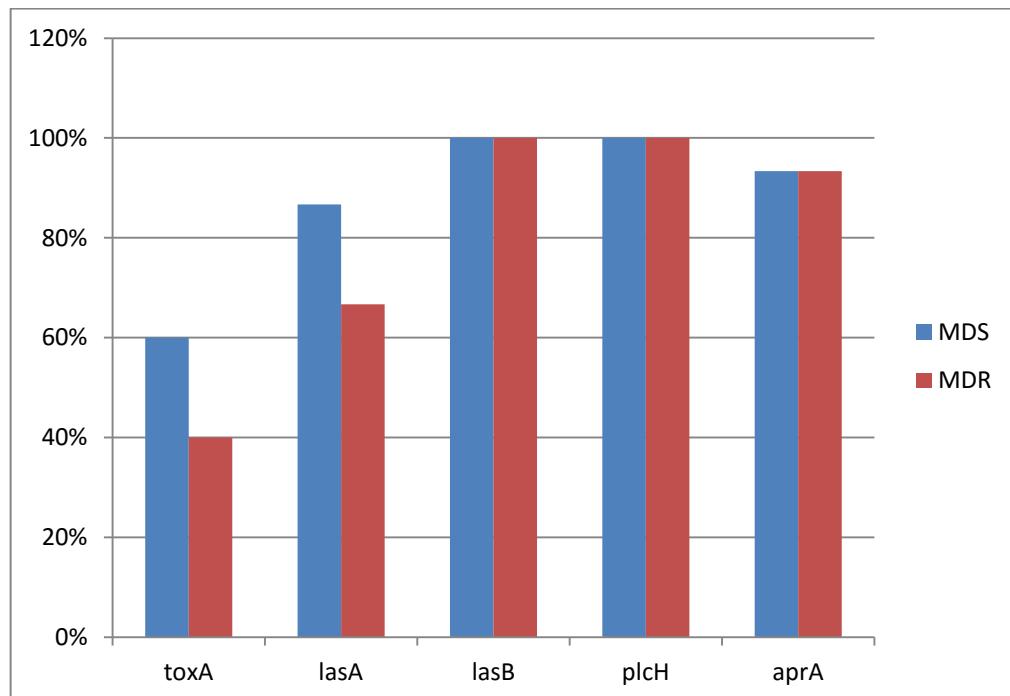


Figura 5: Frequência dos genes de virulência de isolados clínicos de *P. aeruginosa* de acordo com o padrão de resistência MDS e MDR

Relação genética

A tipagem molecular dos isolados revelou 28 perfis genéticos, com a presença de 2 clones, a figura 6 é a representação do dendrograma de similaridade genética entre todos os isolados de *P. aeruginosa* estimado pela técnica de ERIC-PCR.

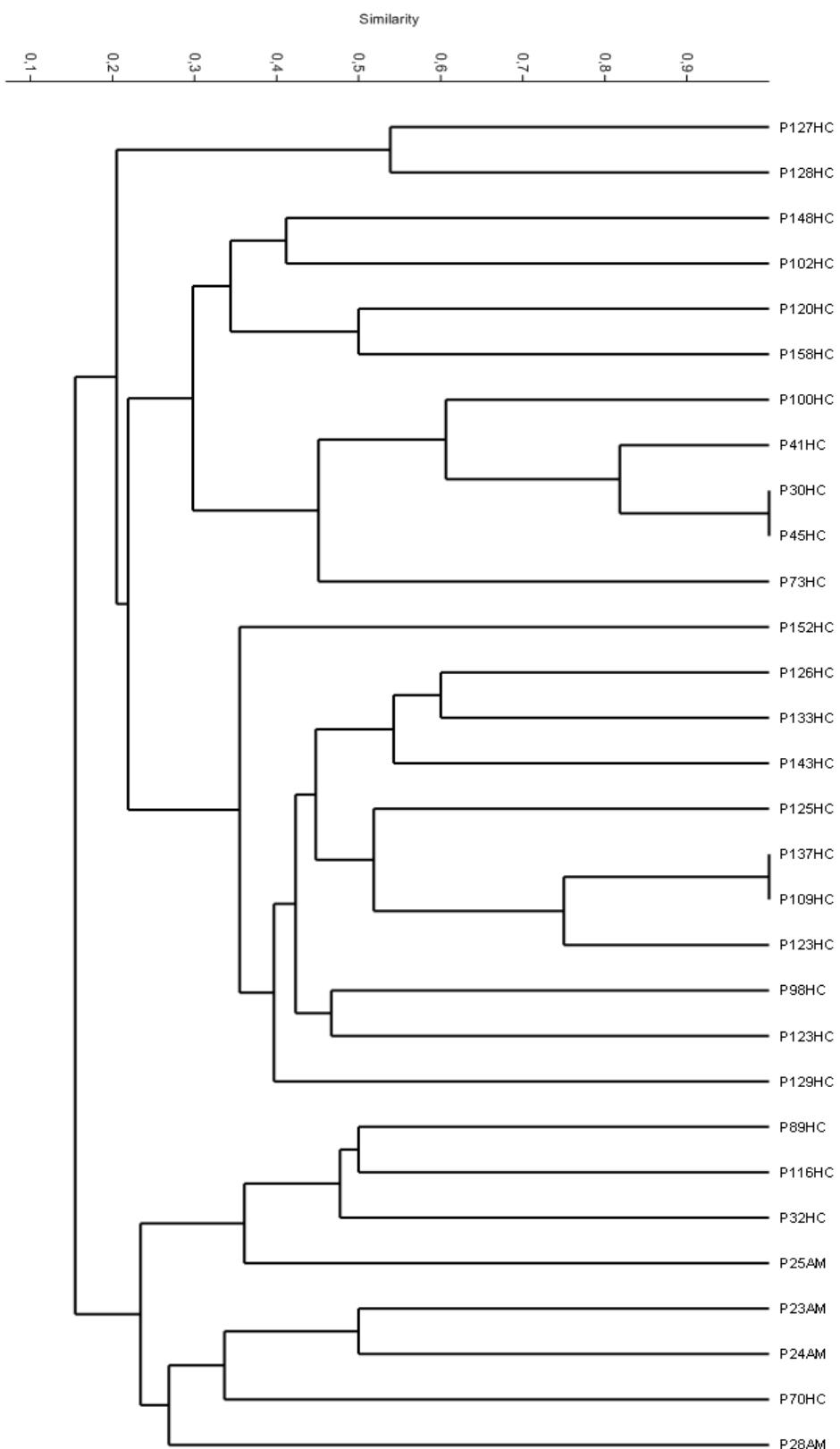


Figura 6: Dendrograma de similaridade genética entre todos os isolados de *P. aeruginosa* estimado pela técnica de ERIC-PCR

As figuras 7 e 8 apresentam dendrogramas de similaridade genética entre os isolados MDS e MDR, respectivamente, onde é possível visualizar que os clones mencionados foram encontrados entre os isolados MDR.

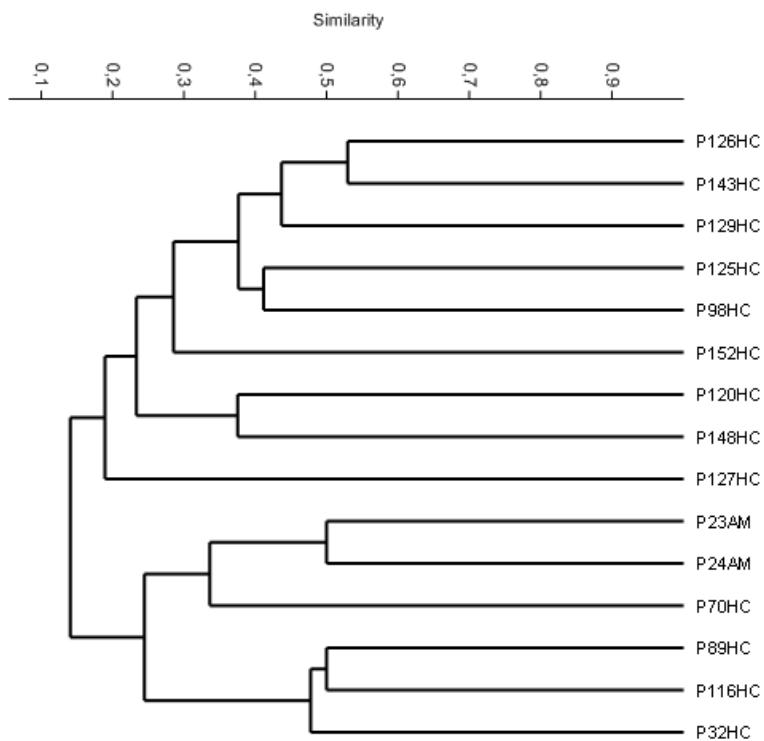


Figura 7: Dendrograma de similaridade genética entre os isolados MDS de *P. aeruginosa* estimado pela técnica de ERIC-PCR

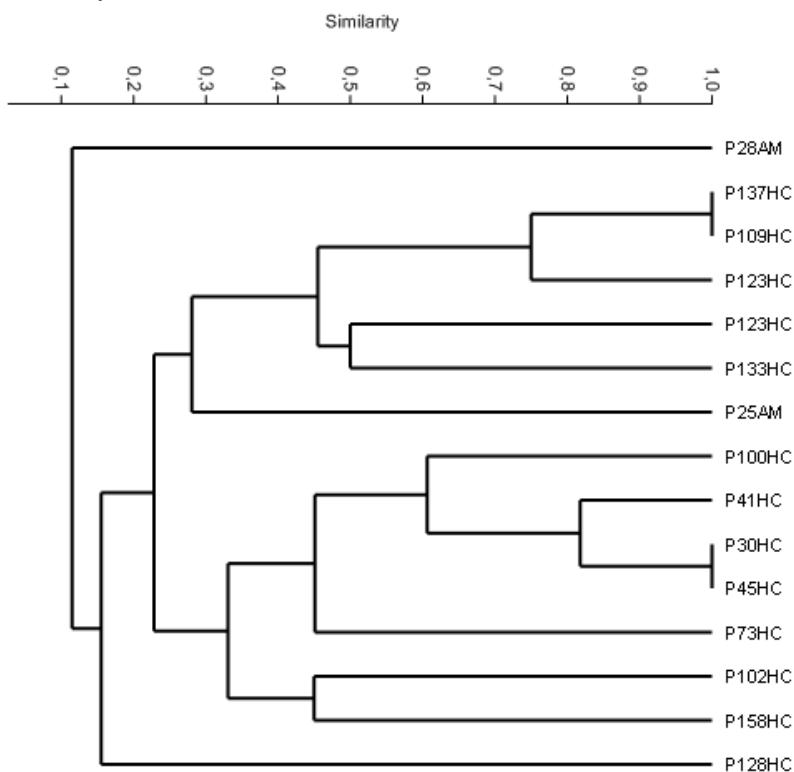


Figura 8: Dendrograma de similaridade genética entre os isolados MDR de *P. aeruginosa* estimado pela técnica de ERIC-PCR

Discussão

Os resultados do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de isolados clínicos de *P. aeruginosa* deste estudo revelou que 50% dos isolados apresentaram resistência à ceftazidima. Por ser uma cefalosporina de terceira geração, a ceftazidima é utilizada em tratamentos de infecções graves, tais como septicemia e infecções diversas causadas por *P. aeruginosa* (PEREZ et al., 2012). No Brasil, Marra et al (2011) revelou que entre os isolados de *P. aeruginosa* 36,6% eram resistentes à ceftazidima (MARRA et al., 2011). Jácome et al (2012) relatou 32,79% de resistência a ceftazidima entre isolados de *P. aeruginosa* de Recife. Um estudo de análise prospectiva durante um ano realizado na Índia revelou que 59% das *P. aeruginosa* isoladas de vários sitios e diferentes amostras clínicas também foram resistentes a ceftazidima (UMADEVI et al., 2011).

