



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

SIVONEIDE MARIA DA SILVA

**INVESTIGAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA E FATORES ASSOCIADOS A
FORMAÇÃO DE BIOFILME EM *Providencia stuartii***

Recife

2021

SIVONEIDE MARIA DA SILVA

**INVESTIGAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA E FATORES ASSOCIADOS A
FORMAÇÃO DE BIOFILME EM *Providencia stuartii***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia do Centro de Biociências, Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Bioquímica e Fisiologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Betânia Melo de Oliveira

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Tereza dos Santos Correia

Recife

2021

Catálogo na Fonte:
Elaine C Barroso CRB-4/1728

Silva, Sivoneide Maria da
Investigação de genes de resistência e fatores associados a formação de biofilme em
Providencia stuartii / Sivoneide Maria da Silva– 2021.

109 f.: il., fig., tab.

Orientadora: Maria Betânia Melo de Oliveira
Coorientadora: Maria Tereza dos Santos Correia

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de
Biotecnologias. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia,
Recife, 2021.

Inclui referências e anexos.

1. Bactéria 2. Infecção 3. Agentes antibacterianos I. Oliveira, Maria Betânia Melo de (orient.) II. Correia, Maria Tereza dos Santos (coorient.) III. Título

579.34

CDD (22.ed)

UFPE/CB-2021-380

SIVONEIDE MARIA DA SILVA

**INVESTIGAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA E FATORES ASSOCIADOS A
FORMAÇÃO DE BIOFILME DE *Providencia stuartii***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia do Centro de Biociências, Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Bioquímica e Fisiologia.

Aprovada em: 21/07/2021

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Maria Betânia Melo de Oliveira
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Prof. Dr. Thiago Henrique Napoleão
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof^a. Dr^a. Patrícia Maria Guedes Paiva
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof^a. Dr^a. Livia Caroline Alexandre de Araújo
Universidade Federal de Paraíba - UFPB

Prof^a. Dr^a. Hortência Farias de Andrade
Centro Universitário Tiradentes - UNIT

Dedico

Aos meus pais Sebastião e Maria Aparecida, que são o meu porto seguro.

À minha irmã Maricleide, que é a minha outra metade.

Ao meu sobrinho Álisson, por ser a nossa alegria diária.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida e cuidar zelosamente do meu caminhar. Sem Ele, a minha vida não teria o mesmo sentido.

Ao meu amado pai Sebastião, pelas orações na calmaria da noite intercedendo pelo meu futuro profissional e, de modo especial, por me ensinar os verdadeiros valores da vida.

À minha amada mãe Maria Aparecida, por acreditar em mim mais do que eu mesma e pelo colo único que me fortalece e tranquiliza.

À minha irmã Maricleide, por sonhar comigo os meus sonhos, me apoiar e confiar nas minhas decisões.

Ao meu sobrinho Álisson, por ser a representação mais doce e singela do amor e da alegria.

A todos os meus familiares, que torcem pelo meu sucesso profissional e me incentivam a seguir em frente.

Aos meus amigos novos e velhos, pelo carinho e as palavras de incentivo que me fazem acreditar que no final tudo dá certo.

Aos meus companheiros de laboratório e, muitos, da vida: Amanda, Vitória, Bárbara, Rafael, Tayane, Henrique, Fernanda, George, Marília, Ruth, Jonathan, Jaqueline e todos os outros que acompanharam minha trajetória e me ajudaram de algum modo a realizar este sonho.

Às professoras Betânia e Tereza e não apenas pela orientação, mas por serem fonte de inspiração, profissionalismo e confiança. Agradeço imensamente pelas palavras de encorajamento, que foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica, pelo carinho e por estarem sempre dispostos para auxiliar os alunos.

À Pós-Graduação pelos serviços prestados, e aos professores por auxiliar no aprimoramento dos nossos conhecimentos acadêmicos.

Por fim, agradeço a UFPE e ao Departamento de Bioquímica pelo espaço cedido e aos órgãos de fomento, especialmente a CAPES, pelo apoio financeiro.

“A felicidade e a saúde são incompatíveis com a ociosidade.”

(Aristóteles)

RESUMO

Providencia stuartii é uma espécie de *Enterobacteriaceae* que causa diferentes infecções devido, principalmente, a resistência intrínseca a antimicrobianos, capacidade para adquirir novos genes e formação de biofilme. Assim, este estudo investigou genes de resistência a antimicrobianos e fatores relacionados com a formação de biofilme de 28 isolados de *P. stuartii* obtidos de um hospital público de Recife, PE. Além disso, foram apresentadas neste estudo revisões do estado-da-arte sobre os principais mecanismos de resistência e virulência de patógenos humanos, sobretudo, *P. stuartii*. Inicialmente, foi confirmada a identidade taxonômica por espectrometria de massas e, foram realizados ensaios fenotípicos, seguidos de moleculares para investigar os genes de resistência *aac(6')-Ib-cr* e *bla_{KPC}*. Além disso, foram investigadas a diversidade genética dos isolados e os genes *fimH* e *mrkD* associados a formação de biofilme. Para confirmar a formação de biofilme, foram utilizados métodos de coloração, de microscopia e adesão a hidrocarboneto. Todos os isolados analisados, foram confirmados como *P. stuartii* e resistentes a fluoroquinolonas sendo a maioria resistentes a betalactâmicos. Este estudo demonstrou o primeiro relato no Brasil do gene *aac(6')-Ib-cr*, presente em 16 isolados e confirmou a disseminação do *bla_{KPC}* em 14, dos quais 11 apresentaram ambos os genes. Todos os isolados formaram biofilme e se mostraram, majoritariamente, hidrofílicos. Entretanto, não apresentaram os genes *fimH* e *mrkD*, os quais são associados a formação de biofilme em enterobactérias revelando, assim, particularidades sobre a patogenicidade de *P. stuartii*. Os dados obtidos, tanto os experimentais quanto os de revisões, indicam que as opções para o tratamento de infecções causadas por esta espécie estão ainda mais limitadas, devido ao seu potencial para aquisição de novos genes. Além disso, sugere que mecanismos ainda não conhecidos podem ser responsáveis pela formação de biofilme de *P. stuartii*. O presente estudo, reforça a necessidade de pesquisas adicionais para eventualmente prevenir infecções causadas por essa bactéria.

Palavras-chave: *aac(6')-Ib-cr*; Antimicrobianos; Infecções bacterianas; *Enterobacteriaceae*.

ABSTRACT

Providencia stuartii is a species of *Enterobacteriaceae* that causes caused mainly because of the intrinsic resistance to antimicrobials, able to acquire new genes and biofilm formation. Thus, this study investigated antimicrobial resistance genes and factors related to the biofilm formation of 28 *P. stuartii* grants obtained from a public hospital in Recife, PE. In addition, state-of-the-art reviews of the main mechanisms of resistance and virulence of human pathogens, especially *P. stuartii*, were presented in this study. Initially, the taxonomic identity was confirmed by mass spectrometry, and phenotypic, followed by molecular assays were performed to investigate the *aac(6')-Ib-cr* and *bla*_{KPC} resistance genes. Furthermore, genetic diversity was investigated, as well as the *fimH* and *mrkD* genes associated with biofilm formation. To confirm biofilm formation, coloring, microscopy and hydrocarbon adhesion methods were used. All isolates analyzed were confirmed as *P. stuartii* and resistant to fluoroquinolones, the majority being resistant to beta-lactams. This study demonstrated the first report in Brazil of the *aac(6')-Ib-cr* gene, present in 16 isolates and confirmed the spread of *bla*_{KPC} in 14, of which 11 had both genes. All isolates formed biofilm and were mostly hydrophilic. However, they did not show the *fimH* and *mrkD* genes, which are associated with biofilm formation in enterobacteria, thus revealing particularities about the pathogenicity of *P. stuartii*. The data obtained, both experimental and from reviews, indicate that the options for the treatment of infections caused by this species are even more limited, due to its potential for acquiring new genes. Furthermore, it suggests that mechanisms not yet known may be responsible for the formation of *P. stuartii* biofilm. The present study reinforces the need for additional research to eventually prevent infections caused by this bacteria.

Keywords: *aac(6')-Ib-cr*; Antimicrobials; Bacterial infections; *Enterobacteriaceae*.

LISTA DE FIGURAS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 -	Mecanismos de transferência horizontal de genes	19
Figura 2 -	Representação geral de mecanismos de resistência naturais a antimicrobianos	20
Figura 3 -	Estrutura química básica dos antimicrobianos betalactâmicos	22
Figura 4 -	Estágios da formação de biofilme bacteriano	25
Figura 5 -	Mecanismo proposto para a inibição da adesão bacteriana e formação de biofilme em superfícies revestidas	28
Figura 6 -	Representação de fimbrias e flagelos na superfície celular bacteriana	29
Figura 7-	Isolado de <i>Providencia stuartii</i> em meio BHI após 18 h de incubação.....	30

LISTA DE TABELAS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1 - Classificação molecular e agrupamento funcional de betalactamases	24
--	----

LISTA DE ABREVIACES

ACCs	Aminoglicosídeo Acetiltransferases
AHLs	N-acil-homoserinas lactonas
AMPc	3'-5'-adenosina-monofosfato-cíclico
ANTs	Aminoglicosídeo Nucleotidiltransferases
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância da Saúde
APHs	Aminoglicosídeo Fosfotransferases
EMAs	Enzimas Modificadoras de Aminoglicosídeos
EPS	Exopolissacarídeos
ESBLs	Betalactamases de Espectro Estendido
HSC	Hidrofobicidade da Superfície Celular
IH	Infeces Hospitalares
IRAS	Infeces Relacionadas  Assistência  Saúde
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase
MDR	Multi-Droga Resistente
NDM	New Delhi Metalobetalactamase
PCIH	Programas de Controle de Infec Hospitalar
QS	Quorum-Sensing
THG	Transferência Horizontal de Genes
UPEC	<i>Escherichia coli</i> uropatogênica
UTI	Unidades de Terapia Intensiva
VIM	Verona Imipenemase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
3.1 INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA À SAÚDE (IRAS)	17
3.2 RESISTÊNCIA BACTERIANA	18
3.3 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS BETALACTÂMICOS	21
3.4.1 Visão geral das betalactamases	23
3.4 FORMAÇÃO DE BIOFILME	25
3.4.1 Hidrofobicidade da Superfície Celular	26
3.4.2 Fímbrias adesinas.....	28
3.5 <i>Providencia stuartii</i>	30
3.6 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR.....	32
MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1 ESTRATÉGIAS DE PESQUISA E CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE.....	34
4.2 MATERIAL BIOLÓGICO E CONDIÇÕES DE CULTIVO	34
4.2 ESPECTOMETRIA DE MASSAS.....	35
4.3 PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE E CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)	35
4.4 EXTRAÇÃO DO DNA.....	36
4.5 IDENTIFICAÇÃO DE GENES RESISTÊNCIA	36
4.6 PURIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO.....	36
4.7 ERIC-PCR.....	37
4.8 FORMAÇÃO DE BIOFILME	37
4.9 MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA	38
4.10 TESTE DE ADESÃO MICROBIANA A HIDROCARBONETOS (MATH).....	38
4.11 IDENTIFICAÇÃO DE FÍMBRIAS ADESINAS	39
5 RESULTADOS.....	40
5.1 CAPÍTULO 1: ANTIBIÓTICOS AMINOGLICOSÍDEOS E ENZIMAS INATIVADORAS	40

5.2 ARTIGO 1: FIST REPORT OF THE <i>aac(6')-Ib-cr</i> GENE IN <i>Providencia stuartii</i> ISOLATES IN BRAZIL	52
5.3 ARTIGO 2: INVESTIGAÇÃO DE FATORES RELACIONADOS À FORMAÇÃO DE BIOFILME EM <i>Providencia stuartii</i>	58
5.4 ARTIGO 3: FATORES DE VIRULÊNCIA DE PATÓGENOS HUMANOS: UMA ABORDAGEM SEMPRE NECESSÁRIA.....	76
6 CONCLUSÃO	99
REFERÊNCIAS	100
ANEXO A: CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	109

1 INTRODUÇÃO

A família *Enterobacteriaceae* abrange microrganismos ubíquos e constituintes da microbiota intestinal da maioria dos animais superiores, incluindo seres humanos. Entretanto, essa família de bactérias possui uma variedade de espécies patogênicas conhecidas por causarem infecções hospitalares e comunitárias (ELSHAMY; ABOSHANAB, 2020). O gênero *Providencia*, um dos constituintes desta família, apresenta semelhanças fenotípicas com os gêneros *Proteus* e *Morganella*, entretanto, esses três gêneros representam agrupamentos taxonômicos distintos molecularmente (O'HARA; BRENNER; MILLER 2000). Atualmente, treze espécies compõem esse gênero: *P. rettgeri*, *P. stuartii*, *P. alcalifaciens*, *P. rustigianii*, *P. heimbachae*, *P. vermicola*, *P. sneebia*, *P. burhodogranariae*, *P. thailandensis*, *P. huaxiensis*, *P. siddallii*, *P. entomophila* sp. nov. e *P. thoriotolerans* sp. nov. (SHIMA et al., 2016; KSENTINI et al., 2019; SHUKLA et al., 2021).

Providencia é um gênero de bactérias Gram-negativas caracterizadas como anaeróbias facultativas, móveis e em forma de bacilos (SANTOS et al., 2015). Esses patógenos são amplamente associados aos casos de bacteriúria e bacteremia, especialmente, em pacientes hospitalizados submetidos a algum procedimento de cateterismo (WEI, 2015). Dentre suas espécies, *P. stuartii* é uma das mais virulentas e frequentemente associada a infecções urinárias. Além disso, pode causar uma variedade de infecções oportunistas como gastrointestinais, em queimaduras, lesões cutâneas ou de ferimentos cirúrgicos, pneumonia e bacteremia (SHIMA et al. 2016; BHARUCHA et al., 2017; PIRII et al., 2018; ABDALLAH et al., 2018; LIBERTUCCI et al., 2019).

A patogenicidade dessa bactéria deve-se, em grande parte, à resistência intrínseca conferida por genes que codificam enzimas do tipo AMPc (3' 5'-adenosina-monofosfato-cíclico), que possibilita resistência a diferentes classes de antimicrobianos como penicilinas, cefalosporinas (primeira e segunda geração) e inibidores de betalactamases. Essa bactéria possui também resistência natural a outros antimicrobianos como aminoglicosídeos (exceto amicacina), tigeciclina, colistina, polimixina B, entre outros (MAGIORAKOS et al., 2012; CLSI, 2018). Além da resistência intrínseca, essa espécie pode adquirir genes de resistência que codificam diferentes enzimas, a exemplo de carbapenemases do tipo KPC (*Klebsiella*

pneumoniae Carbapenemase), que inativam todos os antimicrobianos betalactâmicos, bem como Aminoglicosídeos Acetiltransferases (AACs), que modificam a estrutura dos aminoglicosídeos (AIRES et al., 2016; KRAUSE et al., 2016).

A resistência bacteriana às principais classes de antimicrobianos e ao sistema imunológico do hospedeiro dificulta o tratamento de infecções hospitalares, e esse quadro pode ser agravado pela formação de biofilmes em dispositivos médicos, bem como em tecidos ou células. Biofilmes são estruturas exopolissacarídicas que conferem proteção a vários fatores externos e possibilitam a troca de material genético através de elementos genéticos móveis (GALANTE et al., 2015). Como a maioria das bactérias vivem aderidas em superfícies, alguns fatores físico-químicos e genéticos contribuem para a adesão bacteriana, destacando-se as forças de atração eletrostática e hidrofóbica, flagelos, fímbrias adesinas e polímeros (FLEMMING et al., 2016).

Uma vez que a resistência bacteriana varia com o tempo e se diferencia de um local para outro, os estudos epidemiológicos contínuos são ferramentas essenciais para manter atualizado o perfil de resistência de bactérias multirresistentes e contribuir com os tratamentos clínicos. Nesse contexto, esse estudo se propôs a abordar a resistência e os principais fatores de virulência de bactérias patogênicas, através de revisão da literatura e investigação da ocorrência de genes de resistência a betalactâmicos e aminoglicosídeos em isolados clínicos de *P. stuartii*, bem como a sua capacidade de formar biofilme e os possíveis fatores associados a esse mecanismo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar genes de resistência a antimicrobianos e genes associados a formação de biofilme em isolados clínicos de *P. stuartii*, bem como abordar através de revisões da literatura a resistência aos aminoglicosídeos e os principais fatores de virulência bacterianos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar os isolados de *P. stuartii* quanto a resistência com base no perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos e investigar a ocorrência dos genes *aac(6')-Ib-cr* e *bla_{KPC}*;
- Analisar a diversidade genética dos isolados entre os diferentes sítios de infecção e setores hospitalares;
- Comparar o perfil fenotípico de resistência aos antimicrobianos com o perfil genotípico obtido;
- Verificar a capacidade formação de biofilme pelo método bioquímico tradicional e por microscopia de fluorescência;
- Determinar o perfil de Hidrofobicidade da Superfície Celular (HSC) dos isolados e correlacionar com a capacidade de formação de biofilme;
- Investigar a ocorrência de genes codificadores de fímbrias adesinas e analisar as possíveis relações com a formação de biofilme;
- Realizar uma revisão do estado-da-arte sobre os aminoglicosídeos e as enzimas que modificam a estrutura desses antimicrobianos, bem como sobre os fatores de virulência bacterianos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA À SAÚDE (IRAS)

As Infecções Hospitalares (IH) são consideradas um problema relevante de saúde pública, uma vez que podem aumentar as taxas de morbidade e mortalidade. Além disso, podem aumentar o tempo de internação dos pacientes e, conseqüentemente, elevar os custos de procedimentos para fins diagnósticos e terapêuticos (MENEGUETI et al, 2015; PERNA et al., 2015). A IH é caracterizada como toda infecção adquirida após a entrada do paciente no ambiente hospitalar e que se manifesta durante o período de internação ou mesmo quando o paciente já foi liberado (LIMA et al., 2015).

Ultimamente, em substituição ao termo “Infecções Hospitalares”, tem sido mais utilizada a expressão “Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde” (IRAS). Entretanto, para fins de estudos relacionados ao ambiente hospitalar o termo IH ainda é empregado, porém com uma frequência menor (MENEZES et al., 2016). As IRAS abrangem tanto as infecções adquiridas em unidades hospitalares e ambulatoriais quanto na comunidade. Com o passar do tempo, vem sendo consideradas um dos problemas de saúde mais recorrentes mundialmente (WHO, 2017; ANVISA, 2017). Na maioria dos casos, são relacionadas à frequente realização de procedimentos invasivos nos pacientes como, por exemplo, a inserção de cateteres, sondas, entre outros. Os longos períodos de internação contribuem para vulnerabilidade dos pacientes a infecções, especialmente por causa do uso inadequado de antimicrobianos no ambiente hospitalar, o que contribui para o desenvolvimento e disseminação de microrganismos multirresistentes (GOMES; MORAIS, 2018).

Dentre os setores hospitalares, as Unidades de Terapia Intensiva (UTI) se destacam na incidência de pacientes que contraem IRAS, apresentando o maior percentual de surtos epidêmicos (OLIVEIRA et al., 2017). Esses setores são destinados aos pacientes em condições graves, que necessitam de monitoramento contínuo de suas funções vitais básicas. No entanto, são considerados setores críticos, tanto pela instabilidade funcional dos pacientes quanto pelo risco elevado destes adquirirem infecções uma vez que, em muitos casos, fazem uso de imunossupressores (PEREIRA et al., 2016; SOUSA; OLIVEIRA; MOURA, 2016).

Quanto às instituições de saúde brasileiras, os estudos epidemiológicos mostram um aumento crescente de infecções adquiridas, bem como do custo de tratamento dos pacientes infectados. As unidades públicas de saúde são as mais preocupantes, exibindo as maiores taxas de prevalência de IRAS (SOUZA; OLIVEIRA; MOURA, 2016; VÊLOSO; CAMPELO, 2017). Apesar dos avanços em relação ao controle de infecções, na prática cotidiana, várias dificuldades são presenciadas. Muitas unidades hospitalares apresentam uma infraestrutura precária e atendem milhares de pacientes fragilizados, os quais são mais susceptíveis às infecções. Além disso, os profissionais dentro das instituições resistem às mudanças de hábitos, o que dificulta o controle de IRAS (BUENOS; PIO; CHIRELLI, 2019; ALMEIDA et al., 2019).

Giroti et al. (2018), ao analisarem a estrutura e o processo dos Programas de Controle de Infecção Hospitalar (PCIH), observaram a necessidade de as instituições de saúde acompanharem continuamente a efetividade desses programas e fazer os reajustes necessários, uma vez que são essenciais para a segurança dos pacientes. Conforme orienta a Agência Nacional de Vigilância da Saúde - ANVISA (2017), é fundamental o diálogo entre as equipes para gerar medidas de controle efetivas e estimular os profissionais de saúde na mudança de hábitos.

3.2 RESISTÊNCIA BACTERIANA

Atualmente, a resistência bacteriana aos antimicrobianos é considerada um problema grave de saúde pública em todo o mundo. Naturalmente, os microrganismos necessitam desenvolver estratégias de sobrevivência em ambientes desfavoráveis para sua permanência e propagação. A resistência bacteriana a diferentes condições já existe antes mesmo da comercialização desses fármacos pela humanidade. A partir da utilização e distribuição de antimicrobianos mundialmente, foi observado um crescimento significativo de resistência bacteriana (ALÓS, 2015).

Esta pode ocorrer espontaneamente por mutações pontuais, deleções ou inserções no material genético devido à exposição da bactéria a diferentes condições mutagênicas como, por exemplo, as radiações ionizantes. Porém, também pode ser transmitida de uma bactéria Multi-Droga Resistente (MDR) para outras sensíveis através de elementos genéticos móveis configurando, assim, uma resistência adquirida (ABDALLAH; BALSHI, 2018). Dentre

os fatores que favorecem a distribuição global desses microrganismos, destaca-se a capacidade de Transferência Horizontal de Genes (THG), que possibilita a recombinação de características e permite a adaptação por um longo período de tempo (CROUCHER et al., 2016). Os antimicrobianos são a principal fonte de mudanças nos mais diversos ambientes e desencadeiam alguns de mecanismos de resistência incluindo o THG, que pode ocorrer por conjugação, transdução e recombinação (Figura 1). O crescimento da resistência aos antimicrobianos é frequentemente associado à alta capacidade adaptativa e evolutiva de microrganismos, sendo as bactérias mais susceptíveis às mudanças e aquisição de genes (ROJAS; ULATE, 2016; VON WINTERSDORFF et al., 2016).