No presente estudo, entre os isolados MDS houve uma maior resistência às cefalosporinas 66,67% (10/15), assim como entre os isolados MDR, onde todos os isolados apresentaram resistência à classe das cefalosporinas. A tendência à menor sensibilidade às cefalosporinas tem sido descritas em outras regiões graças ao uso em larga escala das cefalosporinas de 3^a geração como opção terapêutica quase exclusiva, por muitos anos, para pacientes graves nas emergências e enfermarias de hospitais públicos (BAYRAM; BALCI, 2006; MCGOWAN, 2006).

Todos os isolados MDS testados foram sensíveis aos carbapenêmicos e quinolonas. Jácome et al. (2012), descreveu que em isolados hospitalares de *P. aeruginosa* os fármacos imipenem e meropenem foram compostos mais ativos apresentando 63,93% e 62,3% de susceptibilidade respectivamente. E entre isolados MDR e uma menor frequência da resistência aos aminoglicosídeos 53,34% (8/15), Pires et al. (2009), destaca a amicacina com 84,62% de susceptibilidade. A grande diversidade apresentada no perfil de susceptibilidade às classes de antimicrobianos sugere a existência de associação de diversos mecanismos de resistência.

Os isolados que foram sensíveis a todas as classes de antimicrobianos, eram oriundos de secreções traqueais, de indivíduos nas UTIs (unidades de terapia intensiva) e mais da metade dos isolados em estudo tiveram como origem amostras de secreção traqueal, o resultado não surpreende, visto que *P. aeruginosa* é um dos principais micro-organismos relacionados a infecções associadas a pacientes em uso de tubos endotraqueais (STRATEVA; MITOV, 2011).

Em nosso trabalho 40% e 33,34% dos isolados MDS e MDR, respectivamente, apresentaram produção de piocianina, valores semelhantes ao encontrados por Deptuła e Gospodarek (2009), 33 (44,4%) MDS e 31 (41,3%) MDR. A superprodução de piocianina foi detectada em diferentes secreções das vias aéreas de pacientes colonizados por *P. aeruginosa*, além de estar associada com a gravidade da doença e a diminuição da função pulmonar (RADA;LETO, 2013).

Silva et al. (2014) encontrou uma maior produção de piocianina em isolados oriundos infecções urinárias. Entre nossos resultados, todos os isolados produtores de piocianina foram oriundos de amostras de secreção traqueal e urina. Em todos os isolados analisados foi observada a produção de pioverdina e apenas um isolado apresentou piomelanina, em Prado, (2009) mais de 74% das cepas clínicas exibiram pioverdina. Finlayson e Brown (2011) estudaram isolados clínicos de diversas origens comparando as cepas pigmentadas (produtoras de piocianina e/ou pioverdina) com cepas não pigmentadas e concluíram que os isolados pigmentados

produzem mais elastase, protease e lipase que os não pigmentados. No presente trabalho, todos os isolados apresentaram algum tipo de pigmento o que pode estar associada a grande frequência dos demais fatores de virulência.

Uma alta produção de hemolisina foi detectada em ambos os grupos 86,67% MDS e 93,34% em MDR. Três isolados apresentaram fenotipicamente resultados negativos para hemólise, contudo foram positivos para a detecção do gene *plcH*. A fosfolipase C hemolítica e os ramnolípidos são hemolisinas produzidas por *P. aeruginosa* que poderiam agir de maneira sinérgica na degradação dos lípidos e lecitinas, de modo que potencialise a lise dos eritrócitos (JÜRGENS;ÖZEL;TAKAISI-KIKUNI, 2002).

Neste trabalho 93,34% dos isolados MDR e MDS apresentaram produção de protease, assim como em Deptuła e Gospodarek (2009), não houve diferenças entre os grupos, os dois isolados que não apresentaram atividade proteolítica no teste fenotípico também apresentaram resultado negativo na detecção do gene *aprA*, demonstrando correspondencia.

Deptuła e Gospodarek (2009), demonstraram que sobrenadantes de cultura das cepas de *P. aeruginosa* MDR, houve uma menor atividade lipolítica foi observado, fato similar também foi representado no presente estudo onde 73,34% dos isolados MDS apresentaram atividade lipolítica, enquanto apenas 40% dos isolados MDR foram positivos.

Neste estudo 60% dos isolados MDS e 80% dos MDR apresentaram atividade da fosfolipase C, contrapondo-se aos resultados de Deptuła e Gospodarek (2009), onde as cepas MDR expressaram uma menor atividade fosfolipase C em sobrenadantes de cultura do que as cepas de MDS. Todos os isolados estudados foram positivos para a detecção do gene *plcH*, igual ao estudo de Prado (2009), contudo nove isolados não apresentaram fenotipicamente produção de fosfolipase C, este fato pode ter ocorrido devido a regulação de expressão do gene.

Os resultados da detecção dos genes *lasA* e *lasB*, responsáveis pela expressão das elastases A e B, respectivamente, demonstraram uma menor frequência entre isolados MDR 66,67%, em relação a isolados MDS 86,67%. Deptuła e Gospodarek (2009) obtiveram uma baixa atividade da elastase observada nos sobrenadantes de cepas MDR de *P. aeruginosa* quando comparado com cepas MDS, uma baixa atividade da protease *lasA* também foi observado em cepas de MDR por Sanchez et al. (2002), que indicaram que mutantes de *P. aeruginosa* que superexpressam bombas de efluxo, produziram quantidades inferiores de elastase, contudo é necessário lembrar que tanto *lasA* quanto *lasB* são regulados por um *quorum sensing*, portanto sua expressão varia bastante conforme a regulação.

Alguns artigos relatam haver uma relação entre *lasB* e *toxA* (o gene estrutural para a exotoxina A) em cepas isoladas a partir de pulmões de pacientes com fibrose cística, em que os transcritos destes genes são regulados para mais nas células bacterianas (STOREY et al., 1997,1998). Neste trabalho não foi possível observar tal aspecto, contudo 60% dos isolados MDS e 40% dos MDR apresentaram o gene *toxA*. Em relação aos isolados resistentes a todas as 6 classes de antimicrobianos testados todos foram negativos em relação a detecção do gene *toxA*.

Em relação ao perfil genético, foi encontrada uma grande diversidade, em um total de 30 isolados foi possível observar 28 perfis genéticos. A presença de clones ocorreu entre os isolados MDR, curiosamente os clones P137HC e P109HC apresentaram resultados discordantes no teste da produção de hemolisina, e os clones P30HC e P45HC apresentaram resultados discordantes para a produção de

fosfolipase C. Tais resultados possivelmente ocorreram devido a regulação da expressão de genes, já que *P. aeruginosa* possui sistemas de *quorum sensing* que são responsáveis pela regulação da expressão de *plcH* (fosfolipase C hemolítica), raminolípidos entre outros fatores de virulência (STRATEVA; MITOV, 2011), o que explicariam tais diferenças fenotípicas.

Neste estudo os fatores de virulência dos isolados MDR apresentaram menor produção de piocianina e lipase, e menor detecção dos genes *toxA* e *lasA*, enquanto os MDS, apresentaram menor produção de hemolisina e fosfoliase C. Embora alguns estudos relatem que a aquisição de fatores de virulência pelas bactéria multirresistentes durante o processo infeccioso poderia levar a gastos metabólicos desnecessários ao micro-organismo (Sánchez et al., 2002), e que o acréscimo de mecanismos de resistência leva a diminuição dos fatores de virulência (DEPTUŁA; GOSPODAREK, 2009). Os resultados obtidos demonstraram essa correlação apenas para alguns dos fatores estudados, sugerindo que esta relação seja multifatorial. Contudo, a presença destes fatores de virulência em quase todos os isolados estudados nos alerta para o elevado nível de patogenicidade dos isolados derivados de infecções nosocomiais. Demonstrando, portanto que *P. aeruginosa* é um patógeno capaz de acumular inúmeros fatores de virulência e em alguns casos associado à multirresistência, o que dificulta o tratamento de infecções causadas por este micro-organismo.

Referências do artigo

BAYRAM, A.; BALCI, I. Patterns of antimicrobial resistance in a surgical intensive care unit of a university hospital in Turkey. **BMC Infect Dis.** 6:155. 2006.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**; Twenty-second Informal Supplement.2014.

DEPTUŁA, Aleksander; GOSPODAREK, Eugenia. Reduced expression of virulence factors in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. **Arch Microbiol.** [s.l.], 192. (1):79-84, 4 dez. 2009. DOI: 10.1007/s00203-009-0528-1.

DUAN, H.; CHAI, T.; LIU, J. Source identification of airborne *Escherichia coli* of swine house surroundings using ERICPCR and REP-PCR. **Environ Res.** 109:511–517. 2009.

FINLAYSON, E.A.; BROWN, PD. Comparison of Antibiotic Resistance and Virulence Factors in Pigmented and Non-pigmented *Pseudomonas aeruginosa*. **West Indian Med J** 60 (1): 24.2011

FUENTEFRIA, D. B.; FERREIRA, A.E.; GRAF, T.; CORÇÃO, G. *Pseudomonas aeruginosa*: disseminação de resistência antimicrobiana em esfente hospitalar e água superficial. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 41(5):470-473, 2008

HABERMANN, E.; HARDT, K.L. A sensitive and specific plate test for the quantitation of phospholipases. **Anal Biochem** 50: 163-173.1972

KIPNIS, E.; SAWA, T.; WIENER-KRONISH, J. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. **Med. et Maladies Infect.**, 36(2):78-91, feb.2006.

JÁCOME, P. R. L. 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**, [s.l.], 6(45):707-712, nov. 2012.

JAFFAR-BANDJEE, M. C.; LAZDUNSKI, A.; BALLY, M.; CARRÈRE, J.; CHAZALETTE, J.P.; GALABERT, C. Production of elastase, exotoxin A, and alkaline protease in sputa during pulmonary exacerbation of cystic fibrosis in patients chronically infect by *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Clin. Microbiol.**, 33(4):924-929, apr.1995.

JAGGER, K. S.; BAHNER, D. R.; WARREN, R. L. Protease phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with cystic fibrosis. **J. Clin. Microbiol.** 17(1):55-59, jan.1983.

JÜRGENS, D.; ÖZEL, M.; TAKAISI-KIKUNI, N.B. Production and characterization of *Escherichia coli* enterohemolysin and its effects on the structure of erythrocyte membranes. **Cell Biol Int** 26: 175-186. 2002

JANDA, J.M.; BOTTONE, E.J. *Pseudomonas aeruginosa* enzyme profiling: predictor of potential invasiveness and use as an epidemiological tool. **J Clin Microbiol.** v14. P. 55-60. 1981

LANDMAN, D.; LANDMAN, D.; QUALE, J.M.; MAYORGA, D.; ADEDEJI, A.; VANGALA, K.; RAVISHANKAR, J.; FLORES, C.; BROOKS, S. Citywide clonal outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* in Brooklyn, NY. The The preantibiotic era has returned. **Arch Intern Med.** 162:1515–1520. 2002.

LANOTTE, P.; WATT, S.; MEREGHETTI, L.; DARTIGUELONGUE, N.; RASTEGAR-LARI, A.; GOUDEAU, A.; QUENTIN, R. Genetic features *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients compared with those of isolates from other origins. **J Med Microbiol.** 53:73-81.2004

LIVERMORE, D. M. Mutiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? **Clinical Infectius Disease**. 34(1): 634-640, 2002

LOMHOLT, J.A.; POULSEN, K.; KILIAN, M. Epidemic population structure of *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for a clone that is pathogenic to the eye and that has a distinct combination of virulence factors. **Infect Immun.** 69:6284-6295.2001

MAGIORAKOS, A. P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R.B.; CARMELI, Y.; FALAGAS, M.E.; GISKE, C.G.; HARBARTH, S.; HINDLER, J.F.; KAHLMETER, G.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; PATERSON, D.L.; RICE, L.B.; STELLING, J.; STRUELEN, M.J.; VATOPOULOS, A.; WEBER, J.T.; MONNET, D.L. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clin Microbiol Infect.** 18(3): 268-281, 2012

MCGOWAN, J.E. Jr. Resistance in nonfermenting gram-negative bacteria: multidrug resistance to the maximum. **Am J Infect Control.** 34:(Suppl1):S29-S37. 2006

PÉREZ, A.C.; TORRES, R.F.; RAMOS, C.M.S.; NÚÑEZ, G.C. Ceftazidima en infusión continua en infecciones por *Pseudomona aeruginosa*. **AMC**, 16(4):408-418. 2012. ISSN 1025-0255.

PIRES, E.J.V.C.; SILVA JUNIOR, V.V.; LOPES, A.C.S.; VERAS, D.L.; LEITE, L.E.; MACIEL, M.A.M. Epidemiologic analysis of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from a university hospital. **Rev Bras Ter Intensiva.** 21:384-390. 2009

PRADO, F. M. L. N. **Estudo comparativo de fatores de virulência em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* produtores e não produtores de metalo-β-lactamase SPM-1.** 2009. 51 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

RADA, B., LETO, T.L. Pyocyanin effects on respiratory epithelium: relevance in *Pseudomonas aeruginosa* airway infections. **Immunol. Res.** 21, 73–81.2013.

SÁNCHEZ, P.; LINARES, J.F.; RUIZ-DÍEZ, B.; CAMPANARIO, E.; NAVAS, A. BAQUERO, F.; MARTÍNEZ, J.L. Fitness of *in vitro* selected *Pseudomonas aeruginosa* *nalB* and *nfxB* multidrug resistant mutants. **J Antimicrob Chemother.** 50:657-664.(2002).

SILVA, L. V.; GALDINO, A.C.M.; NUNES,A.P.F.; SANTOS,K.R.N.; MOREIRA, B.M.; CACCI, L.C.; SODRÉ, C.L.; ZICCARDI, M.; BRANQUINHA, M.H.; SANTOS, A.L.S. Virulence attributes in Brazilian clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **International Journal Of Medical Microbiology.** [s1], :990-1000. jul. 2014.

STOREY, D.G.; UJACK, E.E.; MITCHELL, I.; RABIN, H.R. Positive correlation of *algD* transcription to *lasB* and *lasA* transcription by populations of *Pseudomonas*

aeruginosa in the lungs of patients with cystic fibrosis. **Infect. Immun.** 65:4061–4067.1997

STOREY, D.G.; UJACK, E.E.; MITCHELL, I.; RABIN, H.R. *Pseudomonas aeruginosa lasR* transcription correlates with the transcription of *lasA*, *lasB*, and *toxA* in chronic lung infections associated with cystic fibrosis. **Infect. Immunol.** 66,2521–2528.1998.

TODAR, Kenneth. **Todar's online Textbook of bacteriology**. 2012. Disponível em: <<http://www.textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html>>. Acesso em: 2 jan. 2016.

UMADEVI, S.; JOSEPH, N.M.; KUMARI, K.; EASOW, J.M.; KUMAR, S.; STEPHEN, S.; SRIRANGARAJ, S.; RAJ, S. Detection of extended spectrum beta lactamases, ampc beta lac-tamases and metallobetalactamases in clinical isolates of ceftazidime resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Braz. J. Microbiol.** 42, 1284–1288.2011

WANG, H.; TU, F.; GUI, Z.; LU, X.; CHU, W. Antibiotic Resistance Profiles and Quorum Sensing-Dependent Virulence Factors in Clinical Isolates of *Pseudomonas Aeruginosa*. **Indian J Microbiol**, [s.l.], v. 53, n. 2, p.163-167, 9 fev. 2013. Springer Science + Business Media. DOI: 10.1007/s12088-013-0370-7.

WINN JR, W. C.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; KONEMAN, E.; PROCOP, G.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WOODS, G. Bacilos gram-negativos não fermentadores. Em **Koneman Diagnóstico Microbiológico, Texto e Atlas colorido**. 6^a Ed. Guanabara Kooggan, Brasil, p 302-386, 2008

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

- O perfil de resistência aos antimicrobianos entre os isolados MDS e MDR foi mais frequente entre as cefalosporinas, sendo a ceftazidima o fármaco com maior resistência.
- Isolados MDS apresentaram-se mais sensíveis aos carbapenêmicos e quinolonas e os MDR aos aminoglicosídeos.
- Uma grande diversidade genética foi observada, a presença de clones com perfis fenotípicos de virulência distintos evidencia a existência dos mecanismos de regulação da expressão dos genes.
- A relação entre fatores de virulência e padrões de resistência conforme os sítios de infecções foram observados para os isolados sensíveis a todos os antimicrobianos, onde todos eram de origem de secreção traqueal, e, para a produção de piocianina onde todos os isolados advinham de amostras de secreção traqueal e urina.
- Uma elevada frequência de produção de fatores de virulência pesquisados fenotipicamente e genotipicamente entre isolados MDS e MDR foi observada nos isolados clínicos de *P. aeruginosa*
- A tendência descrita por vários autores de que com o aumento da resistência aos antimicrobianos haveria uma diminuição dos fatores de resistência foi observada neste trabalho em relação aos genes *toxA* e *lasA* e na produção de lipase e piocianina.

PERSPECTIVAS

- Sequenciamento dos genes pesquisados
- Expressão genética dos genes pesquisados

REFERENCIAS

- BALASUBRAMANIAN, D. et al. A dynamic and intricate regulatory network determines *Pseudomonas aeruginosa* virulence. **NucleicAcids Res.** 41, 11–20. 2013.
- BECEIRO, A.; TOMÁS, M.; BOU, G. Antimicrobial Resistance and Virulence: a Successful or deleterious Association in the Bacterial World? **Clinical Microbiology Reviews**, V 26, N 2, p. 185–230, 2013
- BERT, F.F. Et al. Multi-resistant *Pseudomonas aeruginosa* outbreak associated with contaminated tap water in a neurosurgery intensive care unit. **J Hosp Infect** 39: 53-62. 1998.
- BRADBURY, R.S. et al. Virulence gene distribution in clinical, nosocomial and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **J Med Microbiol** 59: 881-890 Champion AC, 2010
- BRAUD, A. et al. The *Pseudomonas aeruginosa* pyochelin-iron uptake pathway and its metal specificity. **J Bacteriol.** V 191, p 3517-3525. 2009
- BREATHNACH AS. Et al. Multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* outbreaks in two hospitals: association with contaminated hospital wastewater systems. **J Hosp Infect** 82: 19-24.2012.
- CAIAZZA NC, SHANKS RM, O'TOOLE GA. Rhamnolipids modulate swarming motility patterns of *Pseudomonas aeruginosa*. **J Bacteriol** 187: 7351-7361. 2005
- CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L. Virulence factors and their mechanisms of action: the view from a damage response framework. **J Water Health**. V 7, p S2-S18. 2009
- Chun CK, et al. Inactivation of a *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal by human airway epithelia. **Proc Natl Acad Sci** 101: 3587-3590. 2004
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) **Performance Standards for Antiinfective Susceptibility Testing**; Twenty-second Informal Supplement.2014.
- DEPTUŁA, Aleksander; GOSPODAREK, Eugenia. Reduced expression of virulence factors in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. **Arch Microbiol**, [s.l.], v. 192, n. 1, p.79-84, 4 dez. 2009. Springer Science + Business Media. DOI: 10.1007/s00203-009-0528-1.

DUAN, H. et al. Source identification of airborne *Escherichia coli* of swine house surroundings using ERIC-PCR and REP-PCR. **Environ Res.** V109. P 511-517. 2009.

European Centre For Disease Prevention And Control (ECDC). **Antimicrobial resistance surveillance in Europe:** Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Disponível em: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/surveillance_reports/arhai/Pages/arhai.aspx>. Acesso em: 25 jan. 2016. 2013.

FOLKENSSON, A. et al. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. **Nat Rev Micro** 10: 841-851.2012.

FRANCO, M.R. et al. Metallo-beta-lactamases among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian university hospital. **Clinics** v.65, p.9825-9829, 2010

FREITAS, A. L.; BARTH, A.L. Typing of *Pseudomonas aeruginosa* from hospitalized patients: a comparison of susceptibility and biochemical profiles with genotype. **Braz J Med Biol Res.** V37. P.77-82. 2004

FRICKS-LIMA, J. et al. Differences in biofilm formation and antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from airways of mechanically ventilated patients and cystic fibrosis patients. **Int J Antimicrob Agents** 37: 309–315. 2011

FUENTEFRIA, D. B. et al. *Pseudomonas aeruginosa*: disseminação de resistência antimicrobiana em esgoto hospitalar e água superficial. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, V 41, N 5, P 470-473, 2008

FUNKEN, H. et al. The lipase *LipA* (PA2862) but not *LipC* (PA4813) from *Pseudomonas aeruginosa* influences regulation of pyoverdine production and expression of the sigma factor *PvdS*. **J Bacteriol** 193: 5858-5860, 2011

FUNKEN, H. et al. Specific association of lectin *LecB* with the surface of *Pseudomonas aeruginosa*: role of outer membrane protein *OprF*. **PLoS One**, V7, p 46857. 2012

GALES, A.C. et al. Comparação das atividades antimicrobianas de meropenem e imipenem/cilastina necessita testar rotineiramente a dois antimicrobianos? **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v38, n1, p 13-20, 2002

GYSSENS, I.C. Antibiotic policy. **Int J Antimicrob Agents**. V38S, p 11-20, 2011.

HABERMANN, E.; HARDT, K.L. A sensitive and specific plate test for the quantitation of phospholipases. **Anal Biochem** 50: 163-173.1972

HASSETT, D. J. et al. Response of *Pseudomonas aeruginosa* to pyocyanin: mechanisms of resistance, antioxidant defenses, and demonstration of a manganese-cofactored superoxide dismutase. **Infec. Immun.**, v.60, n.2, p.328-336, feb.1992.

HARMSEN M. et al. An update on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, tolerance and dispersal. **FEMS Immunol Med Microbiol** 59: 253-268. 2010

HIRSCH, E.B.; TAM, V.H. Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients outcomes. **Expert Rev Pharmacoecon Outcomes**. V 10, p 441-451. 2010.

HOTA S. et al. Outbreak of multi-resistant *Pseudomonas aeruginosa* colonization and infection secondary to imperfect intensive care unit room design. **Infect Control Hosp Epidemiol** 30: 25-33. 2009.

IVANOV, I. E. Relating the physical properties of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharides to virulence by atomic force microscopy. **J Bacteriol**, V193, p 1259-1266, 2011.

IVERSEN, B.G. et al. An outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infection caused by contaminated mouth swabs. **Clin Infect Dis** 44: 794-801.2007

JÁCOME, Paula Regina Luna de Araújo 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**, [s.l.], v. 6, n. 45, p.707-712, nov. 2012.

JAFFAR-BANDJEE, M. C. et al. Production of elastase, exotoxin A, and alkaline protease in sputa during pulmonary exacerbation of cystic fibrosis in patients chronically infect by *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Clin. Microbiol.**, v.33, n.4, p.924-929, apr.1995.