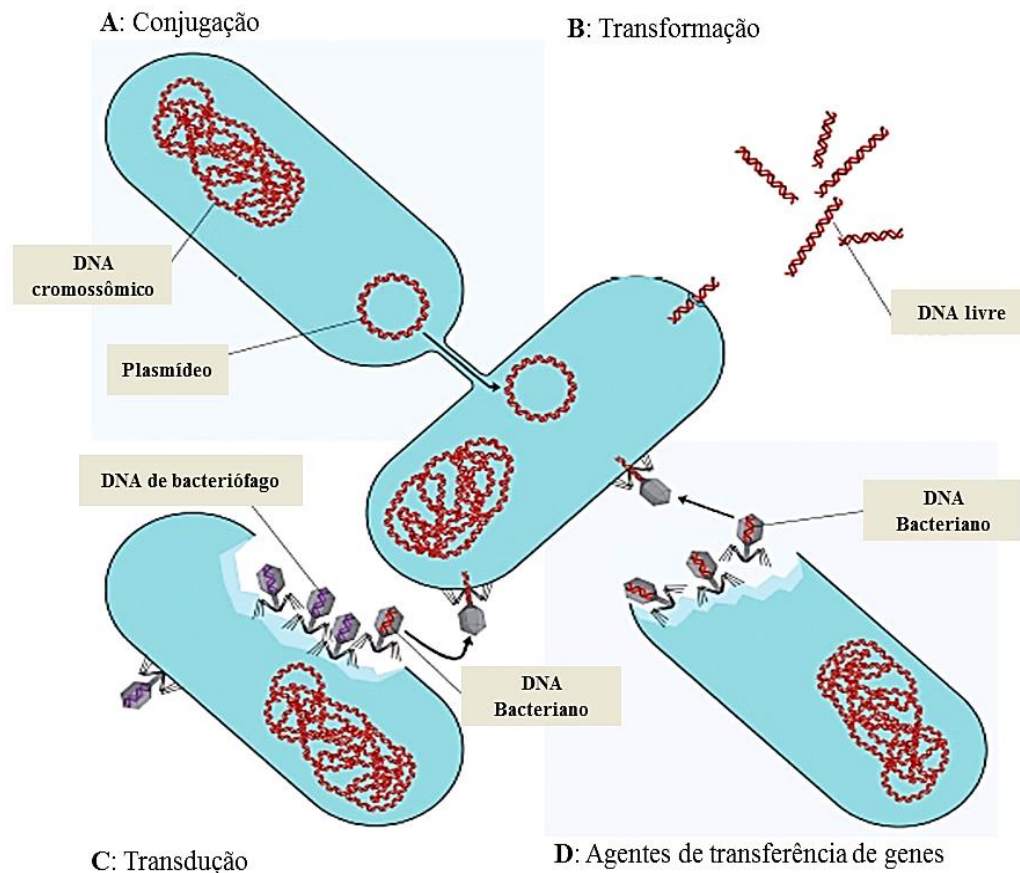


Figura 1: Mecanismos de transferência horizontal de genes. **A:** A conjugação é um processo no qual o DNA é transferido da célula doadora para a célula receptora via pili da superfície celular. **B:** A transformação é a absorção, integração e expressão funcional de fragmentos nus de DNA extracelular. **C:** Na transdução, bacteriófagos podem transferir DNA bacteriano de uma célula doadora previamente infectada para uma célula receptora. **D:** Agentes de transferência de genes são partículas do tipo bacteriófago que carregam pedaços aleatórios do genoma da célula produtora. Adaptado de Von Wintersdorff et al., 2016.

A diversidade de genes de resistência identificados em bactérias patogênicas é apontada como uma das principais causas do aumento crescente da resistência aos antimicrobianos. Entretanto, a prevalência da resistência bacteriana tanto a nível regional quanto em escala mundial é atribuída, em grande parte, aos mecanismos de disseminação de bactérias virulentas que são capazes de colonizar e se estabelecer em ambientes variados. Além disso, a pressão de seleção direta ou indireta pelo uso inadequado desses medicamentos é outro fator a ser considerado (ROJAS; ULATE, 2016).

De modo geral, a produção de enzimas decorrentes de genes plasmidiais ou cromossômicos que inativam antimicrobianos constitui o principal mecanismo de resistência bacteriano. No entanto, outros mecanismos de resistência como uma membrana externa de baixa permeabilidade, que limita a ultrapassagem de antimicrobianos; bombas de efluxo, que jogam a droga para o meio extracelular; e modificações em proteínas alvo do antimicrobiano, também representam mecanismos de defesa desses seres vivos (Figura 2). As bactérias patogênicas causam maior preocupação, uma vez que podem apresentar mecanismos naturais de resistência, além da capacidade de aquisição de novos genes (BLAIR et al., 2015; NOGUEIRA et al., 2016; NODARI; BARTH, 2016).

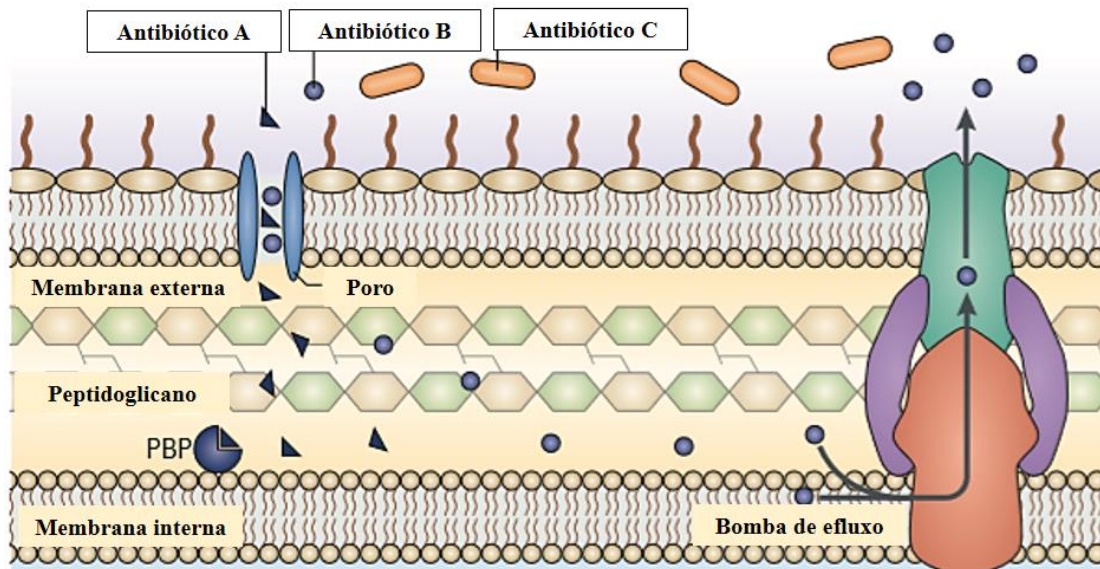


Figura 2: Representação geral de mecanismos naturais de resistência a antimicrobianos. O antibiótico A pode entrar na célula por meio de uma proteína de membrana, atingir seu alvo inibir a síntese de peptidoglicano. O antibiótico B também pode entrar na célula através de uma porina, mas ao contrário do antibiótico A, é eficientemente removido por efluxo. O antibiótico C não pode atravessar a membrana externa e, portanto, é incapaz de acessar o PBP alvo. Adaptado de Blair et al. (2015).

A descoberta dos antimicrobianos foi um marco na história da Medicina e representou uma das intervenções terapêuticas mais importantes para o controle de doenças transmissíveis. Entretanto, nas últimas décadas, a obtenção de novos princípios ativos eficazes e capazes de atingir alvos bacterianos distintos foi sendo significativamente reduzida, de modo que novas abordagens terapêuticas são imprescindíveis para minimizar os prejuízos gerados à saúde humana (NOGUEIRA et al., 2016; SANTOS et al., 2018).

A resistência bacteriana tem limitado cada vez mais a disponibilidade das opções de tratamento. Atualmente, os antimicrobianos rotineiramente utilizados na prática clínica como, por exemplo, os betalactâmicos e aminoglicosídeos, já não apresentam a mesma efetividade sobre muitos patógenos, incluindo os da família Enterobacteriaceae (NODARI; BARTH, 2016; MARTINS et al; 2018).

Para ampliar ainda mais este importante tópico sobre o estado-da-arte relacionado à resistência bacteriana, foi elaborado um capítulo de livro que contempla o tema aminoglicosídeos e enzimas inativadoras, o qual está apresentado no tópico resultados.

3.3 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS BETALACTÂMICOS

Os antimicrobianos betalactâmicos são assim designados devido à presença do anel betalactâmico em sua estrutura basal. Além dessa característica, compartilham o mecanismo de ação que é baseado na inibição da síntese da parede celular bacteriana (WILLIAN; PETRI, 2012). Normalmente, são incluídas no grupo dos betalactâmicos quatro classes de antimicrobianos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos. No entanto, os inibidores de betalactamases também são considerados betalactâmicos, uma vez que possuem a estrutura básica desse grupo de medicamentos (Figura 3). Apesar de todos os antimicrobianos que constituem essas classes possuírem o anel betalactâmico em comum, as cadeias laterais não são iguais e os diferenciam quanto as suas características e espectros de ação (SUAREZ; GUDIOL, 2009; NORDMANN; DORTET; POIREL, 2012).

O primeiro betalactâmico foi descoberto por Alexander Fleming em 1928 e recebeu o nome de penicilina por ser sintetizado pelo fungo *Penicillium notatum*. Todos os fármacos que pertencem a essa classe apresentam em sua estrutura básica um anel de tiazolidina ligado ao anel betalactâmico que, por sua vez, se liga a uma cadeia lateral (Figura 3). As modificações

estruturais foram sendo efetuadas justamente nas cadeias laterais, resultando em vários tipos de penicilinas com atividades farmacológicas diferenciadas (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010; WILLIAN; PETRI, 2012). O amplo uso desses antimicrobianos como as penicilinas G e V, ativas contra bactérias Gram-positivas, resultou no surgimento de enzimas (penicilinases e acilases), que inativam penicilinas. A ampicilina e a amoxicilina, por exemplo, são mais indicadas para bactérias Gram-negativas, entretanto, as penicilinas não apresentam mais efetividade sobre vários patógenos (FERNANDES; AMADOR; PRUDÊNCIO, 2013).

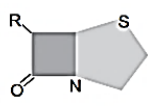
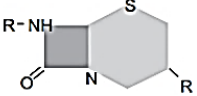
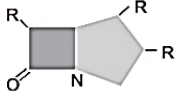
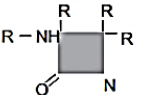
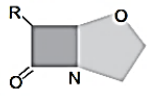
Anel betalactâmico	Anel secundário	Classe
	anel tiazolidina	Penicilina
	anel dihidrotiacínico	Cefalosporina
	anel pirrolínico	Carbapenêmico
	-	Monobactâmico
	anel oxazolidina	Inibidor de betalactamase

Figura 3: Estrutura química básica dos antimicrobianos betalactâmicos. Adaptado de Suarez e Gudiol (2009).

As cefalosporinas são originadas do fungo *Cephalosporium* sp., mas as de importância clínica são semissintéticas e apresentam o anel betalactâmico ligado a um anel dihidrotiacínico (Figura 3). Diferente das penicilinas, esses agentes apresentam dois radicais principais (R1 e R2), que permitem a síntese de uma variedade de moléculas agrupadas em cinco gerações, com diferentes espectros de ação (MADIGAN et al., 2016). A primeira geração apresenta menor atividade em comparação a algumas penicilinas, porém possui boa atividade sobre alguns cocos Gram-positivos. A segunda geração, apresenta melhor atividade sobre bactérias Gram-negativas, entretanto, é menos efetiva que os fármacos da terceira geração, que inclui os de amplo espectro como, por exemplo, cefotaxima e ceftazidima. As cefalosporinas de quarta geração como a cefepima, são comparadas às de terceira geração, porém, são menos suscetíveis

à inativação de algumas betalactamases. Já a quinta geração, é mais indicada para bactérias resistentes a meticilina (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010; WILLIAN; PETRI, 2012).

Os carbapenêmicos são representados por quatro antimicrobianos: imipenem, meropenem, ertapenem e doripenem. Esses fármacos possuem o anel betalactâmico acoplado a uma estrutura anular de cinco elementos, que se diferenciam das penicilinas por serem insaturados e pela ausência do átomo de enxofre (Figura 3). Essa classe de antimicrobianos apresenta espectro de ação mais amplo em relação a todas as outras do grupo betalactâmico, exibindo atividade sobre um arsenal maior de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas multirresistentes e produtoras de betalactamases (WILLIAN; PETRI, 2012; NORDMANN; DORTET; POIREL, 2012).

A classe dos monobactâmicos apresenta o aztreonam como único representante. Esse fármaco é indicado para o tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-negativas, como *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, as espécies da família *Enterobacteriaceae*, entre outras. Esse antimicrobiano apresenta uma considerável estabilidade frente a ação de muitas betalactamases (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

Os inibidores de betalactamases, como ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam, são moléculas conjugadas com penicilinas que potencializam o efeito desse antimicrobianos sobre algumas betalactamases. Comumente, o ácido clavulânico é conjugado com a amoxicilina e mais indicado para o tratamento de infecções das vias respiratórias. Outro exemplo é a combinação do tazobactam com a piperacilina, utilizado para infecções do trato respiratório e urinário. Já o sulbactam é associado a ampicilina e mais efetivo contra cocos Gram-positivos, se mostrando satisfatório nos tratamentos de algumas infecções (WILLIAN; PETRI, 2012).

Os antimicrobianos betalactâmicos são rotineiramente utilizados para o tratamento de infecções hospitalares, uma vez que apresentam eficácia terapêutica e baixos níveis de toxicidade. No entanto, a utilização frequente desses fármacos no decorrer dos anos, contribuiu para o aumento de bactérias multirresistentes, portadoras de genes codificadores de betalactamases (FERNANDES; AMADOR; PRUDÊNCIO, 2013).

3.4.1 Visão geral das betalactamases

As betalactamases são enzimas capazes de hidrolisar o anel betalactâmico e são classificadas de acordo com a estrutura e as características bioquímicas e funcionais. A

classificação molecular dessas enzimas foi proposta na década de 80, onde foram agrupadas em grupos distintos (A, B, C e D), com base na similaridade entre as sequências de aminoácidos (AMBLER, 1980). Posteriormente, Bush, Jacoby e Medeiros (1995) propuseram outra classificação considerando tanto o aspecto funcional quanto a estrutura, os substratos e sensibilidade aos inibidores de betalactamases (BUSH; FISHER, 2011). A classificação e os mecanismos de ação de algumas betalactamases podem ser visualizados na Tabela 1.

Tabela 1. Classificação molecular e agrupamento funcional de betalactamases.

Classe (Ambler)	Grupo (Bush / Jacoby)	Exemplos de enzimas	Mecanismos de ação
C	1	AmpC, CMY-2, FOX-1, MIR-1, P99	Hidrólise de cefalosporinas, cefamicinas e penicilinas
C	1e	GC1, CMY-37	Hidrólise de penicilinas e até a 3ª geração de cefalosporinas
A	2a	PC1	Hidrólise melhor de penicilinas do que cefalosporinas
A	2b	SHV-1, TEM-1, TEM-2	Hidrólise similar para penicilinas e cefalosporinas
A	2be	TEM-3, SHV-5, TEM-10, TEM26, SHV-2, CTX-M15, PER-1, VEB-1	Hidrólise ampliada para todas as cefalosporinas e aztreonam
A	2br	TEM-30, TEM-76, TEM-103, SHV-10, SHV-26	Hidrólise eficiente de penicilinas e primeiras cefalosporinas
A	2ber	TEM-50, TEM-68, TEM-89	Hidrólise de penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos
A	2c, 2ce	PSE-1, CARB-3	Hidrólise eficiente da carbenicilina
D	2d	OXA-1, OXA-10	Hidrólise ampliada para cloxacilina ou oxacilina
D	2de	OXA-11, OXA-15	Hidrólise ampliada para penicilinas e todas as cefalosporinas
D	2df	OXA-23, OXA-48	Hidrólise ampliada para penicilinas e carbapenêmicos
A	2e	CepA	Hidrólise de cefalosporinas, mas não monobactâmicos
A	2f	MI-1, KPC-2, KPC-3, SME-1, GES-2	Hidrólise de todos betalactâmicos, inclusive carbapenêmicos
B	3a	IMP-1, L1, VIM-1, NDM-1	Hidrólise de todos betalactâmicos, exceto monobactâmicos
B	3b	CphA, Sfh-1	Hidrólise de todos betalactâmicos, exceto monobactâmicos

Adaptado de Bush e Jacoby (2010); Buch e Fisher (2011).

A resistência aos betalactâmicos é resultante da hidrólise realizada por várias ESBLs, codificadas por genes de resistência às cefalosporinas e aos monobactâmicos, apesar de a maioria ter sua ação inibida pelos inibidores de betalactamases. Outro grupo de enzimas que causa preocupação mundial são as carbapenemases, uma vez que podem inativar todos os betalactâmicos, inclusive os carbapenêmicos a exemplo da KPC. A prevalência e o aumento crescente de bactérias multirresistentes são atribuídos, em grande parte, à produção dessas enzimas que são derivadas de mutações pontuais e disseminadas (SEYEDJAVADI; GOUDARZI; SABZEHALI, 2016; ELRAMALLI; ALMSHAWT; AHMED, 2017).

3.4 FORMAÇÃO DE BIOFILME

A forma planctônica (vida livre) de diferentes espécies de bactérias não é muito frequente na natureza. Na maioria dos casos, esses seres vivos são encontrados vivendo em comunidades ou aderidos a superfícies de materiais bióticos ou abióticos como, por exemplo, tecidos do corpo humano e dispositivos clínicos (BERLANGA; UERRERO, 2016; PELLING et al., 2019). A formação dessa comunidade microbiana chamada de biofilme se inicia pela adesão celular a uma superfície. Posteriormente, ocorre proliferação e multiplicação, até formar uma comunidade em um estágio irreversível (TRENTIN; GIORDANI; MACEDO, 2013). As etapas da formação de um biofilme bacteriano podem ser observadas na Figura 4.

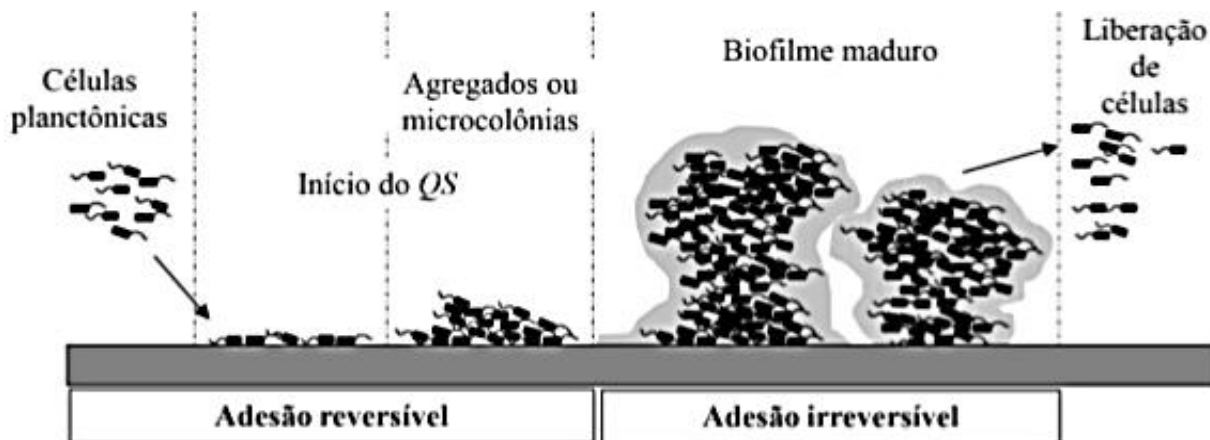


Figura 4: Estágios da formação de biofilme bacteriano. Adesão reversível com a formação de microcolônias e interação celular por QS; adesão irreversível com a produção de EPS; formação de estruturas com formato típico de cogumelos; ruptura da matriz e liberação celular (TRENTIN; GIORDANI; MACEDO, 2013).

O biofilme em estágios iniciais e de maturação é dependente de sinalizações químicas denominadas *Quorum-Sensing* (QS). As bactérias produzem moléculas de estímulo chamadas de autoindutoras, as que são Gram-negativas, normalmente, produzem N-acil-Homoserinas Lactonas (AHLs) e as Gram-positivas oligopeptídeos, que estimulam o aumento populacional bacteriano. Quando ocorre alterações nos níveis dessas moléculas, esses microrganismos alteram a sua expressão gênica e seu comportamento, de modo que haja sincronismo e o biofilme permaneça estável (MACEDO; ABRAHAM, 2009; ROMERO, M.; ACUNA, L.; OTERO, 2012).

No final de sua formação, o biofilme é composto por aproximadamente 10% de microrganismo, enquanto a matriz extracelular é equivalente a mais de 90% (FLEMMING; WINGENDER, 2010). A estabilidade estrutural do biofilme confere às bactérias envolvidas um microambiente adequado para sua sobrevivência agindo como uma barreira, e consequentemente, protege toda a comunidade residente contra a ação de antimicrobianos e tornando essa característica microbiana um relevante mecanismo de resistência (MAILLARD; MCBAIN, 2019).