JAGGER, K. S.; BAHNER, D. R.; WARREN, R. L. Protease phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with cystic fibrosis. **J. Clin. Microbiol.**, v.17,n.1, p.55-59, jan.1983.

JANDA, J.M.; BOTTONE, E.J. *Pseudomonas aeruginosa* enzyme profiling: predictor of potential invasiveness and use as an epidemiological tool. **J Clin Microbiol.** v14. P. 55-60. 1981

JØRGENSEN, R. et al. The nature and character of the transition state for the ADP-ribosyltransferase reaction. **EMBO Rep**, V9, p 802-809. 2008.

KANJ, S. S; SEXTON, D. J. **UpToDate**: Epidemiology, microbiology, and pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infection. 2015. Disponível em: <www.uptodate.com/contents/epidemiologyand-pathogenesis-of-seudomonas-aeruginosa-infection>. Acesso em: 1 dez. 2015.

KERR, K.G.; SNELLING, A.M. *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. **J Hosp Infect** 73: 338-344.2009.

KIPNIS, E.; SAWA, T.; WIENER-KRONISH, J. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. **Med. et Maladies Infect.**, v.36, n.2, p.78-91, feb.2006.

KÖHLER, T. et al. Quorum sensing inhibition selects for virulence and cooperation in *Pseudomonas aeruginosa*. **PLoS Pathog.** V.6, 2010.

KÖNIG, B. et al. Role of *Pseudomonas aeruginosa* lipase in inflammatory mediator release from human inflammatory effector cells (platelets, granulocytes, and monocytes). **Infect Immun** 64: 3252-3258, 1996

KONG, F. et al. *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin inactivates lung epithelial vacuolar ATPase-dependent cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression and localization. **Cell Microbiol.** V8, p.1121-1133. 2006

KUNG, V. L.; OZER, E. A.; HAUSER, A. R.. The Accessory Genome of *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, [s.l.], v. 74, n. 4, p.621-641, 30 nov. 2010. American Society for Microbiology. DOI: 10.1128/mmbr.00027-10.

LANDMAN, D. et al. Citywide clonal outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* in Brooklyn, NY. The preantibiotic era has returned. **Arch Intern Med** V 162, p 1515–1520, 2002.

LANINI, S. et al. Molecular epidemiology of a *Pseudomonas aeruginosa* hospital outbreak driven by a contaminated disinfectant-soap dispenser. **PLoS One** 6:e17064.2011.

LANOTTE, P. et al. Genetic features *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients compared with those of isolates from other origins. **J Med Microbiol.** v 53. p73-81.2004

LISTER, P.D.; WOLTER, D.J.; HANSON, N.D. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. **Clin Microbiol Rev** 22: 582-610.2009.

LIVERMORE, D. M. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? **Clinical Infectious Disease**, V 34, N 1, P 634-640, 2002

LOMHOLT, J.A.; POULSEN, K.; KILIAN, M. Epidemic population structure of *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for a clone that is pathogenic to the eye and that has a distinct combination of virulence factors. **Infect Immun.** v 69. p 6284-6295.2001

MAGIORAKOS, A. P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clin Microbiol Infect.** V 18, N 3, P 268-281, 2012

MARRA, A. R. et al. Nosocomial Bloodstream Infections in Brazilian Hospitals: Analysis of 2,563 Cases from a Prospective Nationwide Surveillance Study. **Journal Of Clinical Microbiology**, [s.l.], v. 49, n. 5, p.1866-1871, 16 mar. 2011. American Society for Microbiology. DOI: 10.1128/jcm.00376-11.

MENA, K.D.; GERBA, C.P. Risk assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in water. **Rev Environ Contam Toxicol** 201: 71-115.2009

MESAROS, N. et al. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. **Clin Microbiol Infect.** v 13, p 560-578. 2007

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; PFALLER, M.A. **Microbiologia médica**. Tradução Carlos Pelleschi Taborda, et al. 6 ED, Rio De Janeiro, Elsevier, Cap 33, 2010;

NICAS, T. I.; IGLEWSKI, B. H. Isolation and characterization of transposon-induced mutants of *Pseudomonas aeruginosa* deficient in production of exoenzyme S. **Infect. Immun.**, v.45, n.2, p.470-474, aug.1984.

OLDAK, E.; TRAFNY, E. A. Secretion of proteases by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to ciprofloxacin. **Antimicrob Agents Chemother.** V 49, p 3281-3288. 2005.

PEDERSON, K. J. et al. Intracellular localization and processing of *Pseudomonas aeruginosa* ExoS in eukaryotic cells. **Mol. Microbiol.**, v.37, n.2, p.287-299, jul. 2000.

PETERMANN, S.R; DOETKOTT, C.; RUST, L. Elastase deficiency phenotype of *Pseudomonas aeruginosa* canine otitis externa isolates. **Clin Diag Lab Immunol.** V8, p 632-636. 2001.

PRADO, Fernanda Martini de Lorena Néia. **Estudo comparativo de fatores de virulência em isolados clínicos de Pseudomonas aeruginosa produtores e não produtores de metalo-β-lactamase SPM-1.** 2009. 51 f. Dissertação (Mestrado) -

Programa de Pós- Graduação em Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

READ, R.C.; ROBERTS, O.; MUNRO, N. Effect of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids on mucociliary transport and ciliary beating. **J Appl Physiol** 72: 2271-2277. 1992

ROSENTHAL, V.D., et al. International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) report, data summary of 36 countries, for 2004–2009. **Am. J. Infect. Control.** 40, 396–407. 2012.

SADER, H. S.; SILBERT, S. **Identificação de bacilos Gram-negativos não-fermentadores— Procedimentos de Rotina.** Programa de Excelência em microbiologia (PEM) nº 8, 2000.

SADER, H.S. et al. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Braz J Infect Dis.** V5. P.200-214. 2001

SADIKOT, R.T. et al. Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. **Am J Respir Crit Care Med.** V 171, p 1209-1223. 2005

SAHA, R. et al. Microbial siderophores: a mini review. **J Basic Microbiol.** V 52, p 1-15. 2012

SILVA, L. V. et al. Virulence attributes in Brazilian clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **International Journal Of Medical Microbiology.** [sl], p. 990-1000. jul. 2014.

SPIERS, A.J.; BUCKLING, A.; RAINY, P.B. The causes of *Pseudomonas* diversity. **Microbiol** 146: 2345-2350. 2000

STOVER, C. et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: na opportunistic pathogen. **Nature** V 406, p 959-964, 2000

STRATEVA, T.; MITOV, I. Contribution of an arsenal of virulence factors to pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Ann Microbiol** V 61, p 717-732. 2011

TATEDA K, et al. The *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer N-3-oxododecanoyl homoserine lactone accelerates apoptosis in macrophages and neutrophils. **Infec Immun** 71: 5785-5793 .2003.

TODAR, Kenneth. **Todar's online Textbook of bacteriology.** 2012. Disponível em: <<http://www.textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html>>. Acesso em: 2 jan. 2016.

TRABULSI, L. R.; LINCOLN, N. *Pseudomonas aeruginosa*. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5 ed., São Paulo: Atheneu. 2008, p. 369-381, 2008.

WANG, Huafu et al. Antibiotic Resistance Profiles and Quorum Sensing-Dependent Virulence Factors in Clinical Isolates of *Pseudomonas Aeruginosa*. **Indian J Microbiol**, [s.l.], v. 53, n. 2, p.163-167, 9 fev. 2013. Springer Science + Business Media. DOI: 10.1007/s12088-013-0370-7.

WINN JR, W. C. et al.. Bacilos gram-negativos não fermentadores. Em **Koneman Diagnóstico Microbiológico, Texto e Atlas colorido**. 6^a Ed. Guanabara Koogan, Brasil, p 302-386, 2008

WU, D.C., et al. *Pseudomonas infection* of the skin: clinical features, epidemiology and management. **Am J Clin Dermatol**. v. 12, n. 3, p.157-69, jun. 2011.

APÊNDICE

Title: Analysis phenotypic and genetic of virulence factors from isolated clinical of *Pseudomonas aeruginosa* multidrug-sensitive and multidrug-resistant

Title current: Analysis of virulence factors from *Pseudomonas aeruginosa*

Authors:

- 1 Stephanie Targino Silva - Programa de pós-graduação em medicina tropical - Departamento de medicina tropical - Universidade Federal de Pernambuco – Recife – Pernambuco – Brasil
- 2 Paula Regina Luna de Araújo Jácome - Programa de pós-graduação em medicina tropical - Departamento de medicina tropical - Universidade Federal de Pernambuco – Recife – Pernambuco – Brasil
- 3 Lílian Rodrigues Alves - Programa de pós-graduação em medicina tropical - Departamento de medicina tropical - Universidade Federal de Pernambuco – Recife – Pernambuco – Brasil
- 4 Jailton Lobo da Costa Lima - Programa de pós-graduação em medicina tropical - Departamento de medicina tropical - Universidade Federal de Pernambuco – Recife – Pernambuco – Brasil
- 6 Ana Catarina de Souza Lopes - Departamento de medicina tropical - Universidade Federal de Pernambuco – Recife – Pernambuco – Brasil
- 7 Maria Amélia Vieira Maciel - Departamento de medicina tropical - Universidade Federal de Pernambuco – Recife – Pernambuco – Brasil

Mailing address:

Stephanie Targino Silva
Rua 188, nº196, Caetés I, Abreu e Lima, Pernambuco, Brasil
53530-472
(81) 99443-4366
stephaniertargino@hotmail.com

Revista: A estruturação do artigo procura estar de acordo com os requisitos de publicação da **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, no formato artigo orginal

Abstract:

Pseudomonas aeruginosa has great genetic and metabolic plasticity enabling the development of multidrug-resistant strains (MDR) and the ability to express numerous virulence factors. This study aimed to correlate the pattern of antimicrobial susceptibility, production of virulence factors by phenotyping techniques (alkaline protease, hemolysin, phospholipase C, lipase and pigments) and genetic (*aprA*, *lasA*, *lasB*, *plcH* and *toxA* by PCR) and the genetic variability of 30 isolates from different sites of infection, 15 isolated multidrug-sensitive (MDS) and 15 MDR. 50% of the isolates were resistant to ceftazidime, cephalosporin antimicrobial class being more resistant isolates, all MDR being resistant. All isolates were susceptible to carbapenems MDS and quinolones. The diversity of susceptibility to antimicrobial classes suggests the existence of an association of several resistance mechanisms. 53% of the isolates came from tracheal aspirate samples. Regarding virulence factors MDR isolates showed lower production pyocyanin and lipase, and lower detection *toxA* and *lasA* genes, while MDS, showed lower production of hemolysin and phospholipase C. There was no difference between groups for the production of alkaline protease and *aprA* gene. All isolates showed pyocyanin production and *lasB* and *plcH* genes. 28 genetic profiles were found, 2 MDR clones, showing great diversity. Although some studies to report that the resistance mechanisms increase leads to reduction of virulence factors, the results obtained are observed this to produce alkaline protease, hemolysin, phospholipase C and *aprA* genes, suggesting that this correlation is multifactorial. However, the occurrence of these virulence factors in nearly all isolates studied suggests a high level of pathogenicity of isolates. We conclude that *P. aeruginosa* is a pathogen able to accumulate numerous virulence factors and often associated with multidrug resistance.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*; Virulence; Resistance.

Introduction:

In recent years the hospital infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* has been one of the main challenges for antimicrobial therapy, as commonly these bacilli has presented a broad spectrum of resistance to different classes of antimicrobial agents through the acquisition of several distinct mechanisms of resistance (FUENTEFRIA et al, 2008; TODAR, 2012). The combination of these resistance mechanisms originated multidrug-resistant isolates (MDR) (LIVERMORE, 2002; MAGIORAKOS et al, 2012), which added the lack of prospects for the introduction of new drugs that could be used against this pathogen caused the need investigations of its physiology, especially with regard to their many virulence factors that also contribute to define the potential pathogenicity of the infectious process, because it favors infection increasing tissue damage and protecting against *P. aeruginosa*.

aeruginosa recognition system immune and action of antimicrobials (Landman et al., 2002; TODAR, 2012).

Some studies have shown a high percentage of the presence of virulence factors in *P. aeruginosa* isolates. In a study conducted in China (. WANG et al, 2013) about 80% of the isolates showed production of elastase, pyocyanin and alkaline protease; in Brazil Jácome et al (2012) found similar results (34.4% mucous colonies; 70.5% producers pyocyanin; 93.4% producers gelatinase; 72.1% producers hemolysin) in relation to the resistance pattern of these isolates showed 54.1% MDR and 4.9 % PDR (pan-resistant). However, studies that correlate the production of virulence factors with the resistance profile to *P. aeruginosa* of antimicrobials are still rare.

A study conducted in Poland by Deptula and Gospodarek (2010) showed that MDR strains had lower lipase activity, elastase, phospholipase C and pyocyanin amount when compared with multidrug-sensitive strains (MDS), there were no significant differences in alkaline protease activity. Leading us to believe that the strains of MDR *P. aeruginosa* have decreased virulence compared with MDS strains. However, this study was limited to phenotypic research of these virulence factors, not confirmed the detection of genes responsible for the production thereof. It is also important to note that the study cited was performed with isolates from a single hospital in Poland, and taking into account the diversity of *P. aeruginosa* profiles found in different regions, it is necessary to expand local studies.

This study aims to describe the correlation between the presence of virulence factors through phenotypic tests (alkaline protease, lipase, letinase, hemolysin, pigments) and genetic (genes *aprA*, *lasA*, *lasB*, *plcH*, *plcN* and *toxA*) and standard antibiotic resistance (MDR and MDS), the genetic variability and origin of clinical isolates of *P. aeruginosa*.

Methodology

Bacterial isolates

For the study were analyzed 30 bacterial isolates from nosocomial strains of *P. aeruginosa*. These isolates were previously identified and tested for antimicrobial susceptibility, and were obtained from frozen stocks in 20% glycerol at -20 bacterioteca of Bacteriology Laboratory of Molecular Biology, Department of Tropical Medicine UFPE.

The isolates were selected randomly according to their susceptibility profiles and ranked according to the CLSI (2014) MDS (multidrug-sensitive) and MDR in a total of 15 isolates per group.

For the analysis of this study, the isolates were reactivated after inoculation in BHI (Brain Heart Infusion) and incubation for 24 to 48 hours at 37°C. After the growth of bacteria, isolates were grown on cetrimide agar medium, which is selective for the isolation of *P. aeruginosa*, and cultured in nutrient agar for storage thereof in stock.

Resistance pattern

For standardization of MSD and MDR resistance, standard confirmation susceptibility was performed antimicrobials by performing the disk diffusion test, according to the CLSI 2014.

The isolates were inoculated into BHI broth and incubated at 37 ° C until growth suspension similar to the tube 0.5 of the MacFarland scale. Then the suspension was seeded uniformly with the aid of a swab on Mueller Hinton agar medium, and antimicrobial discs dispensed on the surface. The plates were incubated at 37 ° C for 24 hours and after this period was performed reading the inhibition zones as recommended by CLSI, 2014.

The isolates were tested against the following antimicrobials according to their classes, cephalosporins: ceftazidime (CAZ), cefepime (CPM), cefotaxime (CTX), ceftriaxone (CRO); carbapenems: imipenem (IMP), meropenem (MPM); quinolone ciprofloxacin (CIP), norfloxacin (NOR), ofloxacin (OFX); Macrolides: Azithromycin (ATM); β -lactâmico + β -lactamase inhibitor: Ticarcillin + clavulanic acid (TAC); aminoglycosides: gentamicin (GEN) and amicacina (AMI).

Isolates that are resistant least three classes of antimicrobial agents have been classified as MDS, and those who were resistant to three or more classes classified as MDR, as Deptula and Gospodarek (2009).

Pigment Production

The evaluation of pigment production (pyocyanin, pioverdina, piorrubina and piomelanin) was performed by observing the corresponding color to each pigment presented in the culture medium cetrimide agar after 24 hours incubation at 37 ° C pioverdina production was confirmed by subjecting the cultures to UV light, they emit fluorescence (WINN et al., 2008).

Production of hemolysins

In the evaluation of hemolysin production, isolates were grown on blood agar and incubated for 24 hours at 37 ° C. hemolysin producers were considered isolates present translucent halo around the colonies, indicating hemolysis (WINN et al., 2008).

Alkaline protease Production

The alkaline protease producing research was carried out according to the method JAGGER; BAHNER; WARREN (1983). The isolates were inoculated skim milk agar (2%) and incubated at 37 ° C for 24 hours. The presence of a translucent halo around the colonies was interpreted as a positive result, and the absence of this halo as negative. The reference strain of *P. aeruginosa* ATCC15692 (PA 01) was used as positive control.

Production Phospholipase C

To determine the production of phospholipase C, it was used the method described by Hardt and Habermann (1972) with modifications. The isolates were inoculated in spots on plates containing TSA culture medium (Trypticase Soy Agar) supplemented with 10% (vol / vol) egg yolk solution tellurite. The plates were incubated in a greenhouse for 24 hours at 37 ° C. The production of a black precipitate on growth zone was considered positive for phospholipase C reduction,

those who were negative. The reference strain of *P. aeruginosa* ATCC15692 (PA 01) was used as positive control.

Production of Lipase

The lipase production was determined by the method described in Bottone and Janda (1981). Isolates were inoculated in TSA supplemented with 1% Tween 80, and incubated at 37 for 24 hours. The formation of a halo around the turbid zone of growth was considered positive for the production of lipases, and the absence of this negative. The reference strain of *P. aeruginosa* ATCC15692 (PA 01) was used as positive control.

Search clonally

The clonally was determined by ERIC-PCR, which were prepared in a volume of 25 μ l per tube containing: 100 ng of bacterial DNA, 10 pmol primers (ERIC-1: 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3'; ERIC-2: 5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAACG-3') (DUAN et al, 2009), 1x buffer, 200 uM DNTP, 1,5uL MgCl₂ and 1U Taq DNA polymerase.. The PCR parameters were: initial denaturation 95 ° C for 3min, followed by 30 cycles of 92 ° C for 1 min, annealing 36 ° C for 1 minute and extension at 72 ° C for 8 minutes, followed by 16 minutes at 72 ° C. The products were stained with the blue-green colorant and subjected to electrophoresis on 1.5% agarose gel, visualized in UV light and photodocumented. Data analysis and dendograms were made using Past.exc software.

Detection of virulence genes

The search for virulence genes encoding alkaline protease (Apra) F (5'-GTCCTATACCGTCGACCAGGC-3'), R (5'-GTCGCTACCCGAGCCGCCGAT-3'), 928 bp (Lomholt; POULSEN, KILIAN, 2001); The elastase (LASA) F (5'-CGCCATCCAACCTGATGCAAT-3'), R (5'-AGGCCGGGGTTGTACAACCGA-3'), 514 bp ((Lomholt; POULSEN, KILIAN, 2001)); elastase B (lasB) F (5'-GGAATGAACGAAGCGTTCTC-3'), R (5'-GGTCCAGTAGTAGCGGTTGG-3'), 300 bp (LANOTTE et al., 2004); hemolytic phospholipase C (PLCH) F (GAAGCCATGGGCTACTTCAA 5'-3'), R (5'-AGAGTGACGAGGAGCGGTAG-3'), 307 bp (LANOTTE et al., 2004) and exotoxin A (Toxa) F (5'-GGTAACCAGCTCAGGCCACAT -3'), R (5'-TGATGTCCAGGTATGCTTC-3'), 352 bp (LANOTTE et al., 2004) were detected by PCR (polymerase chain reaction).

The PCR reaction (polymerase chain reaction) was performed as described by Lanotte et al. (2004) and Lomholt, Poulsen and Kilian (2001) with modifications. Amplification reactions were performed in a final volume of 25 μ L containing 10 ng DNA, 0.2 mM dNTPs, 20 pmol of each primer, 2 mM MgCl₂ and 1.0 U Taq DNA polymerase in 5X reaction buffer. The DNA was amplified in a thermal cycler using the following protocol: initial denaturation 94C for 3 min, 30 cycles, denaturing at 94 ° C for 30 sec, annealing 55 for 1 min and 72 ° C extension for 1 min 30 s and final extension at 72 ° C for 5 min , each gene was amplified separately. The exception to the described protocol is the gene that APRA used an annealing temperature of 62 ° C. PCR products were detected after electrophoresis on 1% agarose gel, stained blue-green dye (0.05 g / ml) at 100 V for 30 min and detected by UV and transluminação photodocumented. The ATCC15692 strain of *P. aeruginosa* (PA 01) was used as a positive control.

Results

Resistance pattern

The susceptibility profile data are shown in Figure 1. The highest percentage resistor (considering resistant and intermediate results) are observed among cephalosporins, ceftazidime 50% (15/30), while norfloxacin, showed the lowest frequency isolates resistant 16.67% (5/30).

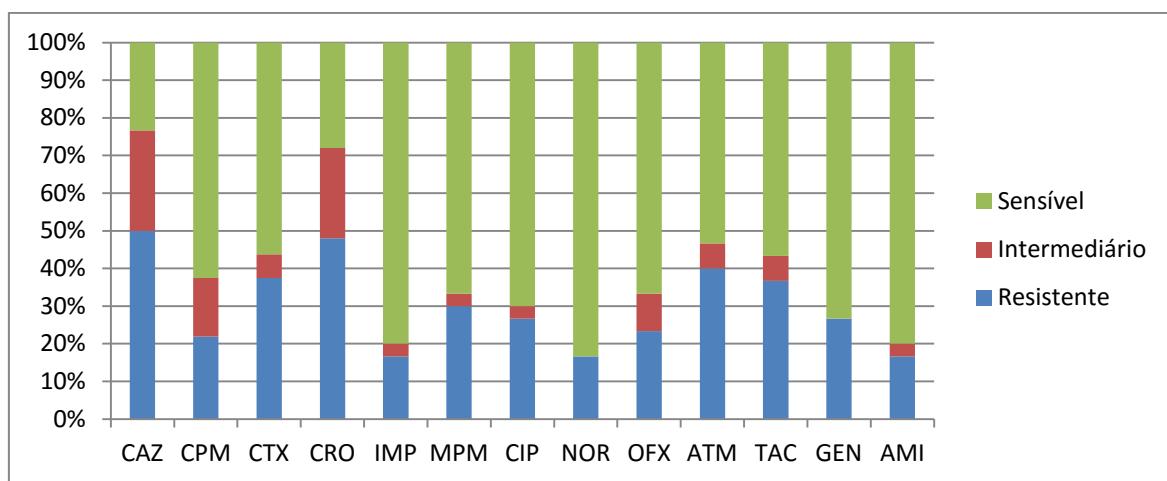


Figure 1. Profile susceptibility to clinical isolates of *P. aeruginosa* antimicrobial

Note: ceftazidima (CAZ), cefepime (CPM), cefotaxima (CTX), ceftriaxona (CRO); imipenem (IMP), meropenem (MPM); quinolonas: ciprofloxacina (CIP), norfloxacina (NOR), ofloxacim (OFX); azitromicina (ATM); Ticarcilina + ácido clavulâmico (TAC); gentamicina (GEN), amicacina (AMI).