A formação e estrutura dos biofilmes dependem de uma variedade de fatores como os tipos de microrganismos, os tipos de superfícies e as condições ambientais como pH e temperatura. A matriz do biofilme é constituída majoritariamente por Exopolissacarídeos (EPS), mas também contêm água, lipídeos, ácidos nucleicos e proteínas extracelulares, formando uma arquitetura porosa e com canais que permite a passagem de nutrientes (BERLANGA; UERRERO, 2016). As forças de adesão como atração eletrostática e hidrofóbica, interações de van der Waals, pontes de hidrogênio e ligações covalentes representam fatores relevantes para a formação do biofilme bacteriano. Além disso, são considerados alguns atributos bacterianos para a adesão nas superfícies como os flagelos, as fímbrias adesinas e polímeros, que são os mais investigados (FLEMMING; WINGENDER, 2010; FLEMMING et al., 2016).

3.4.1 Hidrofobicidade da Superfície Celular

A Hidrofobicidade da Superfície celular (HSC) constitui um dos importantes fatores físico-químicos que influenciam o processo de adesão microbiana em diferentes substratos. Inicialmente, os fluxos turbulentos e as forças que provocam deslocamentos (cisalhamento) contribuem para a adesão e da formação de biofilme, pois conduzem as células planctônicas

para a superfície de contato (HOU et al., 2018). O comportamento das células bacterianas em diferentes substratos depende das interações com características desses substratos como rugosidade, textura, composição química, carga e morfologia (MACÊDO et al., 2010).

A adesão bacteriana em superfícies abióticas, em muitos casos, é influenciada por interações hidrofóbicas. Já em superfícies bióticas como células e tecidos, a adesão é mediada por ligações específicas entre receptor e ligante. As propriedades das superfícies, bem como as características de cada microrganismo podem influenciar a adesão que, mais frequentemente, se aderem em superfícies hidrofóbicas como materiais plásticos do que em vidro ou metais, que apresentam superfícies hidrofílicas (TRENTIN; GIORDANI; MACEDO, 2013)

A adesão e colonização de bactérias em superfícies é fortemente influenciada pelo balanço hidrofiliicidade/hidrofobicidade (MACÊDO et al., 2010). Na formação inicial do biofilme, o conhecimento sobre as interações hidrofóbicas entre bactéria e superfície são relevantes, uma vez que a maioria desses microrganismos e algumas superfícies são carregados negativamente e, assim, sofrerão repulsão eletrostática (TRENTIN et al., 2014; REN et al., 2018). Trentin et al. (2015) apresentaram um modelo de controle de biofilme, baseado em forças repulsivas entre a superfície aniônica de uma bactéria e uma superfície abiótica revestida com proantocianidina e carregada negativamente (Figura 5). Essas características, por sua vez, podem direcionar a síntese de dispositivos clínicos chamados de anti-infecciosos, ou seja, materiais que apresentam superfícies antiaderentes para bactérias.

Atualmente, o método mais utilizado para avaliar o perfil de hidrofobicidade da superfície celular de bactérias é o desenvolvido por Rosenberg et al. (1980), o qual se baseia em células bacterianas ligadas a um hidrocarboneto em solução aquosa. De modo geral, os métodos existentes para avaliação da hidrofobicidade podem medir apenas a interação entre células e um material hidrofóbico ou hidrofílico. Desse modo, a combinação de diferentes metodologias pode oferecer um conjunto de informações mais precisas, uma vez que, não existe um padrão definido. Além disso, fatores adicionais como as interações celulares, as diferentes propriedades biológicas de cada célula, bem com as características de cada tipo de superfície de contato devem ser considerados, pois podem influenciar nos resultados e dificultar a associação da adesão bacteriana devido ao perfil de superfície celular (WANG; LEE; DYKES, 2014).

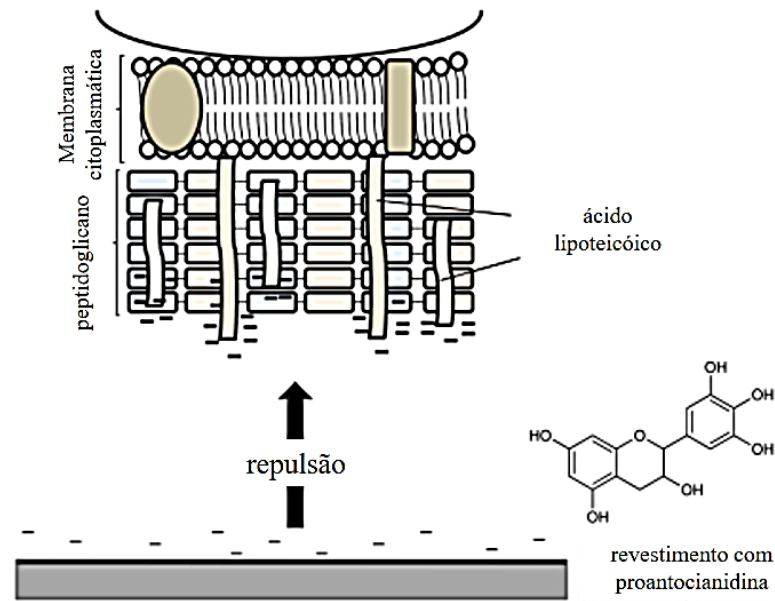


Figura 5: Mecanismo proposto para a inibição da adesão bacteriana e formação de biofilme em superfícies revestidas. Adaptado de Trentin et al. (2015).

3.4.2 Fímbrias adesinas

Os fatores de virulência presentes nas superfícies de bactérias patogênicas, incluindo os diferentes tipos de proteínas filamentosas denominadas fímbrias adesinas, podem promover a adesão celular e o desenvolvimento do biofilme. Geralmente, as fímbrias se diferenciam dos flagelos pelo tamanho e diâmetro, além disso, não são responsáveis pela mobilidade da célula bacteriana (Figura 6). Existe uma variedade de fímbrias, especialmente nas bactérias Gram-negativas, que interagem com receptores específicos presentes nas superfícies inertes e nas células do hospedeiro (ZAMANI; SALEHZADEH, 2018; ARMBRUSTER; MOBLEY; PEARSON, 2018).

Dentre a variedade de fímbrias responsáveis pela adesão bacteriana se destacam as do tipo 1, que podem reconhecer receptores glicoproteicos que contêm resíduos de manose. As fímbrias tipo 1 são heteropolímeros formados pela subunidade principal FimA e três subunidades auxiliares: FimF, FimG e FimH. Outras adesinas comuns são as do tipo P, que se ligam a receptores glicolipídicos e apresentam como componentes PapA (principal), subunidades adaptadoras e PapG terminal. Além dessas, também se destacam as do tipo 3, que se ligam ao substrato alvo usando a subunidade MrkD associada à haste fimbrial que constitui a

proteína MrkA (ZAMANI; SALEHZADEH, 2018; ALKHUDHAIRYA et al., 2019). Em várias espécies da família *Enterobacteriaceae* são identificados genes codificadores de fimbrias, bem como em bactérias de outras famílias (MOHAJERI et al., 2016; TAVAKOL et al. 2018).

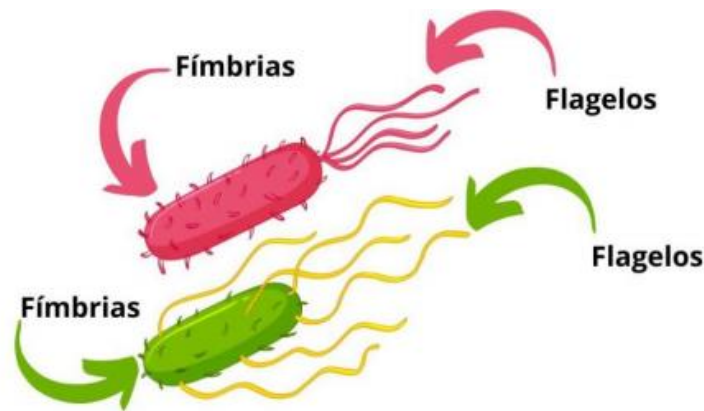


Figura 6: Representação de fimbrias e flagelos na superfície celular bacteriana (SILVA et al., 2020).

As fimbrias do tipo 1 são amplamente identificadas em cepas de *Escherichia coli* Uropatogênica (UPEC), sendo um dos fatores de virulência relevantes na adesão desses patógenos no trato urinário (ZAMANI; SALEHZADEH, 2018). Essas fimbrias também são identificadas em outras enterobactérias, como *Klebsiella* spp., *Samonella* spp. e *Enterobacter* spp. (ARAÚJO et al. 2019, UCHIYA et al. 2019; AMARETTI et al. 2020). Da mesma forma, as fimbrias do tipo 3 são encontradas em bactérias desta família (STAHLHUT et al. 2013, AZEVEDO et al. 2018).

As bactérias que causam infecções do trato urinário, por exemplo, são capazes de se aderir às células da mucosa urinária por expressar fatores de virulência como as adesinas. Normalmente, esses microrganismos resistem às forças hidrodinâmicas derivadas ao ato de micção por se aderirem fortemente ao tecido epitelial da bexiga. Os estudos sobre os fatores que contribuem para a formação de biofilme são relevantes, uma vez que podem ser descobertos novos alvos e, conseqüentemente, ser desenvolvidas novas estratégias terapêuticas (CARRARO-EDUARDO; GAVA, 2012; KOO et al., 2017; KRAMMER et al., 2018).

3.5 *Providencia stuartii*

Providencia stuartii é uma espécie bacteriana, que faz parte da família *Enterobacteriaceae*. O gênero *Providencia* é formado por bacilos Gram-negativos que são positivos em testes de fenilalanina desaminase e produzem ácidos a partir de sorbitol, D-dulcitol e L-arabinose, mas não fermentam lactose e são negativos para lisina, ornitina e arginina descarboxilase (O'HARA; BRENNER; MILLER 2000). Além disso, são bactérias anaeróbias facultativas móveis e produtoras de urease (Figura 7). As espécies que integram esse gênero podem ser encontradas no solo, na água, bem como no trato intestinal de animais superiores, sendo consideradas patogênicas para os seres humanos (SANTOS et al, 2015; WEI, 2015).

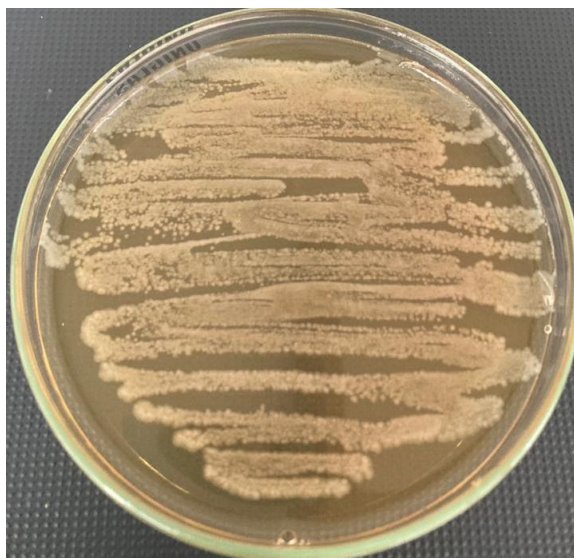


Figura 7: Isolado de *Providencia stuartii* em meio BHI após 18 h de incubação.

No início da década de 2000, a classificação taxonômica das bactérias que integrava o gênero *Providencia* foi revisada molecularmente, resultando no deslocamento de espécies de outros gêneros como *Proteus* e *Morganella* para esse gênero e vice-versa (O'HARA; BRENNER; MILLER 2000). No decorrer das décadas seguintes, o número de espécies desse gênero aumentou e, atualmente, treze são reconhecidas: *P. rettgeri*, *P. stuartii*, *P. alcalifaciens*, *P. rustigianii*, *P. heimbachae*, *P. vermicola*, *P. sneebia*, *P. burhodogranariea*, *P. thailandensis*, *P. huaxiensis*, *P. siddallii*, *P. entomophila* sp. nov. e *P. thoriotolerans* sp. nov. (SHIMA et al., 2016; KSENTINI et al., 2019; SHUKLA et al., 2021).

Dentre os representantes desse gênero, *P. stuartii* é uma das espécies mais ocorrentes e envolvida em infecções adquiridas tanto na comunidade quanto nas unidades hospitalares. Essa espécie tem sido amplamente isolada em uroculturas, mas também pode ser proveniente de infecções respiratórias e associada a muitos casos de bacteremia, especialmente, em pacientes submetidos a longos períodos de cateterismo (MAO et al., 2018; KURMASHEVA et al., 2018). *Providencia stuartii* não causa rotineiramente surtos epidêmicos, no entanto, pode ocasionar uma taxa elevada de mortalidade geral por bacteremia em pacientes com idade avançada e portadores de doenças subjacentes, obtendo um percentual correspondente a 30% dos óbitos (WEI, 2015; EL KHATIB et al., 2017).

A resistência intrínseca é uma das principais causas da patogenicidade dessa espécie, devido a expressão de genes cromossômicos que codificam enzimas do tipo AMPc (3'-5'-adenosina-monofosfato-cíclico), presentes em algumas bactérias da família *Enterobacteriaceae* (SANTIAGO et al., 2016). *P. stuartii* é resistente intrinsecamente a diferentes classes de antimicrobianos do grupo betalactâmico como, por exemplo, as penicilinas, cefalosporinas (primeira e segunda geração) e os inibidores de betalactamases (MAGIORAKOS et al., 2012; CLSI, 2018). Também são codificados pelo seu genoma enzimas que inativam aminoglicosídeos, exceto amicacina, ao qual a resistência ainda é mediada por elementos genéticos móveis (KRAUSE et al., 2016), e outros antimicrobianos de uso menos frequentes para bactérias multirresistentes. Além disso, esta espécie possui resistência natural a polimixina B, colistina e a tigeciclina, que são fármacos utilizados como última escolha terapêutica nos casos de infecções causadas por bactérias resistentes aos carbapenêmicos (MAGIORAKOS et al., 2012; MAO et al., 2018).

Nos últimos anos, foi sendo incluído ao histórico de resistência dessa bactéria genes mediados por plasmídeos, que codificam diferentes enzimas a exemplo das Betalactamases de Espectro Estendido (ESBLs) e carbapenemases como *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC), Verona Imipenemase (VIM) e New Delhi Metalobetalactamase (NDM) em diferentes lugares do mundo (TAVARES et al., 2015; OIKONOMOU et al., 2016; MOLNÁR et al., 2019; HOARD et al., 2020). Além dessas, são detectados diferentes tipos de enzimas que modificam a estrutura de aminoglicosídeos e fluoroquinolonas (ALBORNOZ et al., 2014; KRAUSE et al., 2016). O tratamento de infecções causadas por isolados de *P. stuartii* produtores dessas enzimas

é muito complicado, uma vez que a espécie é resistente intrinsecamente a diferentes categorias de antimicrobianos.

As enterobactérias produtoras de enzimas codificadas por genes cromossômicos como *P. stuartii* são oportunistas e associadas às IRAS, especialmente, em pacientes com suas defesas imunológicas comprometidas (SANTIAGO, 2016). As infecções hospitalares causadas por bactérias, tornaram-se um problema urgente de saúde pública mundialmente com o surgimento de enterobactérias produtoras de carbapenemases, devido à alta capacidade de disseminação e opções limitadas de tratamento (WHO, 2017).

Além do perfil de resistência intrínseca e adquirida, *P. Stuartii* apresenta capacidade para formação de biofilme. De acordo com El Khatib et al. (2017), o genoma dessa espécie apresenta genes codificadores de proteínas (Omp-Pst1 e Omp-Pst2) que podem estar envolvidas com a formação de biofilme. No entanto, a literatura fornece poucos dados sobre esse mecanismo de resistência nessa espécie. Sugere-se que ela utiliza condições ambientais semelhantes as encontradas no trato urinário para formar biofilme, expressando resistência ao cálcio, magnésio e tolerando altas concentrações de ureia e variações de pH. Apesar desses dados serem relevantes para a comunidade científica, os fatores bioquímicos ou genéticos utilizados por essa bactéria para composição da matriz do biofilme permanecem sem elucidação (EL KHATIB et al., 2018).

3.6 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR

Nos últimos anos, muitas técnicas moleculares têm sido desenvolvidas para avaliar a diversidade de microrganismos. A diversidade genética de linhagens bacterianas pode ser analisada através da técnica de Consenso Intergênica Repetitiva de Enterobactérias (ERIC). A amplificação de sequências de DNA por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) pode ser feita com um par de iniciadores (*primers*) específicos ou vários pares e permite a diferenciação de estirpes, além de apresentar boa reprodutibilidade (ZOTHANPUIA et al., 2016).

Inicialmente, esse método de tipagem genética foi utilizado no sequenciamento dos genomas de *Echerichia. coli* e de *Salmonella typhimurium* por Hulton e colaboradores (1991). Posteriormente, a técnica do ERIC-PCR foi sendo utilizada para genotipagem de diferentes espécies de bactérias como *Proteus mirabilis*, *Mycobacterium fortuitum*, *K. pneumoniae*, *A.*

baumannii e *P. aeruginosa* (CABRAL et al., 2015; KHOSRAVI et al., 2016; SEIFI et al., 2016, LIMA et al. 2020).

Os métodos epidemiológicos moleculares estão sendo vantajosos para a detecção e controle de infecções causadas por diferentes tipos de bactérias patogênicas. A combinação de técnicas de genotipagem como ERIC e DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso (RAPD), por exemplo, oferecem mais informações epidemiológicas do que o uso desses métodos isolados. Além do mais, são mais simplificados e de baixo custo financeiro em comparação com a maioria dos métodos de tipagem molecular (KHOSRAVI et al., 2015). A técnica de rep-PCR baseada em sequência de elementos repetitivos (ERIC-PCR e BOX-PCR) é uma ferramenta molecular utilizada para a discriminação de diferentes espécies, uma vez que utiliza vários segmentos de DNA presentes no genoma bacteriano (KUMAR; KUMAR; PRATUSH, 2014; ZOTHANPUIA et al., 2016).

Além destes, o método de Tipagem de Sequência Multilocus (MLST) e a Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE) também são muito utilizados, sendo que a PFGE é considerada o padrão-ouro dentre os diferentes métodos de genotipagem de procariotos, devido a sua reprodutibilidade (KOTTWITZ; OLIVEIRA, 2011; LIU et al., 2017). No entanto, trata-se de uma técnica mais trabalhosa e de custo financeiro mais elevado.

Uma vez que o ERIC-PCR tem se mostrado um método satisfatório para tipagem de diferentes espécies de *Enterobacteriaceae* como *K. pneumoniae*; *P. vulgaris* e *P. mirabilis*, *Enterobacter aerogenes* e *E. cloacae* (CABRAL et al. 2012; CABRAL et al 2015; KHOSRAVI et al., 2016, CABRAL et al., 2017), este método pode ser aplicado para a diferenciação de bactérias de origem clínica tanto entre setores hospitalares quanto entre instituições de saúde, conforme Lima et al. (2020) demostram em seu estudo sobre isolados de *A. baumannii* e *P. aeruginosa*.

MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ESTRATÉGIAS DE PESQUISA E CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE

Os trabalhos de revisão desta tese são revisões da literatura do tipo integrativa, utilizando artigos publicados nas principais bases de dados acadêmicas: PubMed, Web of Science, Scopus, Google Scholar, Science Direct, Mendely e livros (Farmacologia e Microbiologia) sem restrições de idioma e anos de publicação. A pesquisa para o capítulo de livro (Antibióticos aminoglicosídeos e enzimas inativadoras) foi realizada entre janeiro e junho de 2020, já para o artigo (Fatores de virulência de patógenos humanos: uma abordagem sempre necessária) foi entre janeiro e junho de 2021.

A seleção dos estudos pertinente ao tema do capítulo de livro foi limitada aos trabalhos que se enquadrassem nos seguintes critérios de inclusão: resistência bacteriana, antibióticos, aminoglicosídeos e Enzimas Modificadoras de Aminoglicosídeos (EMAs); e para o artigo: resistência bacteriana, fatores de virulência, parede celular bacteriana, toxinas produzidas por bactérias, bactérias encapsuladas, absorção de íons metálicos, biofilme, fimbrias adesinas e bactérias patogênicas.

4.2 MATERIAL BIOLÓGICO E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Foram investigados isolados de *P. stuartii* (n=28) provenientes de um hospital público de Recife-PE, Brasil. As amostras coletadas entre junho de 2017 e abril de 2018, foram previamente isoladas de diferentes sítios de infecção (ferida, secreção traqueal, urina, ponta de cateter e sangue) e de setores distintos: Unidade de Terapia Intensiva (UTI), Unidade Coronariana (UC), Clínica Médica (CM) e Cardiologia (CA). Em seguida, foram armazenadas com glicerol (15 %) em ultrafreezer a - 80 °C e com óleo mineral (temperatura ambiente). Para a realização dos ensaios, os isolados, foram reativados no meio Brain Heart Infusion (BHI) e incubados a 37 °C por 24h. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), com o parecer de número: 2.581.723.

4.2 ESPECTOMETRIA DE MASSAS

Para confirmação taxonômica dos isolados foi utilizada a técnica de espectrometria de massas com fonte de ionização e dessorção a laser assistida por matriz e analisador de tempo-de-voo (MALDI-TOF MS). Para isso, as colônias bacterianas foram suspendidas em 300 µL de água Milli-Q e depois adicionados 900 µL de etanol absoluto. As suspensões foram centrifugadas a 15.600 *g* por 2 min, o sobrenadante removido e o sedimento foi seco em SpeedVac por 20 min. Em seguida, foram adicionados 50 µL de ácido fórmico a 70% e 50 µL de acetonitrila. A mistura foi homogeneizada em agitador vortex, centrifugada a 15.600 *g* por 2 min e o sobrenadante transferido para um novo microtubo. A matriz preparada com ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico (10 mg/mL), acetonitrila 50% e ácido trifluoroacético 0,3% foi aplicada na placa de MALDI com a amostra em temperatura ambiente para cristalização. A aquisição dos espectros de massas, em modo linear positivo (Voltagem de aceleração: 20 kV e Faixa de detecção - *m/z*: 2.000 – 20.000), foi realizada pelo Programa Flex Control Version 3.0 em Espectrômetro de Massa MALDI-TOF Autoflex III (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA). Os espectros de massa obtidos foram comparados com o Banco de Dados MALDI Biotyper Version 3.1.