The frequency of resistance to the classes of antimicrobials between MDS and MDR isolates is shown in Figure 2 and the frequency distribution of isolated as the number of classes which they were resistant is shown in Table 1. Note that among isolates there was a MDS greater frequency of isolates resistant to cephalosporins 66.67% (10/15) and all isolates tested were susceptible to carbapenems and quinolones, and among MDR isolates all isolates were resistant to cephalosporin class of, and a lower frequency of resistance to aminoglycosides 53.34% (8/15).

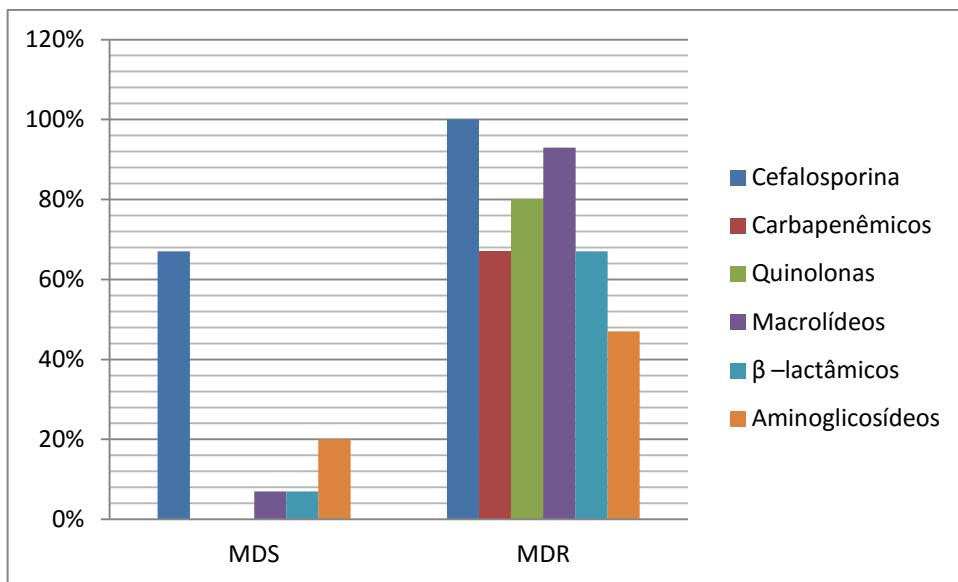


Figure 2. Resistance profile to antimicrobial classes between MDS and MDR isolates of *P. aeruginosa*

Table 1. Frequency of resistant isolates tested as the number of classes of antimicrobials

	N	%
MDS		
Sensitive to all classes	5	33,4
Resistant to 1 Class		
Cefalosporinas	5	33,4
Resistant to 2 Class		
Cefalosporinas + Aminoglicosídeos	3	20
Cefalosporinas + Macrolídeos	1	6,7
Cefalosporinas + β -lactâmicos	1	6,7
Total	5	100
MDR		
Resistant to 3 Class		
Cefalosporinas + β -lactâmicos + Macrolídeos	3	20
Cefalosporinas + Carbapenêmicos + Quinolonas	1	6,7
Resistant to 4 Class		
Cefalosporinas + Quinolonas + Macrolídeos + β -lactâmicos	2	13,4
Cefalosporinas + Carbapenemicos + Quinolonas + Macrolídeos	1	6,7
Resistant to 5 Class		
Cefalosporina+Carbapenemicos+Quinolona+Macrolídeo+ Aminoglicosídeos	3	20
Cefalosporinas + Carbapenemicos +Quinolonas + Macrolídeos + β -lactâmicos	1	6,7
Resistant to all classes	4	26,7
Total	5	100

Note: N = number of isolates

Origin of bacterial isolates

The Figure 3 shows the distribution of the origins of the samples of *P. aeruginosa* nosocomial. More than half of the isolates were derived from samples of tracheal secretions.

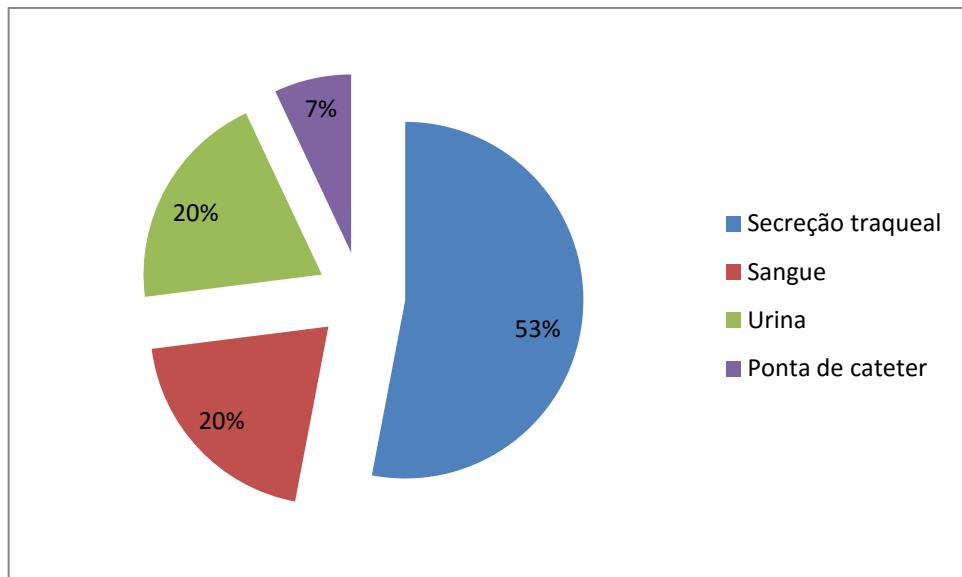


Figure 3. Distribution of nosocomial samples by *P. aeruginosa*

Virulence factors Phenotypic

It was searched 7 characteristics associated with virulence., with the results expressed in nominal shape was made (present / absent): pyocyanin, pioverdina, piomelanina, hemolysin protease, lipase and phospholipase C. The results are shown in Figure 4. Where can see that among isolates MDS was increased phospholipase production and between the MDR isolates there was a higher lipase production. For the production of proteases and pioverdina both groups had the same frequency, and for pioverdina all isolates studied had their production.

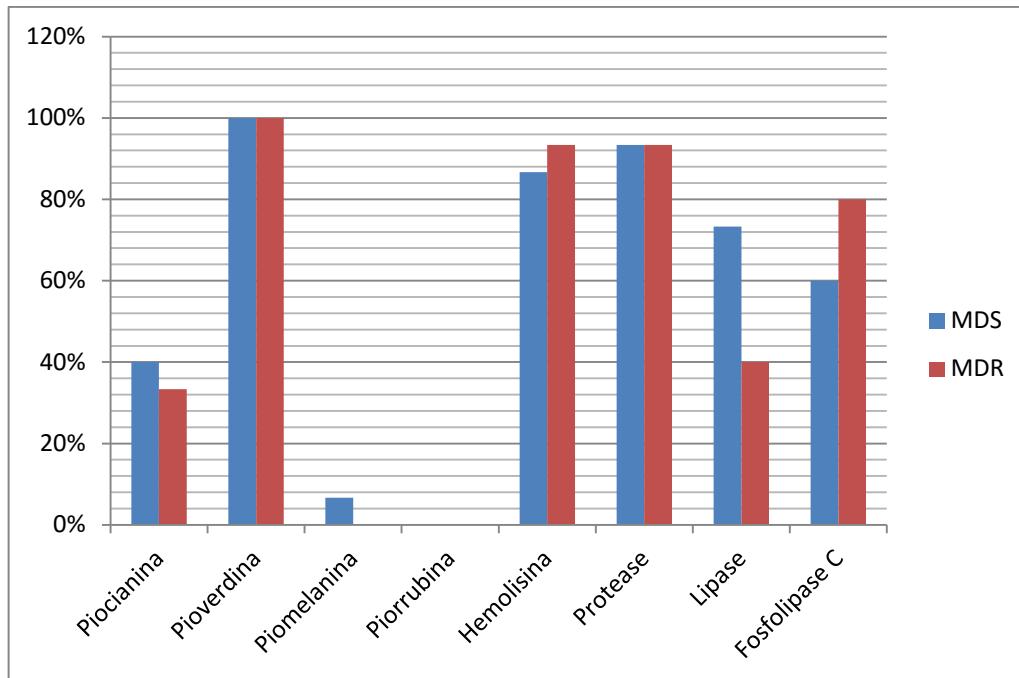


Figure 4: Frequency virulence phenotypes of clinical *P. aeruginosa* isolates of MDS according to the resistance pattern and MDR

Virulence genes

The results in Figure 5 show the frequency distribution of virulence genes according to the pattern of resistance. MDS isolates obtained a 20% lower rate of *toxA* and *lasA* genes, the MDR isolates. All isolates in the study had *lasB* and *plcH* genes.

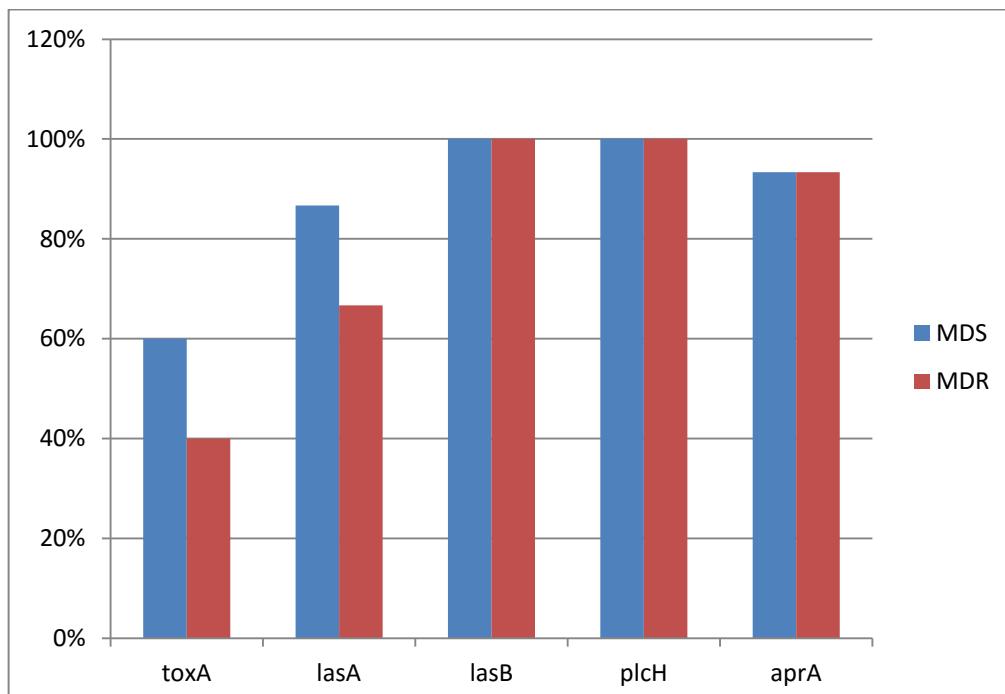


Figure 5: Frequency of virulence genes of *P. aeruginosa* clinical isolates according to the pattern of MDS and MDR resistant

Genetic relationship

Molecular typing of isolates revealed 28 genetic profiles, in the presence of 2 clones, Figure 6 is a representation of genetic similarity dendrogram among all *P. aeruginosa* isolates estimated by ERIC-PCR.

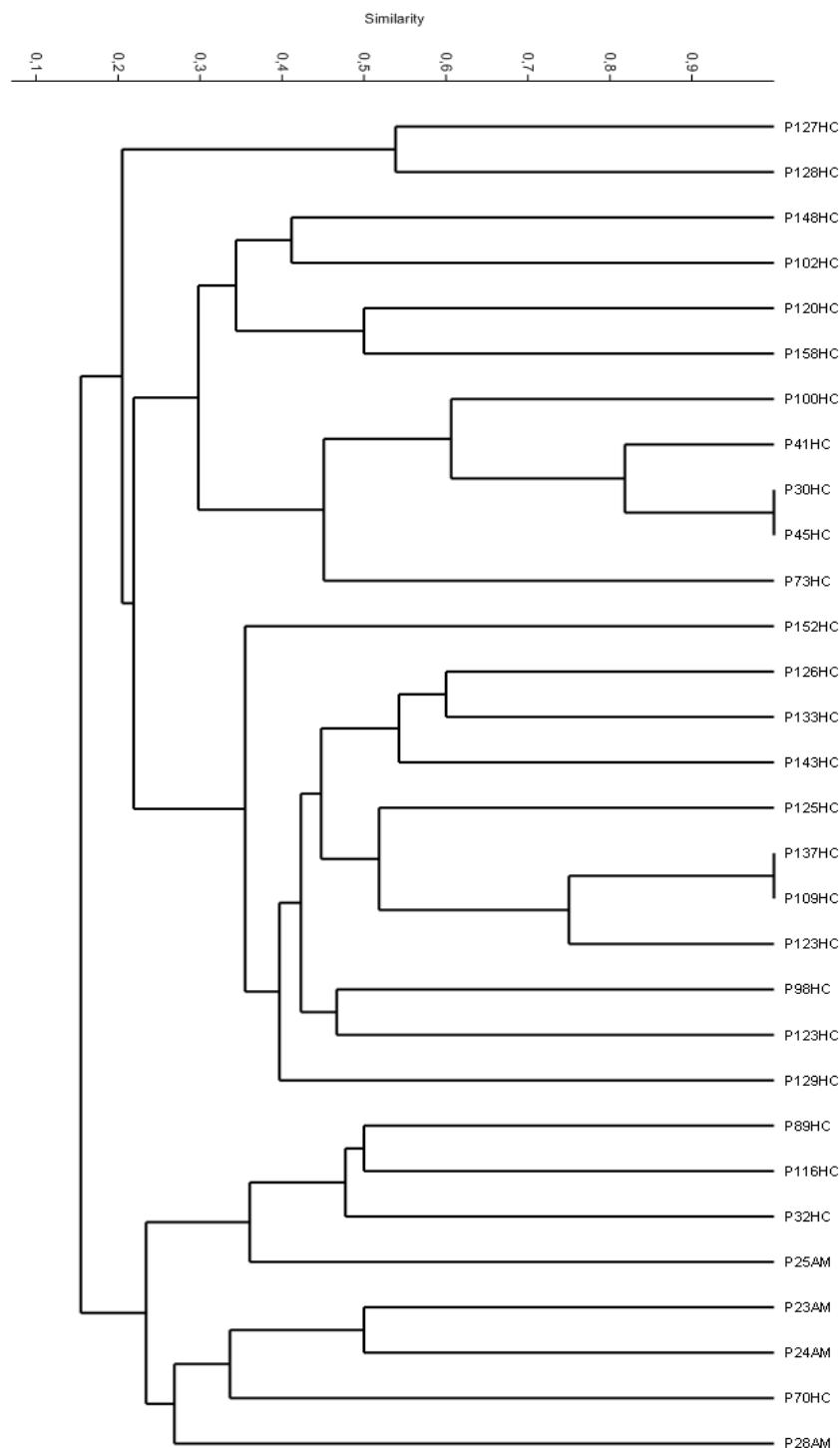


Figure 6: Dendrogram of genetic similarity between all isolates of *P. aeruginosa* estimated by ERIC-PCR

The Figures 7 and 8 show dendrograms of genetic similarity between MDS and MDR isolates, respectively, where you can view that the mentioned clones were found among MDR isolates.

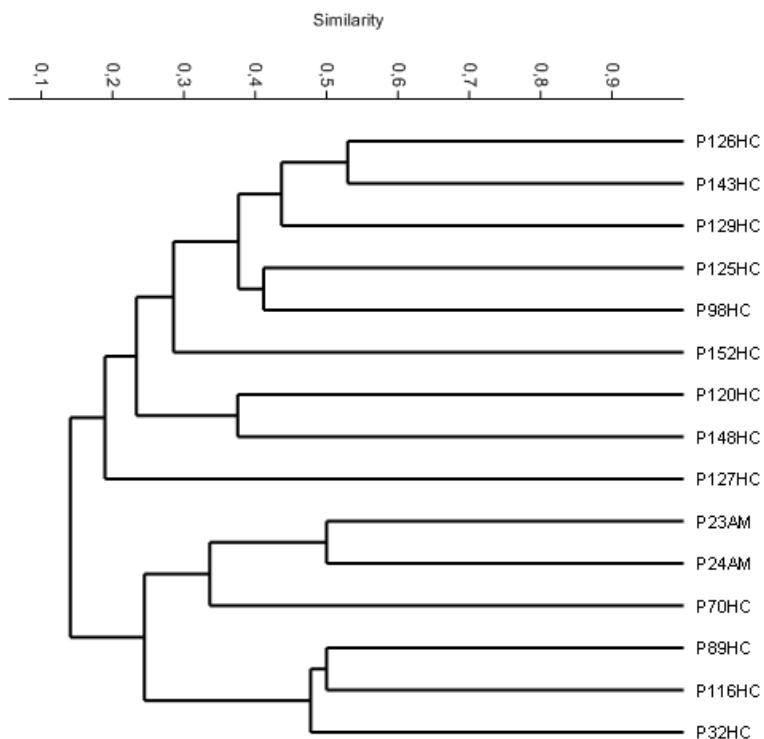


Figure 7: Dendrogram of genetic similarity between MDS isolates of *P. aeruginosa* estimated by ERIC-PCR

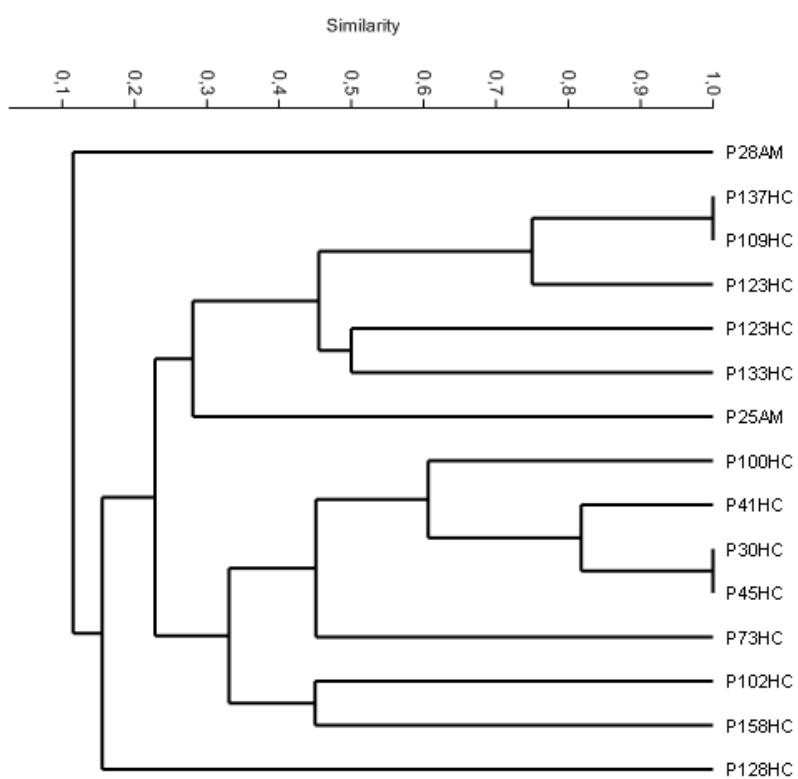


Figure 8: Dendrogram of genetic similarity between the MDR isolates of *P. aeruginosa* estimated by ERIC-PCR

Discussion

The results of antimicrobial susceptibility profile of clinical *P. aeruginosa* isolates of this study revealed that 50% of the isolates were resistant to ceftazidime. As a third generation cephalosporin, ceftazidime is used in treatment of severe infections such as sepsis and infections several caused by *P. aeruginosa* (Perez et al., 2012). In Brazil, Marra et al (2011) showed that among the isolates of *P. aeruginosa* 36.6% were resistant to ceftazidime (MARRA et al., 2011). Jacome et al (2012) reported 32.79% of ceftazidime resistance between Recife *P. aeruginosa* isolates. A prospective analysis study for a year performed in India found that 59% of *P. aeruginosa* isolated from various sites and different clinical samples were resistant to ceftazidime (UMADEVI et al., 2011).

In this study, among the isolates MDS there was a greater resistance to cephalosporins 66.67% (10/15), and all MDR isolates were resistant to the class of cephalosporins. The trend to lower sensitivity to cephalosporins has been reported in other regions thanks to the large-scale use of 3rd generation cephalosporins as almost unique therapeutic option for many years, for serious patients in emergencies and public hospitals wards (BAYRAM; BALCI 2006 ; McGowan 2006).

All MDS isolates tested were susceptible to carbapenems and quinolones. Jacome et al. (2012) described that in hospital isolates of *P. aeruginosa* when imipenem and meropenem drugs were more active compounds having 63.93% and 62.3% respectively susceptibility. And among isolates MDR and a lower frequency of resistance to aminoglycosides 53.34% (8/15), Pires et al. (2009), highlights the amikacin with 84.62% susceptibility. The great diversity presented in the susceptibility profile to antimicrobial classes suggests the existence of an association of several resistance mechanisms.

The isolates were sensitive to all classes of antimicrobials, they came from tracheal secretions of individuals in the ICU (intensive care units) and more than half of the isolates in the study had as source samples of tracheal aspirates, the result is not surprising, since that *P. aeruginosa* is one of the main microorganisms related infections associated with patients using endotracheal tubes (STRATEVA; MITOV, 2011).

In our study, 40% and 33.34% of MDS and MDR isolates, respectively, showed pyocyanin production, similar to the values found by Deptula and Gospodarek (2009), 33 (44.4%) MDS and 31 (41.3%) MDR. The overproduction of pyocyanin was detected in different airway secretions of patients colonized with *P. aeruginosa*, also associated with the severity of disease and decreased pulmonary function (RADA; LETO, 2013). Silva et al. (2014) found a higher production pyocyanin in isolates from urinary tract infections. Among our results, all isolates producers pyocyanin were derived from tracheal secretions and urine samples. In all analyzed isolates was observed production pioverdina and only one isolate showed piomelanina in Prado (2009) more than 74% of clinical strains exhibited pioverdina. Finlayson and Brown (2011) studied clinical isolates from various origins comparing the pigmented strains (pyocyanin production and / or pioverdina) with non-pigmented

strains, and found that pigmented isolates produce more elastase, lipase and protease than non-pigmented. In this study, all isolates had some type of pigment which can be associated with high frequency of other virulence factors.

A high production of hemolysin was detected in both MDS 86.67% and 93.34% in the MDR group. Three isolates had phenotypically negative for hemolysis, but were positive for the detection of *plcH* gene. The hemolytic phospholipase C and the rhamnolipids are hemolysin produced by *P. aeruginosa* could act synergistically in degradation of lipids and lecithins, so that potentiate for erythrocyte lysis (JÜRGENS; ÖZEL; TAKAISI-KIKUNI, 2002).