4.3 PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE E CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

O perfil de susceptibilidade e as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) foram determinados utilizando o sistema automatizado Vitek® 2 Compact (bioMérieux) e conforme as recomendações do *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - BrCAST* (2020). Foram testados os seguintes antimicrobianos pertencentes a diferentes classes: amicacina, aztreonam, cefepima, ceftriaxona, ciprofloxacina, ertapenem, imipenem, levofloxacina, meropenem, piperacilina-tazobactam, trimetoprim-sulfametoxazol. De acordo com o perfil de resistência, os isolados foram classificados como Multidroga-Resistente (MDR) e Extensivamente Droga-Resistente (XDR) (MAGIORAKOS et al., 2011).

4.4 EXTRAÇÃO DO DNA

A extração do DNA foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Sambrook e Russell (2001), com algumas modificações. A qualidade do DNA extraído foi avaliada a partir da técnica de eletroforese em gel de agarose a 1%. Após a corrida, o gel foi observado em transiluminador UV e fotodocumentado. A concentração do DNA foi determinada por densidade óptica em espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA) nos comprimentos de onda 260 e 280 nm, obtendo-se a estimativa da quantidade de DNA presente na amostra e o grau de pureza.

4.5 IDENTIFICAÇÃO DE GENES RESISTÊNCIA

A identificação dos genes de resistência foi realizada por PCR com os seus respectivos pares de primer. Para o gene *bla_{KPC}*: F-TGTCAGTGTATCGCCGTC e R-CTCAGTGCTCTACAGAAAACC (YIGIT et al, 2001), e para o *aac(6')-Ib-cr*: F-TTGCGATGCTCTATGAGTGGCT e R- TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA CTCGAATGCCTGGCGTGTTT (EFTEKHAR; SEYEDPOUR, 2013). A amplificação das amostras foi efetuada em volume final de 25 µL contendo: DNA genômico, pares de *primer* e Super Mix-PCR (Invitrogen). As reações foram realizadas em termociclador (BioRad), programado com ciclos térmicos e tempos específicos. Após a amplificação, a reação foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1,2 %, utilizando o marcador DNA Ladder 100 pb (Invitrogen).

4.6 PURIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO

Os produtos dos genes amplificados foram purificados, seguindo o protocolo do kit de purificação PureLink (Invitrogen) e, em seguida, sequenciados em aparelho automático de DNA ABI 3100. Os dados obtidos pelo sequenciamento foram analisados e depositados no banco de dados *Genbank do National Center for Biotechnology Information* (NCBI).

4.7 ERIC-PCR

A diversidade genética dos isolados foi analisada pela técnica ERIC-PCR utilizando os oligonucleotídeos iniciadores ERIC-R1 (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAAAC-3') e ERIC-R2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'). As misturas contendo 1,52 mM de $MgCl_2$, 200 mM de dNTP's, 40 pmol/uL de cada *primer*, 1U Taq DNA Polymerase, 1x de tampão de reações e 100 ng de DNA em volume final de 25 μ L. A amplificação das amostras foi realizada em aparelho termociclador (C1000 Thermal Cycler – BioRad), programado com um ciclo inicial de 3 min a 95 °C, seguido de 40 ciclos (1 min de 92 °C, 1 min de 36 °C e 8 min de 72 °C) e uma etapa final de extensão de 16 min a 72 °C (CABRAL et al. 2012). Os amplicons foram corados com blue-green (LGC Biotechnology, SP, BR), submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%, visualizados sob luz UV e fotocumentados para posterior análise dos perfis clonais. O software DARwin versão 5.0 foi utilizado para gerar um dendograma, a partir de uma matriz binária baseada na presença ou ausência de bandas.

4.8 FORMAÇÃO DE BIOFILME

A formação de biofilme foi avaliada em microplacas de poliestireno pelo método de cristal violeta descrito por Stepanovic et al. (2007), com diferentes meios de cultura: Luria Bertani (LB), Tryptose Soy Broth (TSB) e BHI. Após a incubação (37 °C / 24h), o inóculo foi retirado, as microplacas lavadas (3×) com solução salina estéril a 0,9% e o biofilme fixado (55 °C / 60 min). Na sequência, foi acrescentado cristal violeta (0,4 %) em temperatura ambiente por 15 minutos, seguido de três lavagens para retirar o excesso do corante. Por fim, foi adicionado etanol absoluto por 30 minutos. A partir das leituras de densidade óptica (OD) a 570 nm, foi determinada a média dos valores da absorbância de cada amostra (OD_a) em comparação com a absorbância do controle de esterilidade (OD_c). As amostras foram classificadas como fortes ($4 \times OD_c < OD_a$), moderadas ($2 \times OD_c < OD_a \leq 4 \times OD_c$) e fracas ($OD_c < OD_a \leq 2 \times OD_c$) formadoras de biofilme.

4.9 MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

Para confirmar a formação do biofilme, os ensaios foram repetidos em placas para cultura de células de 6 poços (poliestireno). Foi escolhida a cepa 8945 que foi capaz de formar biofilme nos três meios (LB, BHI, TSB). Foram adicionados 4 mL de cada meio (em poços distintos), 0,5 mL de água destilada e 0,5 mL de inóculo bacteriano. Para o controle de esterilidade o inóculo bacteriano foi substituído por água destilada. Após a incubação (37 °C / 24 h), as placas foram lavadas três vezes com salina 0,9% para remoção de células planctônicas. Em seguida, foi adicionado SYBR Green (20 µL para cada 1 mL de água milliQ) e Calcofluor White (1:1 com KOH 10%) em poços distintos, para analisar as células do biofilme e a estrutura exopolissacarídica, respectivamente. As imagens foram obtidas em microscópio de fluorescência (LEICA) em filtro 2 (BP 515-560) para o SYBR Green e filtro 1 (BP 480/40) para o Calcofluor White.

4.10 TESTE DE ADESÃO MICROBIANA A HIDROCARBONETOS (MATH)

O perfil da Hidrofobicidade da Superfície Celular (HSC) foi determinado com base no método de ligação a hidrocarboneto descrito por Czerwonka et al. (2016), com algumas modificações. Os isolados bacterianos crescidos em caldo BHI (37 °C / 18 h), foram transferidos para microtubos, centrifugados por 10 min (7.000 rpm) e o sobrenadante descartado. O sedimento resultante foi suspenso em tampão PUM (Fosfato de Potássio Trihidratado e Monobásico, Ureia e Sulfato de Magnésio Hepta-hidratado) e ajustado para 0,5 ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) obtendo-se a leitura inicial (OD_i) em leitor de microplacas (FLx800™ Multi-Detection) no comprimento de onda de 600 nm. Posteriormente, foi adicionado o hidrocarboneto p-xileno (1:0.2) e submeteu-se a agitação em vortex por 2 min. Após a separação das fases, em temperatura ambiente, foi realizada a leitura final (OD_f) a 600 nm da fase inferior de cada microtubo. A seguinte fórmula foi utilizada para determinar a HSC (%): $(OD_i - OD_f) / OD_i \times 100$. As bactérias que apresentaram HSC (%) inferior a 30% foram consideradas hidrofílicas e com HSC (%) superior a 70%, hidrofóbicas. As amostras que apresentaram HSC entre 30% e 70% foram classificadas como moderadamente hidrofóbicas.

4.11 IDENTIFICAÇÃO DE FÍMBRIAS ADESINAS

A amplificação dos genes codificadores de fímbrias foi realizada por PCR, utilizando pares de *primers* específicos. Para o gene *fimH*: foi utilizada a seguinte sequência: F₁ 5' CCACCAACTATTCCCTCGAA 3' e R₂ 5' ATGGAACCCACATCGACATT 3', enquanto para o *mrkD*: F₁ 5'CCGTTATATTTACGGTGCC 3' e R₂ 5' TCTACGTTAACCTGACCCCG 3'. A amplificação das amostras foi preparada para um volume final de 25 µL contendo: DNA genômico (20 ng), pares de *primer* (10 pmol), Mgcl (25 mM), dNTP (2 mM), água MilliQ, Taq DNA polimerase (1 U) e tampão de amostra (25 mM). As reações foram realizadas em termociclador (BioRad), programado com as respectivas etapas de desnaturação, anelamento e extensão (STAHLHUT et al., 2009; SAHLY et al., 2008). Após a amplificação, a reação foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1,2%, utilizando o marcador DNA Ladder 100 pb (Invitrogen). Em seguida, o gel foi observado em transiluminador UV e fotodocumentado. Uma cepa de *Klebsiella pneumoniae* (K5-A2) obtida da Coleção de Culturas Bacterianas do Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular, Departamento de Medicina Tropical da UFPE, foi utilizada como controle de referência.

5 RESULTADOS

Os resultados desta tese são apresentados na forma de capítulo de livro e artigo científicos de revisão e de experimentação.

5.1 CAPÍTULO 1: ANTIBIÓTICOS AMINOGLICOSÍDEOS E ENZIMAS INATIVADORAS

Capítulo de livro publicado pela editora:



São José dos Pinhais – Paraná – Brasil
www.latinamericanpublicacoes.com.br/
editora@latianamericanpublicacoes.com.br

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)	
S586f	Silva, Francisco Henrique Fatores de virulência microbianos e terapias emergentes / Francisco Henrique da Silva. São José dos Pinhais: Latin American Publicações, 2020. 367 p. Formato: PDF Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader Modo de acesso: World Wide Web Inclui: Bibliografia ISBN: 978-65-992783-0-3 DOI: 10.47174/lap2020.ed.0000001 1. Infecções. 2. Bactérias. I. Silva, Francisco Henrique. II. Silva, Sivoneide Maria. III. Assunção, Matheus Alves Siqueira. IIII. Anjos, Fálba Bernadete Ramos. V. Título.

CAPÍTULO 07

ANTIBIÓTICOS AMINOGLICOSÍDEOS E ENZIMAS INATIVADORAS

Sivoneide Maria da Silva

Doutoranda em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco
Instituição: Universidade Federal de Pernambuco - Departamento de Bioquímica
Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE, Brasil.
E-mail: sivoneide.maria@ufpe.br

Ana Vitória Araújo Lima

Doutoranda em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco
Instituição: Universidade Federal de Pernambuco - Departamento de Bioquímica
Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE, Brasil.
E-mail: anavitoria.lima@ufpe.br

Francisco Henrique da Silva

Acadêmico de Farmácia pela Universidade Federal de Pernambuco
Instituição: Universidade Federal de Pernambuco - Departamento de Bioquímica
Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE, Brasil.
E-mail: fh96986778@gmail.com

Lívia Caroline Alexandre de Araújo

Doutora em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pernambuco
Instituição: Universidade Federal de Pernambuco - Departamento de Bioquímica
Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE, Brasil.
E-mail: livia-caroline@hotmail.com

Amanda Virgínia Barbosa

Doutoranda em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pernambuco
 Instituição: Universidade Federal de Pernambuco - Departamento de Bioquímica
 Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE, Brasil.
 E-mail: amanda.virginia@ufpe.br

Bárbara de Azevedo Ramos

Doutora em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pernambuco
 Instituição: Universidade Federal de Pernambuco - Departamento de Bioquímica
 Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE, Brasil.
 E-mail: barbara.azevedo@ufpe.br

Thiago Henrique Napoleão

Professor associado da Universidade Federal de Pernambuco
 Instituição: Universidade Federal de Pernambuco - Departamento de Bioquímica
 Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE, Brasil.
 E-mail: thiago.napoleao@ufpe.br

95

Patrícia Maria Guedes Paiva

Professora titular da Universidade Federal de Pernambuco
 Instituição: Universidade Federal de Pernambuco - Departamento de Bioquímica
 Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE, Brasil.
 E-mail: patricia.paiva@ufpe.br

Maria Tereza dos Santos Correia

Professora titular da Universidade Federal de Pernambuco
 Instituição: Universidade Federal de Pernambuco - Departamento de Bioquímica
 Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE, Brasil.
 E-mail: mtscorreia@gmail.com

Maria Betânia Melo de Oliveira

Professora associada da Universidade Federal de Pernambuco
 Instituição: Universidade Federal de Pernambuco - Departamento de Bioquímica
 Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE, Brasil.
 E-mail: maria.bmoliveira@ufpe.br

RESUMO: Os antimicrobianos mais utilizados na clínica são os β -lactâmicos, mas devido à resistência bacteriana a esses fármacos e para se evitar poli-infecções, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) recomenda a combinação desses antimicrobianos com outros agentes como os aminoglicosídeos. No entanto, estudos mostram a resistência bacteriana aos aminoglicosídeos por diferentes mecanismos, mas se destaca a aquisição de genes codificadores de enzimas modificadoras de aminoglicosídeo (EMAs). De acordo com a modificação realizada no fármaco, essas enzimas são divididas em três grupos: aminoglicosídeo acetiltransferases (AACs), aminoglicosídeo fosfotransferases (APHs) e aminoglicosídeo nucleotidiltransferases (ANTs). Esta revisão tem como objetivo apresentar as principais características dos aminoglicosídeos, bem como das enzimas que alteram quimicamente estes fármacos.

PALAVRAS-CHAVE: Antimicrobianos. Bactérias. Mecanismos de resistência.

ABSTRACT: The antimicrobials most used in the clinic are β -lactams, but due to the bacterial resistance to these drugs and to avoid poly-infections, the National Health Surveillance Agency (ANVISA) recommends the combination of these antimicrobials with other agents such as aminoglycosides. However, studies show bacterial resistance to aminoglycosides by different mechanisms, but the acquisition of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes (AMAs) stands out. According to the modification made to the drug, these enzymes are divided into three groups: aminoglycoside acetyltransferases (AACs), aminoglycoside phosphotransferases (APHs) and aminoglycoside nucleotidyltransferases (ANTs). This review aims to present the main characteristics of aminoglycosides, as well as the enzymes that chemically alter these drugs.

KEYWORDS: Antimicrobials. Bacteria. Resistance mechanisms.

1. INTRODUÇÃO

O primeiro antimicrobiano da história foi a penicilina, descoberto em 1928 por Alexander Fleming. A partir de sua notável utilidade em 1940, essa molécula passou a ser a droga de escolha para o tratamento de infecções causadas por bactérias. Com o passar dos anos, foram surgindo novas populações desses micro-organismos, o que desencadeou a busca por novas classes de antimicrobianos. Até o início da década de 60, mais de 20 classes foram comercializadas mundialmente. No entanto, desde esse período, apenas duas novas classes foram incorporadas a este grupo de medicamentos (COATES; HALLS; YANMIN, 2011).

O uso indiscriminado de antimicrobianos contribui significativamente para desenvolvimento de bactérias multirresistentes. A resistência bacteriana às principais classes de antimicrobianos e a consequente proteção ao sistema imunológico do hospedeiro dificultam o tratamento de infecções hospitalares (EICHENBERGER; THADEN, 2019). Algumas bactérias podem modificar a ação de algumas classes de antimicrobianos, inibindo parcial ou totalmente seu mecanismo de ação e adquirindo características que até então não faziam parte de seu material genético. Essas características podem ser exemplificadas pelas mutações obtidas em alguma fase da fissão binária ou influência de fatores externos, como por exemplo, radiações ionizantes. Além disso, a aquisição de novos genes por meio de material extra-cromossômico, aumenta a adaptabilidade e perpetuação dessas espécies (BLAIR *et al.*, 2015).

Na prática clínica, os antimicrobianos mais utilizados são os β -lactâmicos. No entanto, devido ao aumento crescente da resistência bacteriana, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) recomenda como terapia a combinação desses fármacos com outros agentes como os aminoglicosídeos para se evitar poli-infecções (ANVISA, 2013). Por possuírem amplo espectro de atuação, os aminoglicosídeos têm sido utilizados em uma grande variedade de infecções como pneumonia, sepse neonatal e infecções do trato urinário. Esses medicamentos apresentam atividade frente a patógenos Gram-positivos, como os do gênero *Staphylococcus*, incluindo os resistentes a vancomicina e meticilina, bem como alguns *Mycobacterium spp.*, que se assemelham aos Gram-positivos devido à ausência da membrana externa. Em relação aos Gram-negativos, possuem atividade potente contra os integrantes da família Enterobacteriaceae. Também são ativos contra espécies de outras famílias como *Yersinia pestis* e a *Francisella tularensis*. No entanto, são menos eficazes contra

Pseudomonas aeruginosa e *Acinetobacter* spp. (SERIO *et al.*, 2018).

Apesar de sua efetividade, alguns estudos mostram a resistência bacteriana aos aminoglicosídeos através de genes que codificam as enzimas modificadoras de aminoglicosídeo (EMAs), uma grande família de enzimas que alteram quimicamente esses fármacos (COX *et al.*, 2018; CIRIT *et al.*, 2019). As modificações promovidas por essas enzimas têm a capacidade de diminuir a afinidade de ligação do medicamento ao alvo e assim ocasionar a perda da potência antibacteriana. Existem mais de 100 tipos de EMAs que são categorizados em três grupos distintos (KRAUSE *et al.*, 2016). Esta revisão aborda as principais características dos aminoglicosídeos, bem como das enzimas que modificam a estruturas desses antimicrobianos.

2. CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS AMINOGLICOSÍDEOS

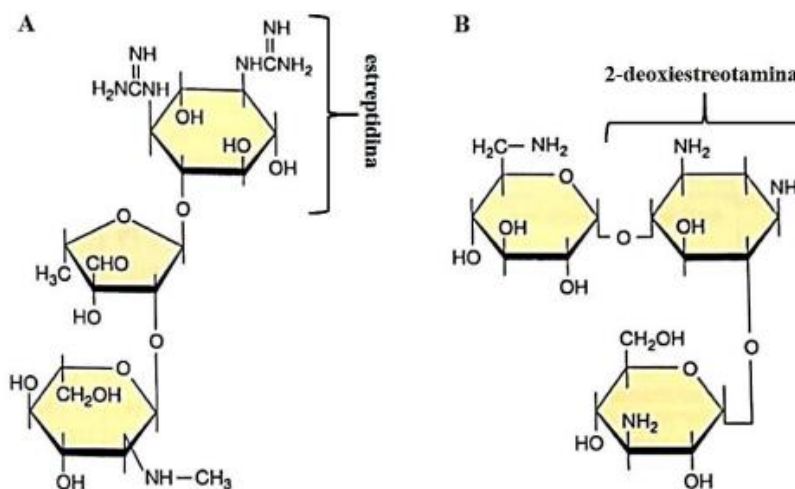
Os aminoglicosídeos recebem esse nome justamente pelo fato de serem constituídos por dois ou mais aminoaçúcares unidos por ligação glicosídica a uma hexose central (aminociclitol), como a estreptidina presente na estreptomicina (Figura 1A). Esse fármaco foi o primeiro representante da classe dos aminoglicosídeos descoberto na década de 40 por Waksman e colaboradores, sendo utilizado no tratamento para tuberculose. A outra hexose encontrada nas demais moléculas é a 2-desoxiesteotamina, cuja estrutura pode ser vista na Figura 1B (KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2014).

A maioria desses antimicrobianos foi obtida naturalmente a partir de duas espécies: *Streptomyces* spp. e *Micromonospora* spp. A estreptomicina, a neomicina, atobramicina, por exemplo, são derivados do *Streptomyces* spp., enquanto que a gentamicina é produzida por *Micromonospora* spp. Porém, alguns são semissintéticos, obtidos por meio de síntese química de produtos naturais como é o caso da netilmicina, ampicacina, entre outros (MACDOUGALL; CHAMBERS, 2012; RIBEIRO, 2017).

Estes fármacos por serem polícatíons polares não são bem absorvidos no trato gastrointestinal. Devido a essa característica, são administrados por via parenteral e agem rapidamente como agentes bactericidas. Os aminoglicosídeos são uma grande classe de compostos transportados através da membrana celular bacteriana, que se ligam a uma ou mais proteínas específicas dos ribossomos, especialmente na subunidade 30S (RANG *et al.*, 2016). Nesse caso, a síntese de proteínas pode ser inibida pela interferência na formação inicial do peptídeo, na leitura errada do mRNA

e também pela formação de monossomas disfuncionais, a partir da quebra de polirribossomos. Esses mecanismos ocorrem de modo irreversível e ocasionam a morte do micro-organismo (KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2014).

Figura 1: Estrutura química básica dos aminoglicosídeos. **A:** molécula da estreptomicina contendo o anel estreptidina; **B:** molécula da canamicina contendo o anel 2-deoxiestreotamina.



Fonte: Adaptado de Madigan *et al.* (2016).

Por muitos anos, na prática clínica, os aminoglicosídeos foram utilizados como agentes de primeira escolha. No entanto, a partir da produção de novos antimicrobianos como as cefalosporinas, os carbapenêmicos e as fluoroquinolonas, que se apresentavam menos tóxicos, foram sendo substituídos na década de 80 (MADIGAN *et al.*, 2016; RIBEIRO, 2017). Embora o seu uso tenha sido diminuído, nos últimos anos, houve uma reutilização desse grupo de antimicrobianos devido aos seus efeitos sinérgicos com outras classes e, especialmente, em virtude da resistência bacteriana a múltiplas drogas (KRAUSE *et al.*, 2016; RIBEIRO, 2017). Além da toxicidade apresentada por todos os representantes da classe dos aminoglicosídeos, a resistência microbiana é outro fator limitante.

A resistência aos aminoglicosídeos pode ocorrer por diferentes mecanismos ou a soma deles. Um importante mecanismo de resistência é a modificação do sítio alvo do antibiótico, através de mutações ou modificações enzimáticas do ribossomo, através de metiltransferases. A parede celular bacteriana e sua membrana, também são eficientes barreiras inatas, que podem ter sua impermeabilidade aumentada diminuindo, assim, a concentração desses antimicrobianos no meio intracelular. Outro

mecanismo adicional é o transporte ativo dos aminoglicosídeos para fora da célula, através das bombas de efluxo. As proteases de membrana também podem atuar degradando proteínas mal dobradas e traduzidas (GARNEAU-TSODIKOVA; LABBY, 2016). Dentre os mecanismos de resistência aos aminoglicosídeos, destaca-se a aquisição de genes codificadores de EMAs, as quais alteram quimicamente o antimicrobiano reduzindo a afinidade pelo ribossomo (COX *et al.*, 2018).

3. ENZIMAS MODIFICADORAS DE AMINOGLICOSÍDEOS

Os aminoglicosídeos são antimicrobianos susceptíveis às modificações, uma vez que seus representantes são majoritariamente moléculas grandes com muitos grupos de hidroxila e amidas expostos. As EMAs formam uma grande família de enzimas diversas, que variam nos aminoglicosídeos que podem modificar e nos alvos de modificações da molécula. Normalmente, se ligam de modo covalente a grupos amino ou hidroxila inativando o antimicrobiano (BLAIR *et al.*, 2015).

Com base na modificação realizada no fármaco, existem três classes principais de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos. A primeira classe é constituída pelas aminoglicosídeo acetiltransferases (AACs), que promovem acetilação de grupos amino encontrados em várias posições da molécula. A segunda classe é composta pelas aminoglicosídeo fosfotransferases (APHs), que catalisam a fosforilação dependente de ATP de grupos hidroxila. Enquanto que a terceira classe é representada pelas aminoglicosídeo nucleotidiltransferases (ANTs), que promovem a adenilação de AMP a grupos hidroxila (COX *et al.*, 2018).

adenilação de AMP a grupos hidroxila (COX *et al.*, 2018).

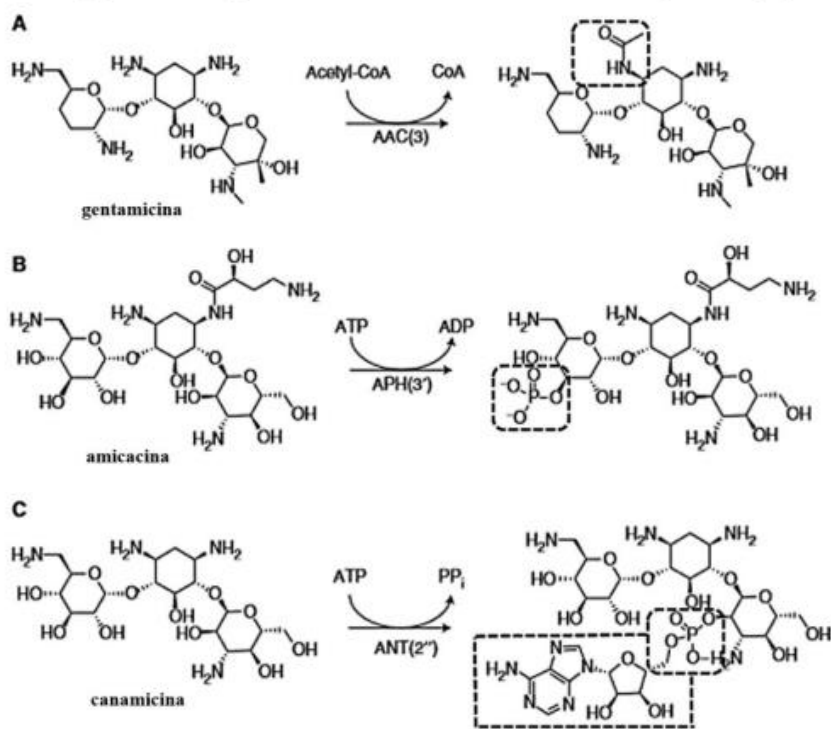
Estas classes de enzimas são subdivididas em subclasses de acordo com a posição de modificação na molécula, sendo identificadas por um numeral romano e, em alguns casos, por uma letra quando mais de uma enzima modifica o mesmo sítio (KRAUSE *et al.*, 2016). Na Figura 2 podem ser observados alguns exemplos de modificações em diferentes moléculas de aminoglicosídeos pelas três classes principais de EMAs.

As EMAs modificam tanto a estreptomicina, que continua sendo relevante para tratamento da tuberculose, quanto os demais aminoglicosídeos usados para tratar infecções graves causadas por diferentes bactérias resistentes a outras classes de antimicrobianos (MACDOUGALL; CHAMBERS, 2012; CASTANHEIRA *et al.*, 2018). Desse modo, o desenvolvimento de moléculas semissintéticas foi uma alternativa para minimizar os danos causados por essas enzimas. Como por exemplo, o dibekacin e a

amicacina, foram sintetizados a partir da canamicina, a isepamicina sintetizada a partir da gentamicina e a plazomicina a partir da sisomicina, que possui menos grupos de hidroxilas dificultando, assim, o acesso de algumas enzimas clinicamente importantes.

No entanto, as bactérias também desenvolveram enzimas que inativam praticamente todos esses compostos (BLAIR *et al.*, 2015; RANG *et al.*, 2016).

Figura 2: Modificações químicas em diferentes moléculas de aminoglicosídeos. **A:** modificação química da gentamicina catalisada pela AAC(3); **B:** modificação química na amicacina catalisada pela APH(3'); **C:** Adenilação de hidroxil da canamicina A catalisada pela ANT(2'').



Fonte: Adaptado de Krause *et al.* (2016).

Geralmente, as bactérias resistentes aos aminoglicosídeos, possuem mais de um gene desta família de enzimas. Esses genes são encontrados em elementos móveis, como plasmídeos e transposons, que também codificam outros genes de resistência a outras classes de antimicrobianos, como β -lactâmicos e fluoroquinolonas, acarretando o fenômeno de multirresistência, tanto em Gram-positivos quanto em Gram-negativos (GARNEAU-TSODIKOVA; LABBY, 2015; SERIO *et al.*, 2018). Os elementos transponíveis podem ser a justificativa para a rápida disseminação da resistência a aminoglicosídeos entre uma diversidade de bactérias

(MIRÓ *et al.*, 2013).

3.1 AMINOGLICOSÍDEO ACETILTRANSFERASES (AACs)

As AACs formam a maior classe da EMAs e são subdivididas em quatro subclasses de enzimas: AAC (1), (2'), (3) e (6'). As subclasses AAC (3) e AAC (6') são as mais frequentes em bactérias tanto Gram-positivas quanto Gram-negativas. Essas subclasses são as mais relevantes, uma vez que podem ser mediadas por elementos genéticos móveis ou serem encontradas em cromossomos. Além disso, essas enzimas têm como alvos aminoglicosídeos prescritos com mais frequência (NODARI; BARTH, 2016; SERIO *et al.*, 2018).

Dentre as subclasses das acetiltransferases a variante AAC(6')-Ib-cr é a que mais tem se destacado, pois além de inativar aminoglicosídeos, interfere na atividade de alguns antimicrobianos da classe fluoroquinolonas. Essa enzima apresenta a capacidade de associação com outros determinantes de resistência e podem ser encontradas com outros genes causadores de resistência às quinolonas, como os da família qnr, além de ser amplamente associadas com β -lactamases, especialmente as ESBLs do tipo CTX-M (EFTEKHAR; SEYEDPOUR, 2015; SERIO *et al.*, 2018).

3.2 AMINOGLICOSÍDEO FOSFOTRANSFERASES (APHs)

Já a classe das APHs constitui o segundo maior grupo, no qual suas subclasses são encontradas em várias espécies de bactérias Gram-negativas (KRAUSE *et al.*, 2016). Algumas subclasses dessas enzimas não são clinicamente importantes, sendo utilizadas em pesquisas laboratoriais de genética molecular e clonagem. Entretanto, outras enzimas desta classe são mediadores comuns da resistência aos aminoglicosídeos. As APH (3'), por exemplo, apresentam resistência à amicacina, canamicina e neomicina tanto para bactérias Gram-negativas quanto Gram-positivas (SERIO *et al.*, 2018).

3.3 AMINOGLICOSÍDEO NUCLEOTIDILTRANSFERASES (ANTs)

Por último, destacamos as ANTs, que apesar de menos frequentes, correspondem a enzimas que agem sobre vários aminoglicosídeos (KRAUSE *et al.*, 2016). Algumas subclasses dessas enzimas são encontradas predominantemente em organismos Gram-positivos como, por exemplo, *Bacillus* spp., *Enterococcus* spp., e *Staphylococcus* spp. A ANT (4') e ANT (4'') apresentam resistência à amicacina, tobramicina e isepamicina, sendo frequentemente encontradas em *Enterococcus* spp. e *S. aureus*, incluindo as cepas resistentes a meticilina (SERIO *et al.*, 2018).

4. CONCLUSÃO

Apesar dos aminoglicosídeos apresentarem significativos níveis de toxicidade são prescritos até os dias atuais, devido ao aumento crescente da resistência bacteriana as diferentes classes de antimicrobianos. No entanto, uma variedade de enzimas codificadas por genes extra-cromossômicos, em sua maioria, pode inativar esses fármacos reduzindo ainda mais as opções terapêuticas. A disseminação de genes de resistência aos antimicrobianos, por meio de elementos genéticos móveis, tem sido relata como um dos principais fatores que garante a sobrevivência bacteriana ao longo dos anos.

REREFÊNCIAS

ANVISA. Medidas de prevenção e controle de infecções por enterobactérias multiresistentes. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. NOTA TÉCNICA Nº 01/2013. Brasília, 17 de abril de 2013.

BLAIR, J. M. A. *et al.* Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 42–51, 2015.

CASTANHEIRA, M. *et al.* In vitro activity of Plazomicin against Enterobacteriaceae isolates carrying genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes most common in US Census divisions. **Diagn Microbiol Infect Dis**. v. 94, n. 1, p. 73–77, 2018.

CIRIT, O. S. *et al.* Aminoglycoside resistance determinants in multiresistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from Turkish and Syrian patients. **Acta Microbiol Immunol Hung**, v. 66, n. 3, p. 327-335, 2019.

COATES, A.; HALLS, G.; YANMIN HU, Y. Novel classes of antibiotics or more of the same? **British Journal of Pharmacology**, v. 163, p. 184-194, 2011.

COX, G. *et al.* Plazomicin Retains Antibiotic Activity against Most Aminoglycoside Modifying Enzymes. **ACS Infectious Diseases**, v. 4, n. 6, p. 980–987, 2018.

EFTEKHAR, F.; SEYEDPOUR, S. M. Prevalence of *qnr* and *aac(6')-Ib-cr* genes in clinical isolates of *Klebsiella Pneumoniae* from Imam Hussein Hospital in Tehran. **Iran J Med Sci**. 40(6): 515-21, 2015.

EICHENBERGER, E. M.; THADEN, J. T. Epidemiology and Mechanisms of Resistance of Extensively Drug Resistant Gram-Negative Bacteria. **Antibiotics**, v. 8, n. 37, 2019.

GARNEAU-TSODIKOVA, S.; LABBY, K. J. Mechanisms of resistance to aminoglycoside antibiotics: overview and perspectives. **Medchemcomm**, v. 7, n. 1, p. 11-27, 2016.

KATZUNG, B. G.; MASTERS, S. B.; TREVOR, A. J. **Farmacologia básica e clínica**. 12 ed. Porto Alegre: AMGH, 2014.

KRAUSE, K. M. *et al.* Aminoglycosides: An overview. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 6, n. 6, p. 1–18, 2016.

MACDOUGALL, C.; CHAMBERS, F. H. Aminoglicosídeos. In: BRUNTON, L. L. *et al.* (org.). **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman**. 12.ed. Porto Alegre: AMcGraw Hill, 2012. p. 1505-1513.

MADIGAN, M. T. *et al.* **Microbiologia de Brock**. 14 ed. Porto Alegre: ArtMed, 2016.

MIRÓ, E. *et al.* Characterization of aminoglycoside-modifying enzymes in enterobacteriaceae clinical strains and characterization of the plasmids implicated in their diffusion. **Microbial Drug Resistance**, v. 19, n. 2, p. 94–99, 2013.

NODARI, C. S.; BARTH, A. L. Antimicrobial resistance among enterobacteriaceae: focus on carbapenemase production. **Journal of Infection Control**. 5:1, 2016.

RANG, H. P. *et al.* **Rang e Dale: Farmacologia**. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

RIBEIRO, A. M. F. Farmacologia dos antibióticos aminoglicosídeos. Dissertação do

5.2 ARTIGO 1: FIST REPORT OF THE *aac(6')-Ib-cr* GENE IN *Providencia stuartii* ISOLATES IN BRAZIL

Artigo experimental publicado pelo periódico:

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical
Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine
Vol.:54:(e20190524): 2021

<https://doi.org/10.1590/0037-8682-0524-2019>





Short Communication

First report of the *aac(6')-Ib-cr* gene in *Providencia stuartii* isolates in Brazil

Sivoneide Maria da Silva⁽¹⁾, Bárbara de Azevedo Ramos⁽¹⁾, Ana Vitória Araújo Lima⁽¹⁾,
Rafael Artur Cavalcanti Queiroz de Sá⁽¹⁾, Jailton Lobo da Costa Lima⁽²⁾,
Maria Amélia Vieira Maciel⁽²⁾, Patrícia Maria Guedes Paiva⁽¹⁾,
Márcia Vanusa da Silva⁽¹⁾, Maria Tereza dos Santos Correia⁽¹⁾
and Maria Betânia Melo de Oliveira⁽¹⁾

[1]. Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Departamento de Bioquímica, Recife, PE, Brasil.

[2]. Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Médicas, Departamento de Medicina Tropical, Recife, PE, Brasil.

Abstract

Introduction: The *aac(6')-Ib-cr* and *bla_{KPC}* genes are spreading among *Enterobacteriaceae* species, including *Providencia stuartii*, in some countries of world. **Methods:** These genes were investigated in 28 *P. stuartii* isolates from a public hospital in Recife, Pernambuco, Brazil, by PCR and sequencing. **Results:** The *aac(6')-Ib-cr* gene was detected in 16 resistant isolates, and the *bla_{KPC}* gene was seen in 14. **Conclusions:** The presence of these genes in *P. stuartii* multi- and extensively drug-resistant isolates indicates that the resistance arsenal of this species is increasing, thus limiting the therapeutic options.

Keywords: Antimicrobial agents. Enterobacteriaceae. MDR genes. *Providencia stuartii*.

Providencia stuartii belongs to the *Enterobacteriaceae* family and is commonly associated with urinary tract infections. However, it can cause other infections such as diarrhea, pneumonia, and septicemia¹⁻³. One of the main causes of the pathogenicity of this species is its intrinsic resistance to various antimicrobials including some β -lactams and aminoglycosides, as well as tigecycline, colistin, and polymyxin B, which are used when resistance to carbapenems is present⁴. In addition to its intrinsic resistance, *P. stuartii* may acquire genes that code for different enzymes, such as the *Klebsiella Pneumoniae* carbapenemase⁵.

Some β -lactam antimicrobial resistance genes, such as *bla_{KPC}* and *bla_{OXA}*, have been identified in *P. stuartii* in Brazil³⁻⁶. However, there are no reports of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes (AMEs), such as aminoglycoside acetyltransferases (AACs). These enzymes may alter the activity of this class of antimicrobials.

In addition, the aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase type Ib variant of the enzyme (AAC[6']-Ib) has acquired the ability to modify fluoroquinolones, without significantly altering its activity against aminoglycosides. This is the first report describing the *aac(6')-Ib-cr* gene in *P. stuartii* isolates in Brazil, as well as confirming the presence and dissemination of the *bla_{KPC}* gene in this species and reporting on the genetic diversity in isolates obtained from a public hospital in Recife, Pernambuco, Brazil.

A total of 28 isolates from different infection sites and different sectors of a public hospital in Recife, Pernambuco, Brazil, were collected between June 2017 and April 2018 (Figure 1). The samples were stored in glycerol (15%) at -80°C and in mineral oil at room temperature. For laboratory analysis, they were cultured in brain heart infusion broth (BHI) at 37°C for 24 h. This study was approved by the Comitê de Ética em Pesquisa of the Universidade Federal de Pernambuco, Brazil (Ref. No. 2.581.723). The identification of isolates and determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) were performed according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)⁷ guidelines using an automated Vitek 2 Compact system (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France) using 11 antimicrobials (Table 1). Taxonomic confirmation of isolates was

Corresponding author: Dr^a. Maria Betânia Melo de Oliveira.

e-mail: mbetaniam2008@gmail.com

© <https://orcid.org/0000-0001-5188-3243>

Received 23 November 2019

Accepted 21 May 2020

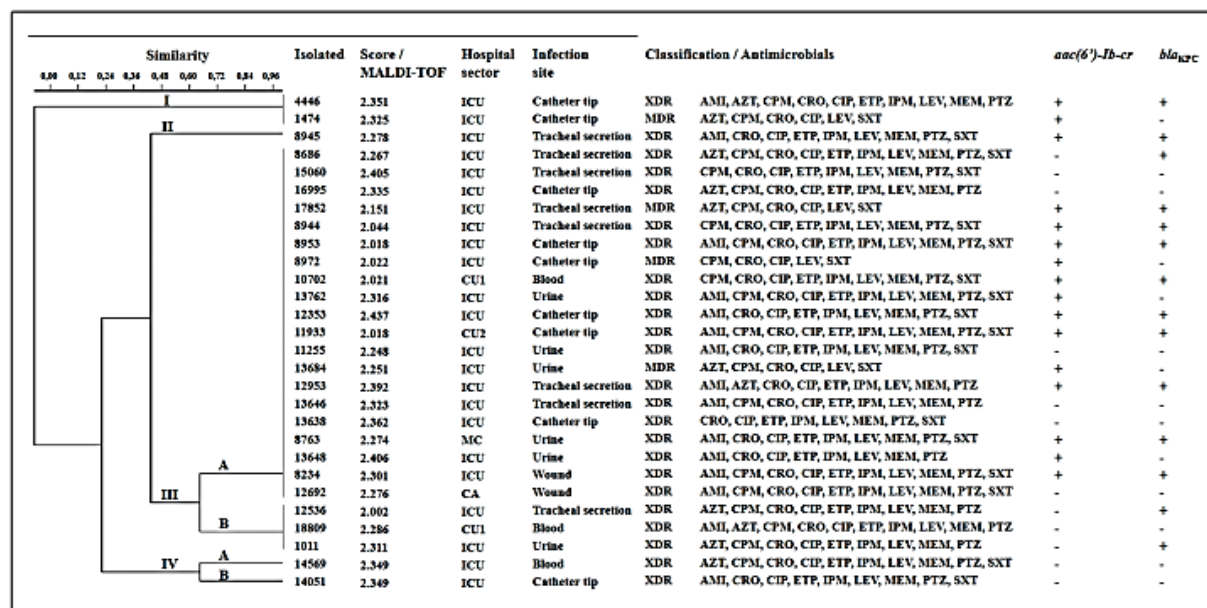


FIGURE 1: Phenotypic and genotypic characterization of the *Providencia stuartii* isolates. AMI: amikacin; AZT: aztreonam; Absent gene (-); CA: cardiology; CPM: cefepime; CRO: ceftriaxone; CIP: ciprofloxacin; CU: coronary unit; ETP: ertapenem; XDR: extensively drug-resistant; ICU: intensive care unit; IPM: imipenem; LEV: levofloxacin; MC: medical clinic; MEM: meropenem; MDR: multidrug-resistant; PTZ: piperacillin-tazobactam; Present gene (+); SXT: trimethoprim-sulfamethoxazole.

TABLE 1: Antimicrobial resistance profile of the *Providencia stuartii* isolates investigated.

Antimicrobials	MIC range (µg/mL)	Resistance (n = 28)
Amikacin	< 8 – > 32	15
Aztreonam	< 2 – > 16	11
Cefepime	< 1 – > 16	20
Ceftriaxone	≥ 16 – > 32	28
Ciprofloxacin	> 2	28
Ertapenem	< 0.25 – > 4	24
Imipenem	< 1 – > 8	24
Levofloxacin	> 4	28
Meropenem	< 1 – > 8	24
Piperacillin-Tazobactam	< 4 – > 64	24
Trimethoprim-Sulfamethoxazole	< 1 – > 4	20

MIC: minimum inhibitory concentration.

performed using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI TOF) mass spectrometry (MS) in a MALDI-TOF Autoflex III Mass Spectrometer (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA). The mass spectra obtained were compared with the MALDI Biotyper version 3.1 database.

The *aac(6')-Ib-cr* and *bla_{KPC}* genes were detected by polymerase chain reaction (PCR) using specific primer pairs and annealing temperatures⁸⁻⁹. Amplicons were evaluated using 1.2% agarose

gel electrophoresis and 100 bp Ladder DNA marker (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Subsequently, they were purified following the protocol given in the PureLink purification kit (Invitrogen) and sequenced on an ABI 3100 DNA automated apparatus. Data obtained by sequencing were analyzed and deposited in the Genbank database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI), which provided the respective access numbers: MN371229 and MN371230. The enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR (ERIC-PCR) technique was performed to analyze

the genetic diversity of the isolates. ERIC-PCR reactions were carried out and interpreted according to Duan et al.,¹⁰ as were the parameters for amplification. Amplicons were stained with Blue Green dye (LGC Biotechnology, SP, BR) and subjected to 1.5% agarose gel electrophoresis and visualized under ultraviolet light and photo-documented for later analysis of the clonal profiles. DARwin version 5.0 software was used to generate a dendrogram.

The isolates were confirmed as *P. stuartii* by MALDI-TOF MS, with scores between 2.002 and 2.437, indicating high similarity with this species. All isolates were resistant to ceftriaxone, ciprofloxacin, and levofloxacin. Twenty-four isolates were resistant to ertapenem, imipenem, meropenem, and piperacillin-tazobactam, and 20 were resistant to cefepime and trimethoprim-sulfamethoxazole. For amikacin and aztreonam, 15 and 11 resistant isolates were observed, respectively (Table 1). Based on the resistance profile, four isolates were characterized as multidrug-resistant (MDR) and the others were extensively drug-resistant (XDR). The *aac(6)-Ib-cr* gene was detected in 16 isolates, and the *bla_{KPC}* gene was seen in 14. Among the isolates, 11 were positive for both genes. However, 9 isolates did not contain the investigated genes (Figure 1).

In the present study, all isolates were confirmed by MALDI-TOF technique. The mass spectra obtained were compared with the reference spectra stored in databases using specific software. This technique is generally applied to identify a variety of microorganisms, especially those of clinical origin. Compared with other identification techniques (phenotypic characterization and *16S rDNA* gene sequencing), MALDI-TOF is used more frequently due to its low cost and high reliability¹¹. In clinical practice, rapid and accurate pathogen identification is essential for adequate antimicrobial therapy.