In this work 93.34% of isolates MDR and MDS showed protease production, as well as Deptula and Gospodarek (2009), there were no differences between the groups, the two isolates showed no proteolytic activity in the phenotypic test also showed negative results in detection the *aprA* gene, demonstrating correspondence

Deptula and Gospodarek (2009), demonstrated that culture supernatants of *P. aeruginosa* strains of MDR, there was a lower lipase activity was observed, similar event was also represented in the present study where 73.34% of MDS isolates showed lipolytic activity, while only 40% of MDR isolates were positive.

In this study 60% of the isolates MDS and 80% of MDR showed the activity of phospholipase C, in contrast to the results of Deptula and Gospodarek (2009), where MDR strains expressed a lower activity of phospholipase C in culture supernatants of the strains MDS. All isolates studied were positive for the detection of gene *plcH* equal to study Prado (2009), but nine isolates showed no phospholipase C production phenotypically, this could have occurred due to regulation of gene expression.

The detection results *lasA* and *lasB* of genes responsible for the expression of elastase A and B, respectively, demonstrated a lower frequency among isolates MDR 66.67% compared to 86.67% isolated MDS. Deptula and Gospodarek (2009) obtained a low elastase activity observed in the supernatants of MDR strains of *P. aeruginosa* when compared with MDS strains, *lasA* a low protease activity was also observed in MDR strains by Sanchez et al. (2002), which indicated that *P. aeruginosa* mutants that overexpress efflux pumps, produced lower amounts of elastase, but we need to remember that both *lasA* as *lasB* are regulated by quorum sensing, so its expression varies greatly according to the regulation.

Some articles have reported a relationship between *lasB* and *toxA* (structural gene for exotoxin A) of strains isolated from lungs of patients with cystic fibrosis, wherein the transcripts of these genes are regulated for more in bacterial cells (STOREY et al. , 1997,1998). In this work it was not possible to observe this aspect, however 60% of MDS isolates and 40% of MDR presented the *toxA* gene. In relation to isolates resistant to all six classes of antimicrobials were all tested negative for the detection of *toxA* gene.

In relation to genetic profile, a diversity was found in a total of 30 isolates was observed genetic profiles 28. The presence of clones occurred between the MDR isolates, and interestingly the P137HC P109HC clones showed conflicting results in the test of hemolysin production, and P30HC and P45HC clones showed conflicting results in the production of phospholipase C. These results probably were due to regulation of gene expression, since *P. aeruginosa* have quorum sensing systems is that they are responsible for regulating the expression of *plcH* (hemolytic

phospholipase C) raminolipídeos or other virulence factors (STRATEVA; Mitov, 2011), which would explain such phenotypic differences.

In this study the virulence factors of MDR isolates showed lower production pyocyanin and lipase, and lower detection *toxA* and *lasA* genes, while MDS, showed lower production of hemolysin and fosfoliase C. Although some studies report the acquisition of virulence factors by multiresistant bacteria during the infection process would lead to unnecessary expenditures metabolic microorganism (Sánchez et al., 2002), and that the mechanisms of resistance increase leads to reduction of virulence factors (Deptula; Gospodarek, 2009). The results showed this correlation only some of the factors studied, suggesting that this relationship is multifactorial. However, the presence of these virulence factors in nearly all isolates studied in the alert to the high level of pathogenicity of isolates derived from nosocomial infections. Demonstrating, so that *P. aeruginosa* is a pathogen capable of accumulating numerous virulence factors and in some cases associate with multidrug resistance, which hampers the treatment of infections caused by this microorganism.

References

- BAYRAM, A.; BALCI, I. Patterns of antimicrobial resistance in a surgical intensive care unit of a university hospital in Turkey. **BMC Infect Dis.** 6:155. 2006.
- CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**; Twenty-second Informal Supplement.2014.
- DEPTUŁA, Aleksander; GOSPODAREK, Eugenia. Reduced expression of virulence factors in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. **Arch Microbiol.** [s.l.], 192. (1):79-84, 4 dez. 2009. DOI: 10.1007/s00203-009-0528-1.
- DUAN, H.; CHAI, T.; LIU, J. Source identification of airborne *Escherichia coli* of swine house surroundings using ERICPCR and REP-PCR. **Environ Res.** 109:511–517. 2009.
- FINLAYSON, E.A.; BROWN, PD. Comparison of Antibiotic Resistance and Virulence Factors in Pigmented and Non-pigmented *Pseudomonas aeruginosa*. **West Indian Med J** 60 (1): 24.2011
- FUENTEFRIA, D. B.; FERREIRA, A.E.; GRAF, T.; CORÇÃO, G. *Pseudomonas aeruginosa*: disseminação de resistência antimicrobiana em esfente hospitalar e água superficial. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 41(5):470-473, 2008
- HABERMANN, E.; HARDT, K.L. A sensitive and specific plate test for the quantitation of phospholipases. **Anal Biochem** 50: 163-173.1972

KIPNIS, E.; SAWA, T.; WIENER-KRONISH, J. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. **Med. et Maladies Infect.**, 36(2):78-91, feb.2006.

JÁCOME, P. R. L. 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**, [s.l.], 6(45):707-712, nov. 2012.

JAFFAR-BANDJEE, M. C.; LAZDUNSKI, A.; BALLY, M.; CARRÈRE, J.; CHAZALETTE, J.P.; GALABERT, C. Production of elastase, exotoxin A, and alkaline protease in sputa during pulmonary exacerbation of cystic fibrosis in patients chronically infect by *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Clin. Microbiol.**, 33(4):924-929, apr.1995.

JAGGER, K. S.; BAHNER, D. R.; WARREN, R. L. Protease phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with cystic fibrosis. **J. Clin. Microbiol.** 17(1):55-59, jan.1983.

JÜRGENS, D.; ÖZEL, M.; TAKAISI-KIKUNI, N.B. Production and characterization of *Escherichia coli* enterohemolysin and its effects on the structure of erythrocyte membranes. **Cell Biol Int** 26: 175-186. 2002

JANDA, J.M.; BOTTONE, E.J. *Pseudomonas aeruginosa* enzyme profiling: predictor of potential invasiveness and use as an epidemiological tool. **J Clin Microbiol.** v14. P. 55-60. 1981

LANDMAN, D.; LANDMAN, D.; QUALE, J.M.; MAYORGA, D.; ADEDEJI, A.; VANGALA, K.; RAVISHANKAR, J.; FLORES, C.; BROOKS, S. Citywide clonal outbreak of multiresistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* in Brooklyn, NY. The The preantibiotic era has returned. **Arch Intern Med.** 162:1515–1520. 2002.

LANOTTE, P.; WATT, S.; MEREGHETTI, L.; DARTIGUELONGUE, N.; RASTEGAR-LARI, A.; GOUDEAU, A.; QUENTIN, R. Genetic features *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients compared with those of isolates from other origins. **J Med Microbiol.** 53:73-81.2004

LIVERMORE, D. M. Mutiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? **Clinical Infectius Disease**. 34(1): 634-640, 2002

LOMHOLT, J.A.; POULSEN, K.; KILIAN, M. Epidemic population structure of *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for a clone that is pathogenic to the eye and that has a distinct combination of virulence factors. **Infect Immun.** 69:6284-6295.2001

MAGIORAKOS, A. P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R.B.; CARMELI, Y.; FALAGAS, M.E.; GISKE, C.G.; HARBARTH, S.; HINDLER, J.F.; KAHLMETER, G.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; PATERSON, D.L.; RICE, L.B.; STELLING, J.; STRUELEN, M.J.; VATOPOULOS, A.; WEBER, J.T.; MONNET, D.L. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clin Microbiol Infect.** 18(3): 268-281, 2012

MCGOWAN, J.E. Jr. Resistance in nonfermenting gram-negative bacteria: multidrug resistance to the maximum. **Am J Infect Control.** 34:(Suppl1):S29-S37. 2006

PÉREZ, A.C.; TORRES, R.F.; RAMOS, C.M.S.; NÚÑEZ, G.C. Ceftazidima en infusión continua en infecciones por *Pseudomonas aeruginosa*. **AMC**, 16(4):408-418. 2012. ISSN 1025-0255.

PIRES, E.J.V.C.; SILVA JUNIOR, V.V.; LOPES, A.C.S.; VERAS, D.L.; LEITE, L.E.; MACIEL, M.A.M. Epidemiologic analysis of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from a university hospital. **Rev Bras Ter Intensiva.** 21:384-390. 2009

PRADO, F. M. L. N. **Estudo comparativo de fatores de virulência em isolados clínicos de Pseudomonas aeruginosa produtores e não produtores de metalo-β-lactamase SPM-1.** 2009. 51 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

RADA, B., LETO, T.L. Pyocyanin effects on respiratory epithelium: relevance in *Pseudomonas aeruginosa* airway infections. **Immunol. Res.** 21, 73–81.2013.

SÁNCHEZ, P.; LINARES, J.F.; RUIZ-DÍEZ, B.; CAMPANARIO, E.; NAVAS, A. BAQUERO, F.; MARTÍNEZ, J.L. Fitness of *in vitro* selected *Pseudomonas aeruginosa* *nalB* and *nfxB* multidrug resistant mutants. **J Antimicrob Chemother.** 50:657-664.(2002).

SILVA, L. V.; GALDINO, A.C.M.; NUNES,A.P.F.; SANTOS,K.R.N.; MOREIRA, B.M.; CACCI, L.C.; SODRÉ, C.L.; ZICCARDI, M.; BRANQUINHA, M.H.; SANTOS, A.L.S. Virulence attributes in Brazilian clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **International Journal Of Medical Microbiology.** [s1], :990-1000. jul. 2014.

STOREY, D.G.; UJACK, E.E.; MITCHELL, I.; RABIN, H.R. Positive correlation of *algD* transcription to *lasB* and *lasA* transcription by populations of *Pseudomonas aeruginosa* in the lungs of patients with cystic fibrosis. **Infect. Immun.** 65:4061–4067.1997

STOREY, D.G.; UJACK, E.E.; MITCHELL, I.; RABIN, H.R. *Pseudomonas aeruginosa lasR* transcription correlates with the transcription of *lasA*, *lasB*, and *toxA* in chronic lung infections associated with cystic fibrosis. **Infect. Immunol.** 66,2521–2528.1998.

TODAR, Kenneth. **Todar's online Textbook of bacteriology**. 2012. Disponível em: <<http://www.textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html>>. Acesso em: 2 jan. 2016.

UMADEVI, S.; JOSEPH, N.M.; KUMARI, K.; EASOW, J.M.; KUMAR, S.; STEPHEN, S.; SRIRANGARAJ, S.; RAJ, S. Detection of extended spectrum beta lactamases, ampc beta lac-tamases and metallobetalactamases in clinical isolates of ceftazidime resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Braz. J. Microbiol.** 42, 1284–1288.2011

WANG, H.; TU, F.; GUI, Z.; LU, X.; CHU, W. Antibiotic Resistance Profiles and Quorum Sensing-Dependent Virulence Factors in Clinical Isolates of *Pseudomonas Aeruginosa*. **Indian J Microbiol**, [s.l.], v. 53, n. 2, p.163-167, 9 fev. 2013. Springer Science + Business Media. DOI: 10.1007/s12088-013-0370-7.

WINN JR, W. C.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; KONEMAN, E.; PROCOP, G.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WOODS, G. Bacilos gram-negativos não fermentadores. Em **Koneman Diagnóstico Microbiológico, Texto e Atlas colorido**. 6^a Ed. Guanabara Kooggan, Brasil, p 302-386, 2008