All *P. stuartii* isolates were resistant to fluoroquinolone drugs (ciprofloxacin and levofloxacin). Regarding the β -lactam group, there was a significant proportion showing resistance to carbapenems (ertapenem, imipenem, and meropenem) and β -lactamase inhibitors (tazobactam), indicating low effectiveness of these antimicrobials on the *P. stuartii* isolates. Overall, amikacin and aztreonam were the antimicrobials to which the isolates presented the lowest resistance. Since the intrinsic resistance of this species is already recognized in the literature for aminoglycosides (except for amikacin), as well as for tigecycline, polymyxin B, or polymyxin E (colistin), used when there is resistance to carbapenems⁷, the combination of amikacin and aztreonam can be considered as a therapeutic option. The Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) in Brazil¹² recommends a combination of aminoglycosides and β -lactams in the treatment of infections caused by MDR enterobacteria.

The resistance profiles of some of the isolates may be justified by the presence of the *aac(6)-Ib-cr* gene. This gene inactivates aminoglycosides and can confer resistance to some fluoroquinolones⁶. Recently, Scavuzzi et al.¹³ reported the presence of the *aac(6)-Ib-cr* gene in *Klebsiella pneumoniae* samples from the city of Recife-PE. Our data show a probable spread of this gene among species of the *Enterobacteriaceae* family in public hospitals in Recife. Also, the *bla_{KPC}* gene has the potential to inactivate all β -lactams¹⁴. Thus, resistance to these antimicrobials may be due to the expression of this gene. Investigating the spread of

bla_{KPC} in states from Brazil, Tavares et al.⁵ observed the presence of this gene in four *P. stuartii* isolates and highlighted the importance of the immediate recognition of this species as a carrier of this gene. Later, Aires et al.³ reported, in a hospital in Recife, an isolate of this species with *bla_{KPC}*. Our study reinforces the spread of this gene in *P. stuartii* with a significantly higher number of isolates than previous studies and demonstrates the need for urgent measures to control infections. Enzyme production from plasmid or chromosomal genes represents the main resistance mechanism in MDR and XDR bacteria. However, other mechanisms, such as a low permeability of the outer membrane, which limits antimicrobial passage, changes in the efflux pumps, which removes the drug into the extracellular environment, and modifications to antimicrobial target proteins, also contribute to bacterial survival¹⁴. Thus, isolates that did not have these genes may employ other resistance mechanisms.

Antimicrobial resistance has significantly increased in recent years. It has led to the emergence of highly virulent strains such as carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. Based on data presented by the World Health Organization¹⁵, infections caused by these bacteria are among the leading causes of morbidity and mortality in the world.

After verifying the resistance profile, this study investigated the clonal profile among *P. stuartii* isolates by ERIC-PCR, which detected four molecular profiles. Profile I included two clones, while profile II had only one. Profile III was divided into two subgroups: IIIA, with 20 clones, and IIIB, with only three. Profile IV was divided into subgroups: IVA and IVB, each with by one isolate (Figure 1). These data revealed the clonal dissemination of most isolates in different sectors of the studied hospital and demonstrated the need for more effective infection control measures.

The results show that the therapeutic options for *P. stuartii* are becoming increasingly limited. In addition to its natural resistance to various antimicrobials, including some advanced therapeutic options⁴⁻⁷, this species has demonstrated the potential to acquire other resistance genes. Routine epidemiological studies may help guide the synthesis of new drugs and the choice of appropriate treatments.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE) for the taxonomic confirmation of the isolates and the Instituto Aggeu Magalhães - FIOCRUZ Pernambuco for the sample sequencing.

FINANCIAL SUPPORT

The authors acknowledge financial support from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), N° 09/2018; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) / Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), N° BCT-0019-2.08/18.

AUTHORS' CONTRIBUTION

S.M.S.: data curation, formal analysis, investigation, methodology, writing the original draft, reviewing, and editing; B.A.R.: methodology, and software; A.V.A.L.: methodology, and software; R.A.C.Q.S.: methodology, reviewing, and editing; J.L.C.L.: methodology and software; M.A.V.M.: funding acquisition, resources, reviewing, and editing; P.M.G.P.: funding

acquisition, resources, reviewing, and editing; M.V.S.: funding acquisition, resources, reviewing, and editing; M.T.S.C.: funding acquisition, project administration, resources, reviewing, and editing; M.B.M.O.: formal analysis, funding acquisition, project administration, resources, reviewing, and editing.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

- Shima A, Hinenoya A, Samosornsuk W, Samosornsuk S, Mungkornkaew N, Yamasaki S. Prevalence of *Providencia* Strains among Patients with Diarrhea and in Retail Meats in Thailand. *Jpn J Infect Dis.* 2016;69(4):323-5.
- Abdallah M, Balshi A. First literature review of carbapenem-resistance *Providencia*. *New Microbes New Infect.* 2018;4(25):16-23.
- Aires CAM, Almeida ACS, Vilela MA, Morais-Junior MA, Morais MMC. Selection of KPC-2-producing *Providencia stuartii* during treatment for septicemia. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2016;84:95-6.
- Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, 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.* 2012;18(3):268-81.
- Tavares CP, Pereira PS, Marques EA, Faria C, Souza MPAH, Almeida R, et al. Molecular epidemiology of KPC-2-producing Enterobacteriaceae (non-*Klebsiella pneumoniae*) isolated from Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2015;82(4):326-30.
- Magagnin CM, Rozales FP, Antchevis L, Nunes LS, Martins AS, Barth AL, et al. Dissemination of blaOXA-370 gene among several Enterobacteriaceae species in Brazil. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2017;36(10):1907-10.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28th ed. Supplement M100. Wayne, PA, 2018.
- Eftekhari F, Seyedpour SM. Prevalence of *qnr* and *aac(6')-Ib-cr* genes in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Imam Hussein Hospital in Tehran. *Iran J Med Sci.* 2015;40(6):515-21.
- Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, et al. Novel Carbapenem-Hydrolyzing-Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(4):1151-61.
- Duan H, Chai T, Liu J, Zhang X, Qi C, Gao J, et al. Source identification of airborne *Escherichia coli* of swine house surroundings using ERIC-PCR and REP-PCR. *Environ Res.* 2009;109(5):511-17.
- Wattal C, Oberoi JK, Goel N, Raveendran R, Khanna S. Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for rapid identification of micro-organisms in the routine clinical microbiology laboratory. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2016;36(5):807-12.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Medidas de prevenção e controle de infecções por enterobactérias multirresistentes. Brasília: ANVISA; 2013. 9 p.
- Scavuzzi A, Firmo EF, Oliveira EM, Lopes ACS. Emergence of bla NDM-1 associated with the *aac(6')-Ib-cr*, *acrB*, *cps*, and *mrkD* genes in a clinical isolate of multi-drug resistant *Klebsiella pneumoniae* from Recife-PE, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2019; 52(e20180352).
- Eichenberger EM, Thaden JT. Epidemiology and Mechanisms of Resistance of Extensively Drug Resistant Gram-Negative Bacteria. *Antibiotics (Basel).* 2019;8(2):37.
- World Health Organization (WHO). Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis. Geneva: WHO; 2017. 77 p.

5.3 ARTIGO 2: INVESTIGAÇÃO DE FATORES RELACIONADOS À FORMAÇÃO DE BIOFILME EM *Providencia stuartii*

Artigo experimental aceito pelo periódico:



Manuscript ID

AABC-2021-0765

Title

Investigation of Factors Related to Biofilm Formation in *Providencia stuartii*

Investigação de Fatores Relacionados à Formação de Biofilme em *Providencia stuartii*

Sivoneide Maria da Silva¹, Bárbara de Azevedo Ramos¹, Rafael Artur de Queiroz Cavalcanti de Sá¹, Márcia Vanusa da Silva¹, Maria Tereza dos Santos Correia¹, Maria Betânia Melo de Oliveira^{1*}

1 Departamento de Bioquímica, Centro de Biociências - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

*Autor correspondente: Dr^a. Maria Betânia Melo de Oliveira. Dept^o de Bioquímica / Universidade Federal de Pernambuco. Av. Prof. Moraes Rego, Cidade Universitária, 50670-901 Recife, Pernambuco, Brasil.
Phone: 55 81 2126-8576; Mobile: 55 81 9663-9763
E-mail: maria.bmoliveira@ufpe.br

Resumo

Providencia stuartii é uma das espécies de *Enterobacteriaceae* de importância médica comumente associada a infecções urinárias, mas que pode causar também diferentes infecções, inclusive incomuns como abscesso hepático e vasculite séptica. Essa bactéria se destaca na expressão de resistência intrínseca e adquirida a antimicrobianos, além de utilizar mecanismos como o biofilme para sua persistência nos ambientes bióticos e abióticos. Este estudo investigou pela primeira vez o perfil de hidrofobicidade celular de isolados clínicos de *P. stuartii* e analisou genes relacionados as fimbrias adesinas nesta espécie comparando com relatos descritos para outros representantes da família *Enterobacteriaceae*. Os isolados investigados se mostraram formadores de biofilme e apresentaram um perfil de superfície celular praticamente hidrofílico. No entanto, não foram encontrados os genes *fimH* e *mrkD* nessa bactéria, diferentemente do observado em outras espécies. Esses resultados indicam que *P. stuartii* apresenta especificidades quanto ao seu potencial para formação de biofilme, dificultando a desestabilização do processo infeccioso causado por este patógeno e aumentando a permanência desta bactéria em unidades hospitalares.

Palavras-chave: *Enterobacteriaceae*, *fimH*, *mrkD*, virulência

1. Introdução

Providencia é um dos gêneros que constitui a família Enterobacteriaceae, sendo a espécie *P. stuartii* uma das mais ocorrentes e amplamente associada a infecções do trato urinário, especialmente, em pacientes submetidos a longos períodos de cateterismo (Armbruster et al, 2014; Kurmasheva et al., 2018). Como se trata de um patógeno oportunista, esta bactéria pode causar diferentes infecções: septicemia (Aires et al, 2015), diarreia (Shima et al, 2016), pneumonia (Abdallah et al, 2018) infecções em queimaduras e feridas abertas (Pirii et al., 2018; Libertucci et al., 2019), até aquelas incomuns para essa espécie como, por exemplo, conjuntivite (Crane, Shum and Chu, 2016), abscesso hepático (Lin et al, 2017), abscesso retal (Lee et al, 2018) e vasculite séptica (George, Kornik and Robinson-Bostom, 2020).

Providencia stuartii corresponde a uma das enterobactérias produtoras de β -lactamases do tipo AmpC cromossômica que apresenta, portanto, resistência natural a maioria dos antimicrobianos β -lactâmicos, incluindo penicilinas, algumas cefalosporinas e as combinações com inibidores de β -lactamases (Magiorakos et al., 2012; Santiago et al, 2016). Também é resistente intrinsecamente aos aminoglicosídeos (exceto amicacina) e antimicrobianos de última escolha terapêutica como tigeciclina, colistina e polimixina B (CLSI, 2018). Adicionalmente, pode adquirir genes de resistência que codifiquem diferentes tipos de enzimas como enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AMEs), β -lactamases de Espectro Estendido (ESBLs) e carbapenemases (Miró et al, 2013; Oikonomou et al, 2016; Mao et al, 2016; Szabolcs et al, 2019).

A patogenicidade dessa espécie é ainda mais ampliada pela sua capacidade de formar biofilme (El Khatib et al., 2017; El Khatib et al., 2018). O biofilme corresponde a uma matriz constituída majoritariamente por exopolissacarídeos (EPS), que permite a passagem de nutrientes através de poros e canais. Na maioria dos casos, as bactérias são encontradas vivendo em comunidades ou aderidas às superfícies de materiais bióticos ou abióticos como, por exemplo, tecidos do corpo humano e dispositivos clínicos (Pelling et al., 2019).

A formação e estrutura dos biofilmes dependem de uma variedade de fatores como o tipo de microrganismo, o tipo de superfície e as condições ambientais como pH e temperatura. Os fatores físico-químicos como as forças de atração eletrostática e hidrofóbica, interações de van der Waals, pontes de hidrogênio e ligações covalentes, são relevantes para a formação de

biofilme. Além disso, são considerados os fatores genéticos para a adesão bacteriana como a expressão de flagelos, polímeros e fímbrias adesinas (Flemming et al., 2016).

Apesar desses dados serem relevantes, a literatura fornece poucas informações sobre os fatores que contribuem para a formação de biofilme em *P. stuartii*. No caso de infecções urinárias foi observado que, para colonizar o trato urinário, este microrganismo expressa resistência ao cálcio e magnésio, tolera altas concentrações de ureia e variações de pH (El Khatib et al., 2017). Mas pouco se sabe sobre os processos de adesão celular dessa espécie em superfícies bióticas ou abióticas. Desse modo, este estudo se propôs a investigar a hidrofobicidade celular e genes codificadores de fímbrias adesinas em isolados de *P. stuartii* formadores de biofilme e sua associação com os fatores genéticos já descritos para família *Enterobacteriaceae*.

2. Materiais e métodos

2.1. Material biológico e condições de cultivo

Foram investigados isolados de *P. stuartii* (n=28) provenientes de um hospital público em Recife-PE, Brasil. As amostras foram coletadas entre junho de 2017 e abril de 2018 de diferentes sítios de infecção e setores do hospital (Silva et al., 2020), as quais foram armazenadas no meio Brain Heart Infusion (BHI) com glicerol (15 %) em Deep Freezer a - 80 °C e com óleo mineral em temperatura ambiente. Posteriormente, foram reativadas e incubadas a 37 °C por 24h. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), com o parecer de número: 2.581.723.

2.2. Formação de biofilme

A formação de biofilme foi realizada em microplacas de poliestireno pelo método de cristal violeta descrito por Stepanovic et al. (2007), com diferentes meios de cultura: BHI, Luria Bertani (LB) e Tryptose Soy Broth (TSB). Após a incubação (37 °C / 24h), o inóculo ($1,5 \times 10^6$ UFC/mL) foi retirado, as microplacas lavadas (3×) com solução salina estéril a 0,9% e o biofilme fixado (55 °C / 1h). Na sequência, foi acrescentado cristal violeta (0,4 %) em temperatura ambiente por 15 minutos, seguido de três lavagens para retirar o excesso do corante. Por fim, foi adicionado etanol absoluto por 30 minutos. A partir das leituras de

densidade óptica (OD) em leitor de microplacas (FLx800 TM Multi-Detection) no comprimento de onda 570 nm, foi determinada a média dos valores da absorbância de cada amostra (OD_a) em comparação com a absorbância do controle de esterilidade (OD_c). As amostras foram classificadas como fortes ($4 \times OD_c < OD_a$), moderadas ($2 \times OD_c < OD_a \leq 4 \times OD_c$) e fracas ($OD_c < OD_a \leq 2 \times OD_c$) formadoras de biofilme.

2.3. Microscopia de fluorescência

Para confirmar a formação do biofilme, foi selecionado um isolado (8945), capaz de formar biofilme nos três meios testados (BHI, LB, TSB), e os ensaios foram repetidos em placas de poliestireno (seis poços). Foram adicionados 4 mL de cada meio em poços distintos, 0,5 mL de água milliQ e 0,5 mL de inóculo bacteriano. Para o controle de esterilidade o inóculo bacteriano foi substituído por água destilada. Após a incubação (37 °C / 24h), as placas foram lavadas três vezes com salina 0,9% para remoção de células planctônicas. Em seguida, foi adicionado SYBR Green (20 µL para cada 1 mL de água milliQ) e Calcofluor White (1:1 com KOH 10%) em poços distintos, para analisar as células do biofilme e a estrutura exopolissacarídica, respectivamente. As imagens foram obtidas em microscópio de fluorescência (LEICA) em filtro 2 (BP 515-560) para o SYBR Green e filtro 1 (BP 480/40) para o Calcofluor White.

2.4. Teste de adesão microbiana a hidrocarbonetos (MATH)

O perfil da Hidrofobicidade da Superfície Celular (HSC) foi determinado com base no método de ligação a hidrocarboneto descrito por Czerwonka et al. (2016), com algumas modificações. Os isolados bacterianos crescidos em caldo BHI (37 °C / 18h), foram transferidos para microtubos, centrifugados por 10 min (7.000 rpm) e o sobrenadante descartado. O sedimento resultante foi suspenso em tampão PUM (fosfato de potássio trihidratado e monobásico, ureia e sulfato de magnésio hepta-hidratado) e ajustado para $0,5 (1,5 \times 10^6)$ UFC/mL obtendo-se a leitura de OD inicial (OD_i) a 600 nm. Posteriormente, foi adicionado o hidrocarboneto p-xileno (1: 0.2) e a mistura submetida a agitação em vortex por 2 min. Após a separação das fases, em temperatura ambiente por 30 min, foi realizada a OD final (OD_f) a 600 nm da fase inferior de cada microtubo. A seguinte fórmula foi utilizada para determinar a HSC (%): $(OD_i - OD_f) / OD_i \times 100$. As bactérias que apresentaram HSC (%) inferior a 30% foram

consideradas hidrofílicas e com HSC (%) superior a 70%, hidrofóbicas. As amostras que apresentaram HSC entre 30% e 70% foram classificadas como moderadamente hidrofóbicas.

2.5. Extração de DNA genômico

A extração do DNA foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Sambrooke e Russell (2001), com algumas modificações. A qualidade do DNA extraído foi avaliada a partir da técnica de eletroforese em gel de agarose a 1%. Após a corrida, o gel foi observado em transiluminador UV e fotodocumentado. A concentração do DNA foi determinada por densidade óptica em espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA) nos comprimentos de onda 260 e 280 nm, obtendo-se a estimativa da quantidade de DNA presente na amostra e o grau de pureza.

2.6. Identificação de fímbrias por PCR

A amplificação dos genes codificadores de fímbrias foi realizada por *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Para o gene *mrkD* foi utilizada a seguinte sequência: F₁ 5' CCACCAACTATTCCCTCGAA 3' e R₂ 5' ATGGAACCCACATCGACATT 3', enquanto para o *fimH*: F₁ 5'CCGTTATATTTACGGTGCC 3' e R₂ 5' TCTACGTTAACCTGACCCCG 3'. A amplificação das amostras foi preparada para um volume final de 25 µL contendo: DNA genômico (20 ng), pares de *primer* (10 pmol), Mgcl (25 mM), dNTP (2 mM), água milliQ, Taq DNA polimerase (1 U) e tampão de amostra (25 mM). As reações foram realizadas em termociclador (BioRad), programado com as respectivas etapas de desnaturação, anelamento e extensão (Stahlhut et al. 2009, Sahly et al. 2008). Após a amplificação, a reação foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1,2%, utilizando o marcador DNA Ladder 100 pb (Invitrogen). Em seguida, o gel foi observado em transiluminador UV e fotodocumentado. Uma cepa de *Klebsiella pneumoniae* (K5-A2), obtida da Coleção de Culturas Bacterianas do Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular - Departamento de Medicina Tropical da UFPE, foi utilizada como controle de referência.

Resultados

Todos os isolados de *P. stuartii* investigados apresentaram capacidade de formar biofilme em microplacas de poliestireno, com maior formação nos meios BHI e TSB, exceto o isolado 04446 que se mostrou fraco formador nos três meios testados. A intensidade de formação pode ser evidenciada por meio da densidade óptica representada na Figura 1. Do total de isolados analisados, 22 foram classificados como fortes formadores tanto em BHI quanto em TSB. Entretanto, no meio LB, 23 apresentaram moderada capacidade de formação de biofilme (Figura 1 e Tabela 1).

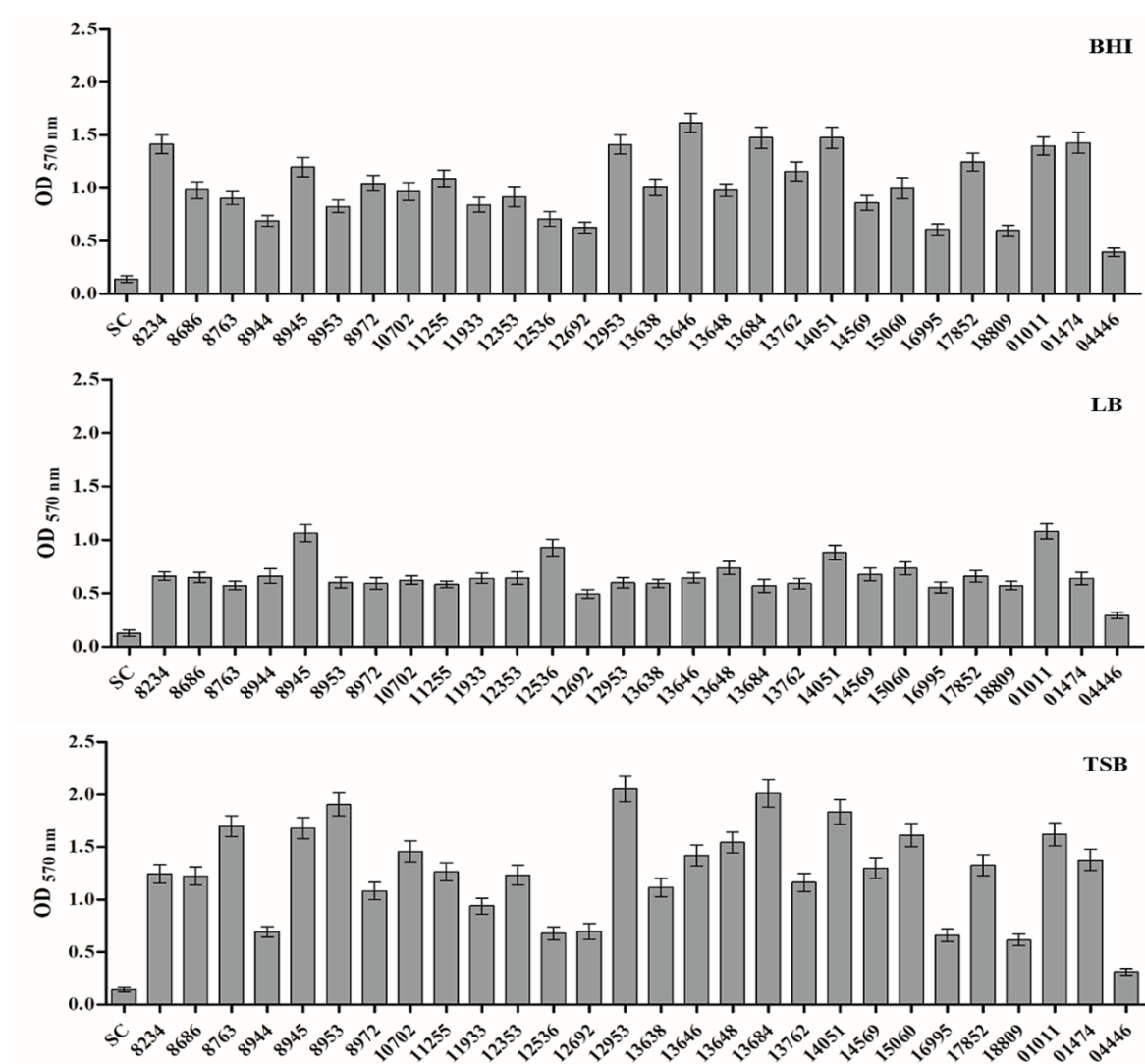


Figura 1: Formação de biofilme revelada com cristal violeta. Os biofilmes preparados em microplacas de poliestireno foram expressos pela média de OD 570 nm e comparados com o controle de esterilidade (SC). Brain Heart Infusions (BHI), Luria Bertani (LB), Tryptic Soy Broth (TSB).

Para confirmar a formação foi utilizada a microscopia de fluorescência. Para isto, foi selecionado o isolado 8945, avaliado como forte formador nos três meios investigados de acordo com os resultados obtidos pelo método do cristal violeta. Foi possível observar biofilme nas amostras coradas com SYBR Green para os três meios (Figura 2A, B, C), bem como a formação de matriz exopolissacarídica (EPS) a partir da coloração com Calcofluor White (Figura 2D, E e F). Nas figuras 2G, H, I é possível verificar a sobreposição das imagens anteriores revelando as estruturas fundamentais que caracterizam o biofilme bacteriano.

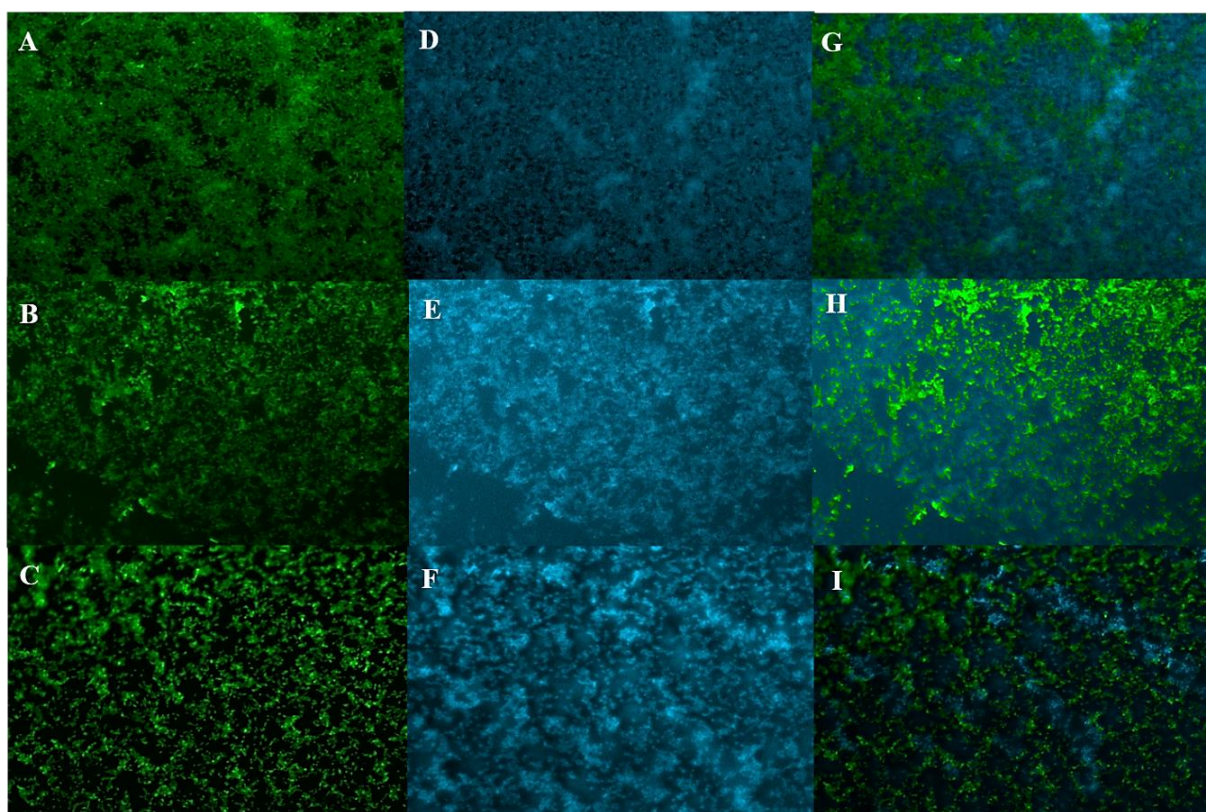


Figura 2: Biofilme do isolado 8945 em microscopia de fluorescência. **A, B e C**: biofilme formado em BHI, LB e TSB e corado com SYBR Green; **D, E e F**: exopolissacarídeos corados com Calcofluor White, respectivamente; **G, H e I**: células de biofilme coradas com SYBR Green e Calcofluor White, respectivamente.

Quanto ao perfil da HSC, 27 isolados foram classificados como hidrofílicos, apresentando um percentual de hidrofobicidade inferior a 30%. Apenas o isolado 12353 apresentou um percentual entre 30% e 70% sendo, portanto, classificado como moderadamente hidrofóbico (Figura 3, Tabela 1).

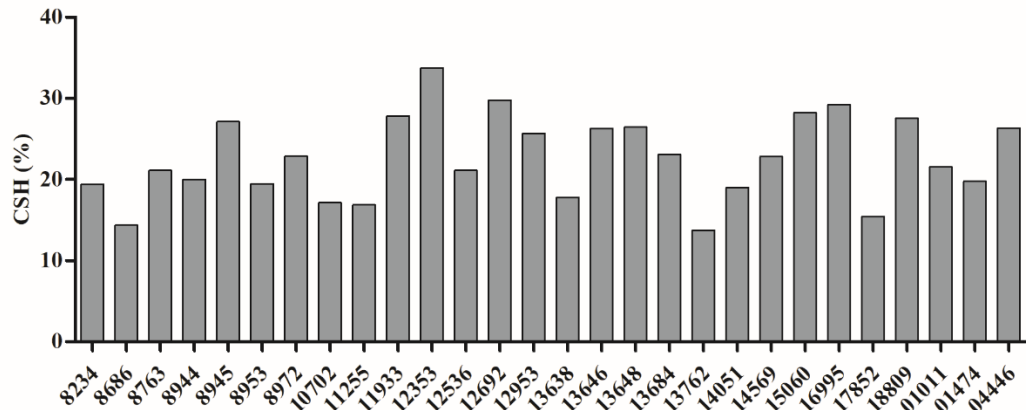


Figura 3: Percentual do perfil de hidrofobicidade da superfície celular (CSH) dos isolados de *P. stuartii*, representado pela média de três suspensões bacterianas em p-xileno (1: 0.2).

Uma vez analisada a capacidade para formação de biofilme e o perfil de hidrofobicidade dos isolados, foram investigados genes relacionados ao mecanismo de formação de biofilme: o *mrkD* e o *fimH* e a sua prevalência nos principais representantes da família *Enterobacteriaceae*. Curiosamente, nenhum dos isolados investigados no presente trabalho apresentaram positividade para estes genes (Figura 4, Tabela 1).

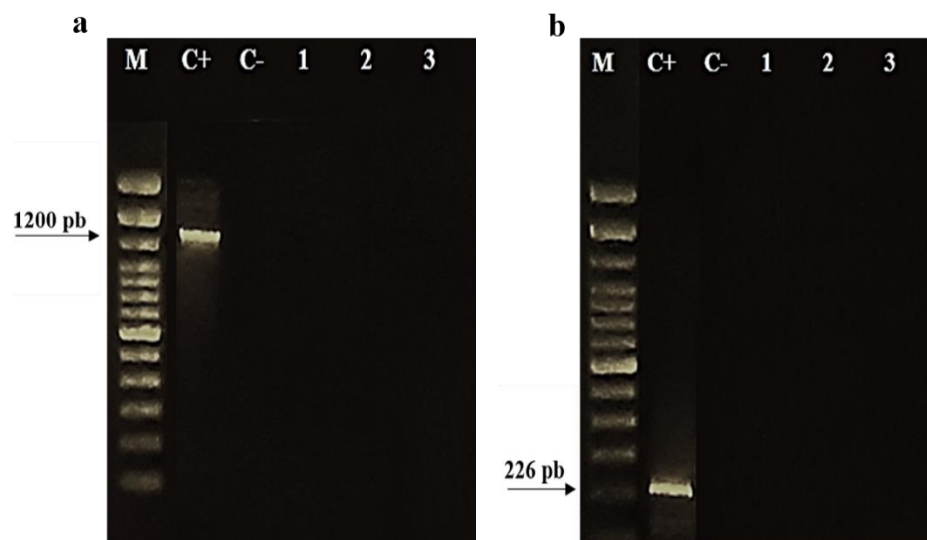


Figura 4: Gel representativo dos produtos de amplificação dos genes *fimH* (A) e *mrkD* (B). M: Marcador molecular; C+: Controle positivo (*K. pneumoniae* / K5-A2), C-: Controle negativo (água milliQ). 1: 8234, 2: 8945, 3: 01011.

Tabela 1: Característica bioquímicas e genéticas dos isolados investigados.

Isolados	Biofilme			Hidrofobicidade	Genes fimbriais	
	BHI	LB	TSB		<i>fimH</i>	<i>mrkD</i>
8234	+++	++	+++	Hidrofilico	–	–
8686	+++	++	+++	Hidrofilico	–	–
8763	+++	++	+++	Hidrofilico	–	–
8944	++	++	++	Hidrofilico	–	–
8945	+++	+++	+++	Hidrofilico	–	–
8953	+++	++	+++	Hidrofilico	–	–
8972	+++	++	+++	Hidrofilico	–	–
10702	+++	++	+++	Hidrofilico	–	–
11255	+++	++	+++	Hidrofilico	–	–
11933	+++	++	+++	Hidrofilico	–	–
12353	+++	++	+++	MO Hidrofóbico	–	–
12536	++	+++	++	Hidrofilico	–	–
12692	++	++	++	Hidrofilico	–	–
12953	+++	++	+++	Hidrofilico	–	–
13638	+++	++	+++	Hidrofilico	–	–
13646	+++	++	+++	Hidrofilico	–	–
13648	+++	++	+++	Hidrofilico	–	–
13684	+++	++	+++	Hidrofilico	–	–
13762	+++	++	+++	Hidrofilico	–	–
14051	+++	+++	+++	Hidrofilico	–	–
14569	+++	++	+++	Hidrofilico	–	–
15060	+++	++	+++	Hidrofilico	–	–
16995	++	++	++	Hidrofilico	–	–
17852	+++	++	+++	Hidrofilico	–	–
18809	++	++	++	Hidrofilico	–	–
01011	+++	+++	+++	Hidrofilico	–	–
01474	+++	++	+++	Hidrofilico	–	–
04446	+	+	+	Hidrofilico	–	–

Forte formador de biofilme (+++), moderado formador de biofilme (++) , fraco formador de biofilme (+). Brain Heart Infusions (BHI), Luria Bertani (LB), Tryptic Soy Broth (TSB). MO hidrofóbico: moderadamente hidrofóbico. Gene ausente (-).

Discussão

A estabilidade estrutural do biofilme confere às bactérias envolvidas um microambiente adequado para sua sobrevivência agindo como uma barreira e, conseqüentemente, protegendo toda a comunidade residente de antimicrobianos e do sistema imunológico do hospedeiro. Desse

modo, o biofilme pode ser caracterizado como um relevante mecanismo de virulência (Flemming et al., 2016).

No presente estudo, todos os isolados foram capazes de formar biofilme, mas com intensidades diferentes, sobretudo, em meio BHI e TSB. Entretanto, nas condições testadas, o isolado 04446 foi caracterizado como fraco formador. Nossos dados corroboram com o estudo de Silva et al. (2020), que analisou a capacidade de formação de biofilme de isolados de *Proteus mirabilis*, uma espécie de *Enterobacteriaceae* assim como *P. stuartii*, no qual se observou uma maior formação nestes dois meios de cultura. Da mesma forma, outro estudo (Lima et al. 2020) avaliou a formação de biofilme em *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* nos meios LB e TSB em concentrações padrão, suplementado com glicose e diluído (25% do padrão). Alguns isolados dessas espécies responderam aos tratamentos de estresse apenas em TSB. Para os autores, a diluição do meio que resultou na redução de nutrientes, pode ter induzido uma maior formação de biofilme. Com base nesses resultados, isolado 04446 de *P. stuartii* pode ser capaz de formar mais biofilme se submetido a alguma condição de estresse.

Em relação ao perfil de hidrofobicidade, não foram observadas diferenças relevantes entre esse parâmetro e a formação de biofilme. O único isolado classificado como moderadamente hidrofóbico (12353) apresentou um percentual mais próximo do perfil hidrofílico e formou biofilme similarmente aos demais. Desse modo, nossos dados corroboram com estudos anteriores que observaram maior formação quando as bactérias apresentavam superfícies celulares hidrofílicas (Czerwonka et al., 2016; Araújo et al., 2019, Silva et al., 2020). Um estudo anterior revelou que *P. stuartii* é capaz de invadir e se aderir às células epiteliais de forma eficaz, de acordo com seu estágio de crescimento (Kurmasheva et al. 2018). Portanto, os dados aqui apresentados são relevantes, principalmente porque a hidrobobicidade celular é um dos principais fatores físico-químicos que influenciam o processo de adesão microbiana aos substratos. Vale ressaltar que a maioria das células bacterianas e algumas superfícies são carregadas negativamente, permitindo a repulsão eletrostática. Esse fato tem contribuído significativamente para a síntese de dispositivos clínicos anti-infecciosos, evitando assim a adesão microbiana e, conseqüentemente, a disseminação de patógenos no ambiente hospitalar (Trentin et al. 2015, Ren et al. 2018)

Para a formação e estrutura dos biofilmes, são necessários diversos fatores físico-químicos e genéticos. Um estudo que investigou o biofilme de *P. stuartii* constatou que, no

estado planctônico, esta espécie forma comunidades de células flutuantes que precedem e posteriormente coexistem com biofilmes aderidos à superfície, mostrando a especificidade desta espécie relacionada a este fator de virulência (El- Khatib et al. 2018). Outro estudo, investigou a flexibilidade das principais porinas desta bactéria (OmpPst1 e OmpPst2) e sugeriu que os movimentos, especialmente, da OmpPst1 podem contribuir com a adaptação dessa espécie no ambiente, ao interagir com outros componentes da membrana como LPS, exopolissacarídeos importantes nos processos de formação de biofilme (Tran et al., 2017). Possivelmente, a diversidade de resíduos de aminoácidos presentes no domínio externo dessa porina, auxilia os movimentos de cargas e as interações eletrostáticas com outros componentes da membrana celular (Arunmanee et al., 2016).

Dentre os fatores genéticos relacionados à formação de biofilme, destaca-se a diversidade de adesinas de fímbrias, principalmente em bactérias gram-negativas, uma vez que essas estruturas podem promover a adesão celular e contribuir para o desenvolvimento de biofilme. Essas adesinas interagem com receptores específicos presentes em superfícies inertes e bióticas e podem ser codificadas por genes cromossômicos ou plasmídeos (Zamani and Salehzadeh 2018). No presente estudo, foram investigados genes que codificam fímbrias do tipo 1 (*fimH*) e do tipo 3 (*mrkD*), que são identificados em diferentes espécies da família *Enterobacteriaceae* (Tabela 2), bem como em bactérias de outras famílias (Mohajeri et al. 2016; Tavakol et al. 2018).

Frequentemente, são identificadas fímbrias do tipo 1 em *Escherichia coli* Uropatogênica (UPEC), que são um dos fatores relevantes na adesão desses patógenos (Zamani and Salehzadeh 2018). Mas essas fímbrias também são identificadas em outras enterobactérias, como *Klebsiella* spp. e *Salmonella* spp. entre outros (Araújo et al. 2019, Uchiya et al. 2019). Da mesma forma, as fímbrias do tipo 3 em algumas outras bactérias da mesma família (Stahlhut et al. 2013, Azevedo et al. 2018), conforme visto na Tabela 2.

Diante dessas informações e considerando as especificidades já relacionadas ao mecanismo de virulência descrito para *P. stuartii*, o presente estudo investigou os genes *fimH* e *mrkD* relacionados aos processos de invasão e colonização bacteriana no trato urinário. Porém, no presente estudo, não foi encontrada a presença de nenhum desses dois genes. Para o *fimH*, não há relatos de investigação nessa espécie, embora este gene codifique uma estrutura essencial para a invasão e colonização por bactérias, principalmente do trato urinário. Já para o

mrkD, a possível associação desse gene com a persistência de *P. stuartii* em casos de bacteriúria foi relatada na década de 1980 (Mobley et al. 1988). No entanto, não foram encontrados estudos experimentais mais recentes utilizando ferramentas moleculares, que pudessem confirmar a presença dessa sequência no genoma desse patógeno.

Tabela 2: Detecção dos genes *fimH* e *mrkD* em representantes da família *Enterobacteriaceae*.

Gene	<i>Enterobacteriaceae</i>	Referências
<i>fimH</i>	<i>Escherichia coli</i>	Feenstra et al. 2017, Chen et al. 2018, Rabbani et al. 2018, Zhang et al. 2020
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Ferreira et al. 2019
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Ghasemian et al. 2018
	<i>Edwardsiella piscicida</i>	Zhang et al. 2019
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Azevedo et al. 2018
	<i>Salmonella enterica</i> Enterica	Rakov et al. 2019
	<i>Salmonella enterica</i> serovar Enteritidis	Kuźmińska-Bajor et al. 2012, Kuźmińska-Bajor et al. 2015
	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	Zeiner et al. 2012, Uchiya et al. 2019
<i>mrkD</i>	<i>Salmonella enterica</i> serovar Choleraesuis	Grzymajlo et al. 2013, Lee & Yeh 2016
	<i>Citrobacter koseri</i>	Ong et al. 2010
	<i>Citrobacter freundii</i>	Ong et al. 2010
	<i>Enterobacter cloacae</i>	Amaretti et al. 2020
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Azevedo et al. 2018
	<i>Escherichia coli</i>	Ong et al. 2010, Stahlhut et al. 2013
	<i>Klebsiella variicola</i>	Imai et al. 2019
	<i>Klebsiella quasipneumoniae</i>	Imai et al. 2019
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Ong et al. 2010, Ghasemian et al. 2018
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Ong et al. 2010, Stahlhut et al. 2013, Ferreira et al. 2019, Imai et al. 2019, Amaretti et al. 2020

A ausência das duas sequências genéticas investigadas no presente estudo indica que, possivelmente, esses genes não correspondem a fatores determinantes para a formação de biofilmes em *P. stuartii*, diferentemente do que foi encontrado para outros representantes de *Enterobacteriaceae* (Tabela 2). Esta informação é interessante e revela que esta espécie possui características genéticas e bioquímicas específicas ainda não descritas ou pouco conhecidas em espécies dessa família.

Esses dados demonstram que a investigação dos possíveis mecanismos envolvidos na formação do biofilme bacteriano é essencial para a compreensão da composição da matriz extracelular, subtipos e comportamentos celulares. Além disso, esclarecer os mecanismos

envolvidos na adesão e no processo de colonização de *P. stuartii* são fundamentais para, eventualmente, prevenir ou controlar infecções crônicas causadas por esse patógeno. Os dados aqui apresentados reforçam a necessidade de novos estudos devido às especificidades encontradas nesta espécie. As particularidades ainda não esclarecidas desta bactéria têm revelado um aumento no perfil de resistência e na sobrevivência no ambiente hospitalar (Silva et al. 2020) dificultando, portanto, o combate às possíveis infecções causadas por esse patógeno.

Conclusão

Em conclusão, nossos resultados confirmam e demonstram algumas especificidades de *P. stuartii* em relação ao seu potencial de formação de biofilme. Além disso, os resultados demonstram que outros tipos de fímbrias adesinas ainda não relatados na literatura podem estar relacionados à formação de biofilme nesta espécie.

Referências

- ABDALLAH M & BALSHI A. 2018. First literature review of carbapenem-resistant *Providencia*. New Microbes New Infect 25:16-23.
- AIRES CAM, ALMEIDA ACS, VILELA MA, MORAIS-JUNIOR MA & MORAIS MMC. 2016. Selection of KPC-2-producing *Providencia stuartii* during treatment for septicemia. Diagn Microbiol Infect Dis 84:95-96.
- AMARETTI A, RIGHINI L, CANDELIERE F, MUSMECI E, BONVICINI F, GENTILOMI GA, ROSSI M & RAIMONDI S. 2020. Antibiotic Resistance, Virulence Factors, Phenotyping, and Genotyping of Non-*Escherichia coli* Enterobacterales from the Gut Microbiota of Healthy Subjects. Int J Mol Sci 21:1847.
- ARAÚJO LCA ET AL. 2019. In vitro evaluation of mercury (Hg²⁺) effects on biofilm formation by clinical and environmental isolates of *Klebsiella pneumoniae*. Ecotoxicol Environ Saf 169:669-677.
- ARMBRUSTER CE, SMITH SN, YEP A & MOBLEY HL. 2014. Increased incidence of urolithiasis and bacteremia during *Proteus mirabilis* and *Providencia stuartii* coinfection due to synergistic induction of urease activity. J Infect Dis 15:1524-1532.

ARUNMANEE W, PATHANIA M, SOLOVYOVA AS, LE BRUN AP, RIDLEY H, BASLÉ A, VAN DEN BERG B & LAKEY JH. 2016. Gram-negative trimeric porins have specific LPS binding sites that are essential for porin biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113:5034-5043.

AZEVEDO PAA, FURLAN JPR, SILVA MO, SILVA RN, GOMES CN, COSTA KRC, STEHLING EG & SILVA AP. 2018. Detection of virulence and β -lactamase encoding genes in *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae* clinical isolates from Brazil. *Braz J Microbiol* 49:224-228.

CHEN Z, PHAN MD, BATES LJ, PETERS KM, MUKERJEE C, MOORE KH & SCHEMBRI MA. 2018). The urinary microbiome in patients with refractory urge incontinence and recurrent urinary tract infection. *Int Urogynecol J* 29:1775-1782.

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. 2018. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 28th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA.

CRANE ES, SHUM M & CHU DS. 2016. Case report: *Providencia stuartii* conjunctivitis. *J Ophthalmic Inflamm Infect* 6:29.

CZERWONKA G, GUZY A, KAŁUŻA K, GROSICKA M, DAŃCZUK M, LECHOWICZ Ł, GMITER D, KOWALCZYK P & KACA W. 2016. The role of *Proteus mirabilis* cell wall features in biofilm formation. *Arch Microbiol* 198:877-884.

EL-KHATIB M ET AL. 2018. Porin self-association enables cell-to-cell contact in *Providencia stuartii* floating communities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115:2220-2228.

EL KHATIB M, TRAN QT, NASRALLAH C, LOPES J, BOLLA JM, VIVAUDOU M, PAGÈS JM & COLLETIER JP. 2017. *Providencia stuartii* form biofilms and floating communities of cells that display high resistance to environmental insults. *PLoS One* 12:0174213.

FEENSTRA T ET AL. 2017. Adhesion of *Escherichia coli* under flow conditions reveals potential novel effects of FimH mutations. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 36:467-478.

FERREIRA RL ET AL. 2019. High Prevalence of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Harboring Several Virulence and β -Lactamase Encoding Genes in a Brazilian Intensive Care Unit. *Front Microbiol* 9:3198.

FLEMMING HC, WINGENDER J, SZEWZYK U, STEINBERG P, RICE SA & KJELLEBERG S. 2016. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol* 14:563-575.

GEORGE EA, KORNIK R & ROBINSON-BOSTOM L. 2020. *Providencia stuartii* septic vasculitis. *JAAD Case Rep* 6:422-425.

GHASEMIAN A, MOBAREZ AM, PEERAYEH SN & ABADI ATB. 2018. The association of surface adhesin genes and the biofilm formation among *Klebsiella oxytoca* clinical isolates. *New Microbes New Infect* 27:36-39.

GRZYMAJŁO K, UGORSKI M, KOLENDA R, KĘDZIERSKA A, KUŹMIŃSKA-BAJOR M & WIELICZKO A. 2013. FimH adhesin from host unrestricted *Salmonella* Enteritidis binds to different glycoprotein ligands expressed by enterocytes from sheep, pig and cattle than FimH adhesins from host restricted *Salmonella* Abortus-ovis, *Salmonella* Choleraesuis and *Salmonella* Dublin. *Vet Microbiol* 166:550-557.

IMAI K ET AL. 2019. Clinical characteristics in blood stream infections caused by *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella variicola*, and *Klebsiella quasipneumoniae*: a comparative study, Japan, 2014-2017. *BMC Infect Dis* 19:946.

KURMASHEVA N, VOROBIEV V, SHARIPOVA M, EFREMOVA T & MARDANOVA A. 2018. The Potential Virulence Factors of *Providencia stuartii*: Motility, Adherence, and Invasion. *Biomed Res Int* 21:3589135.

KUŹMIŃSKA-BAJOR M, GRZYMAJŁO K & UGORSKI M. 2015. Type 1 fimbriae are important factors limiting the dissemination and colonization of mice by *Salmonella* Enteritidis and contribute to the induction of intestinal inflammation during *Salmonella* invasion. *Front Microbiol* 6:276.

KUŹMIŃSKA-BAJOR M, KUCZKOWSKI M, GRZYMAJŁO K, WOJCIECH Ł, SABAT M, KISIELA D, WIELICZKO A & UGORSKI M. 2012. Decreased colonization of chicks by *Salmonella enterica* serovar Gallinarum expressing mannose-sensitive FimH adhesin from *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Vet Microbiol* 158:205-210.

LEE CA & YEH KS. 2016. The Non-Fimbriate Phenotype Is Predominant among *Salmonella enterica* Serovar Choleraesuis from Swine and Those Non-Fimbriate Strains Possess Distinct Amino Acid Variations in FimH. *PLoS One* 11:0151126.

LEE TY, WANG CW, CHEN TW, LIAO GS, FAN HL & CHAN DC. 2017. Refractory urinary tract infection complicated rectus sheath abscess: A case report. *Urol Case Rep* 16:81-82.

LIBERTUCCI J, BASSIS CM, CASSONE M, GIBSON K, LANSING B, MODY L, YOUNG VB & MEDDINGS J. 2019. Bacteria Detected in both Urine and Open Wounds in Nursing Home Residents: a Pilot Study. *mSphere* 4:00463-19.

LIMA AVA ET AL. 2020. Occurrence and Diversity of Intra- and Interhospital Drug-Resistant and Biofilm-Forming *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Drug Resist* 26:802-814.

LIN K, LIN AN, LINN S, REDDY M & BAKSHI A. 2017. Recurrent Primary Suprahepatic Abscess Due to *Providencia Stuartii*: A Rare Phenomenon. *Cureus* 9:1691.

MAGIORAKOS AP ET AL. 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 18:268-281.

MAO YC, CHANG CL, HUANG YC, SU LH & LEE CT. 2018. Laboratory investigation of a suspected outbreak caused by *Providencia stuartii* with intermediate resistance to imipenem at a long-term care facility. *J Microbiol Immunol Infect* 51:214-219.

MIRÓ E, GRÜNBAUM F, GÓMEZ L, RIVERA A, MIRELIS B, COLL P & NAVARRO F. 2013. Characterization of aminoglycoside-modifying enzymes in *Enterobacteriaceae* clinical strains and characterization of the plasmids implicated in their diffusion. *Microb Drug Resist* 19:94-99.

MOBLEY HL, CHIPPENDALE GR, TENNEY JH, MAYRER AR, CRISP LJ, PENNER JL & WARREN JW (1988) MR/K hemagglutination of *Providencia stuartii* correlates with adherence to catheters and with persistence in catheter-associated bacteriuria. *J Infect Dis* 157:264-271.

MOHAJERI P, SHARBATI S, FARAHANI A & REZAEI Z. 2016. Evaluate the frequency distribution of nonadhesive virulence factors in carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* isolated from clinical samples in Kermanshah. *J Nat Sci Biol Med* 7:58-61.

MOLNÁR S, FLONTA MMM, ALMAŞ A, BUZEA M, LICKER M, RUS M, FÖLDES A & SZÉKELY E. 2019. Dissemination of NDM-1 carbapenemase-producer *Providencia stuartii* strains in Romanian hospitals: a multicentre study. *J Hosp Infect* 103:165-169.

OIKONOMOU O, LIAKOPOULOS A, PHEE LM, BETTS J, MEVIUS D & WAREHAM DW. 2016. *Providencia stuartii* Isolates from Greece: Co-Carriage of Cephalosporin (*bla*_{SHV-5}, *bla*_{VEB-1}), Carbapenem (*bla*_{VIM-1}), and Aminoglycoside (*rmtB*) Resistance Determinants by a Multidrug-Resistant Outbreak Clone. *Microb Drug Resist* 22:379-386.

ONG CL, BEATSON SA, TOTSIKA M, FORESTIER C, MCEWAN AG & SCHEMBRI MA. 2010. Molecular analysis of type 3 fimbrial genes from *Escherichia coli*, *Klebsiella* and *Citrobacter* species. *BMC Microbiol* 10:183.

PELLING H, NZAKIZWANAYO J, MILO S, DENHAM EL, MACFARLANE WM, BOCK LJ, SUTTON JM & JONES BV. 2019. Bacterial biofilm formation on indwelling urethral catheters. *Lett Appl Microbiol* 68:277-293.

PIRII LE, FRIEDRICH AW, ROSSEN JWA, VOGELS W, BEERTHUIZEN GIJM, NIEUWENHUIS MK, KOOISTRA-SMID AMD & BATHOORN E. 2018. Extensive colonization with carbapenemase-producing microorganisms in Romanian burn patients: infectious consequences from the Colectiv fire disaster. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 37:175-183.

RABBANI S, FIEGE B, ERIS D, SILBERMANN M, JAKOB RP, NAVARRA G, MAIER T & ERNST B. 2018. Conformational switch of the bacterial adhesin FimH in the absence of the regulatory domain: Engineering a minimalistic allosteric system. *J Biol Chem* 293:1835-1849.

RAKOV AV, MASTRIANI E, LIU SL & SCHIFFERLI DM. 2019. Association of *Salmonella* virulence factor alleles with intestinal and invasive serovars. *BMC Genomics* 20:429.

REN Y, WANG C, CHEN Z, ALLAN E, VAN DER MEI HC & BUSSCHER HJ. 2018. Emergent heterogeneous microenvironments in biofilms: substratum surface heterogeneity and bacterial adhesion force-sensing. *FEMS Microbiol Rev* 42:259-272.

SAHLY H, NAVON-VENEZIA S, ROESLER L, HAY A, CARMELI Y, PODSCHUN R, HENNEQUIN C, FORESTIER C & OFEK I. 2008. Extended-spectrum beta-lactamase production is associated with an increase in cell invasion and expression of fimbrial adhesins in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 52:3029-3034.

SAMBROOK J & RUSSELL DW. 2001. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory 3rd ed, New York.

SANTIAGO GS, MOTTA CC, BRONZATO GF, GONÇALVES D, SOUZA MMS, COELHO IS, FERREIRA HN & COELHO SMO. 2016. A Review: AmpC β -lactamase production in *Enterobacteriaceae*. *Brazilian Journal of Veterinary Medicine* 38:17-30.

SHIMA A, HINENOYA A, SAMOSORNSUK W, SAMOSORNSUK S, MUNGGORNKAEW N & YAMASAKI S. 2016. Prevalence of *Providencia* Strains among Patients with Diarrhea and in Retail Meats in Thailand. *Jpn J Infect Dis* 69:323-325.

SILVA S, ARAÚJO L, NASCIMENTO JUNIOR JA, SILVA T, LOPES AC, CORREIA MT, SILVA M & OLIVEIRA MB. 2020. Effects of Cefazolin and Meropenem in Eradication Biofilms of Clinical and Environmental Isolates of *Proteus mirabilis*. *Curr Microbiol* 77:1681-1688.

SILVA SM, RAMOS BA, LIMA AVA, SÁ RACQ, LIMA JLC, MACIEL MAV, PAIVA PMG, SILVA MV CORREIA MTS & OLIVEIRA MBM. 2021. First report of the *aac(6')-Ib-cr* gene in *Providencia stuartii* isolates in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 54:(e20190524).

STAHLHUT SG, CHATTOPADHYAY S, KISIELA DI, HVIDTFELDT K, CLEGG S, STRUVE C, SOKURENKO EV & KROGFELT KA. 2013. Structural and population characterization of MrkD, the adhesive subunit of type 3 fimbriae. *J Bacteriol* 195:5602-5613.

STAHLHUT SG, CHATTOPADHYAY S, STRUVE C, WEISSMAN SJ, APRIKIAN P, LIBBY SJ, FANG FC, KROGFELT KA & SOKURENKO EV. 2009. Population variability of the FimH type 1 fimbrial adhesin in *Klebsiella pneumoniae*. *J Bacteriol* 191:1941-1950.

STEPANOVIĆ S, VUKOVIĆ D, HOLA V, DI BONAVENTURA G, DJUKIĆ S, CIRKOVIĆ I & RUZICKA F. 2007. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS* 115:891-899.

TAVAKOL M, MOMTAZ H, MOHAJERI P, SHOKOOHIZADEH L & TAJBAKHS E. 2018. Genotyping and distribution of putative virulence factors and antibiotic resistance genes of *Acinetobacter baumannii* strains isolated from raw meat. *Antimicrob Resist Infect Control* 7:120.

TRAN QT, MAIGRE L, D'AGOSTINO T, CECCARELLI M, WINTERHALTER M, PAGÈS JM & DAVIN-REGLI A. 2017. Porin flexibility in *Providencia stuartii*: cell-surface-exposed loops L5 and L7 are markers of *Providencia* porin OmpPst1. *Res Microbiol* 168:685-699.

TRENTIN DS ET AL. 2015. Natural Green coating inhibits adhesion of clinically important bacteria. *Sci Rep* 5:8287.

UCHIYA KI, KAMIMURA Y, JUSAKON A & NIKAI T (2019) *Salmonella* Fimbrial Protein FimH Is Involved in Expression of Proinflammatory Cytokines in a Toll-Like Receptor 4-Dependent Manner. *Infect Immun* 87:00881-18.

ZAMANI H & SALEHZADEH A. 2018. Biofilm formation in uropathogenic *Escherichia coli*: association with adhesion factor genes. *Turk J Med Sci* 48:162-167.

ZEINER SA, DWYER BE & CLEGG S. 2012. FimA, FimF, and FimH are necessary for assembly of type 1 fimbriae on *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun* 80:3289-3296.

ZHANG Q, HE TT, LI DY, LIU LY, NIE P & XIE HX. 2019. The *Edwardsiella piscicida* Type III Effector EseJ Suppresses Expression of Type 1 Fimbriae, Leading to Decreased Bacterial Adherence to Host Cells. *Infect Immun* 87:00187-19.

ZHANG W, XU L, PARK HB, HWANG J, KWAK M, LEE PCW, LIANG G, ZHANG X, XU J & JIN JO. 2020. *Escherichia coli* adhesion portion FimH functions as an adjuvant for cancer immunotherapy. *Nat Commun* 11:1187.

5.4 ARTIGO 3: FATORES DE VIRULÊNCIA DE PATÓGENOS HUMANOS: UMA ABORDAGEM SEMPRE NECESSÁRIA

Artigo de revisão aceito pelo periódico:



Brazilian Journal of Health Review

ISSN: 2595-6825

2900

Virulence factors of human pathogens: an always-needed approach

Fatores de virulência de patógenos humanos: uma abordagem sempre necessária

DOI:10.34119/bjhrv5n1-257

Recebimento dos originais: 08/01/2022

Aceitação para publicação: 15/02/2022

Fatores de virulências de patógenos humanos: uma abordagem sempre necessária

Sivoneide Maria da Silva¹, Francisco Henrique da Siva¹, Rafael Artur de Queiroz Cavalcanti de Sá¹, Amanda Virgínia Barbosa¹, Ana Vitória Araújo Lima¹, Amanda Maria da Conceição Perez², Admilson de Castro Chaves Filho², Anderson Rodrigues Balbino de Lima¹, Bárbara de Azevedo Ramos¹, Patrícia Maria Guedes Paiva¹, Maria Tereza dos Santos Correia¹, Maria Betânia Melo de Oliveira¹

¹Centro de Biociências - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

²Centro de Tecnologia e Geociências - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

Autor correspondente:

Sivoneide Maria da Silva - Universidade Federal de Pernambuco

Av. Moraes Rego s/n, CEP: 50670-420, Recife, Pernambuco, Brasil.

E-mail: sivoneidems@gmail.com

Phone: 55 81 98964-9664

Resumo

As infecções hospitalares causadas por bactérias resistentes é um problema mundial de saúde pública que afeta, especialmente, paciente imunocomprometidos. Esses patógenos para sobreviverem e se propagarem, utilizam um conjunto variado de estratégias conhecidas como fatores de virulência. O presente estudo, corresponde a uma revisão do estado-da-arte relacionada aos principais fatores associados a patogenicidade de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas de importância clínica. Os fatores de virulência isolados ou em conjunto, garantem significativas defesas ao sistema imunológico do organismo hospedeiro, bem como de condições externas adversas. Assim, medidas eficazes de controle microbiano são necessárias, principalmente nas instituições de saúde; também, o incentivo a novas abordagens terapêuticas que visem os principais fatores de virulência.

Palavras-chave: infecções bacterianas, patogenicidade, prevenção

Introdução

O aumento no número de infecções hospitalares causadas por micro-organismos multirresistentes é um problema de saúde em todo o mundo. Essas infecções conhecidas como Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) são provocadas principalmente pelo uso persistente de antibióticos, pela automedicação dos pacientes e pela exposição ao ambiente hospitalar por longos períodos, principalmente, em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs), (Oliveira et al. 2017; Oliveira et al. 2020).

Alguns órgãos competentes fazem levantamento das IRAS nos setores hospitalares a exemplo da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), no Brasil. Através desses levantamentos, em 2017 a Organização Mundial de Saúde (OMS) resumiu e publicou uma lista de bactérias resistentes a serem consideradas como prioridade na pesquisa, descoberta e desenvolvimento de novos antibióticos, classificando-as como prioridade crítica, alta e média (WHO, 2017). Dentre os patógenos citados, estão espécies da família *Enterobacteriaceae* e outros micro-organismos de outras famílias como *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*.

O sucesso da infecção causada por essas bactérias é determinado pela soma da atuação dos mecanismos de resistência e patogênicos, esses últimos conhecidos como fatores de virulência. Esses fatores podem atuar individualmente ou em conjunto para atrapalhar os mecanismos de defesa do hospedeiro. O conhecimento sobre esses fatores, o modo de sua atuação e regulação são relevantes para o desenvolvimento de novas terapêuticas, bem como auxilia as medidas de controle sanitário (Wilson et al. 2002; Wu, et al. 2008; Mulani et al. 2019).

Uma vez que, os estudos epidemiológicos são ferramentas essenciais para manter atualizados os perfis de virulência bacterianos e contribuir com os tratamentos clínicos adequados, o presente estudo buscou na literatura os principais fatores de virulência de espécies patogênicas da família *Enterobacteriaceae*, bem como de outros patógenos humanos.

Parede Celular

Um dos principais componentes da parede celular bacteriana é o peptidoglicano, um macropolímero complexo altamente conservado, formado por monômeros de N-acetilglucosamina (GlcNAc) e ácido N-acetilmurâmico (MurNAc) e ligados por uma ligação β -

1,4-O- glicosídica (Pyclik et al. 2020). Outros componentes podem estar presentes em sua estrutura como, por exemplo, lipoproteínas, polissacarídeos e glicolídeos, que podem atribuir diferentes propriedades físico-químicas a estes seres vivos (Radkov et al. 2018). A presença de uma complexa parede celular nas bactérias foi um fator importante na evolução desses micro-organismos, pois além de essencial para o crescimento e para a viabilidade celular, essa estrutura também confere resistência mecânica e proteção contra o estresse ambiental (Claessen e Rrrington 2019).

A constituição da parede celular diferencia os micro-organismos Gram-positivos dos Gram-negativos. Nas bactérias Gram-negativas a camada de peptidoglicano é mais fina (5 nm) e encontra-se localizada entre as membranas citoplasmática e a externa. Já no grupo das Gram-positivas essa camada de peptidoglicano está intercalada com ácido teicóico e ácido lipoteicóico formando uma estrutura mais grossa (20-50 nm), localizada no lado periplasmático da membrana citoplasmática (Radkov et al. 2018).

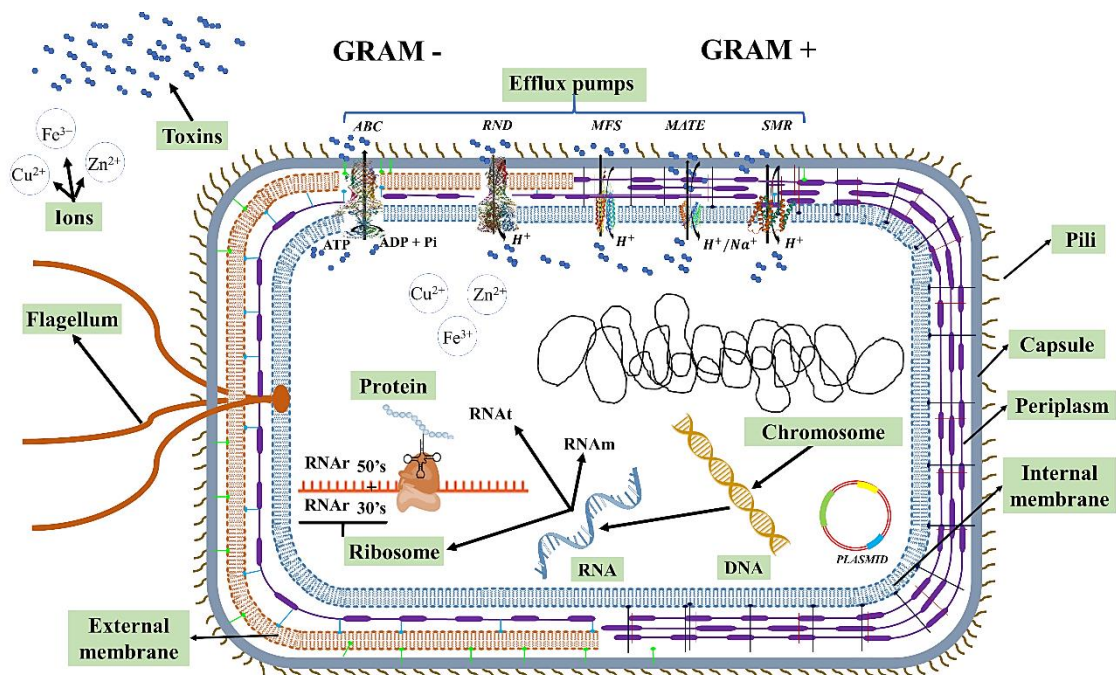


Figura 1: Representação de fatores de virulência de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

O ácido teicóico é um polímero que desempenha um papel importante na parede celular de bactérias Gram-positivas. Eles estão envolvidos em vários processos celulares como a morfologia, divisão celular e absorção de nutrientes. Além disso, eles são importantes fatores de

virulência e exercem papel relevante para a formação de biofilme e resistência antimicrobiana (van der ES et al., 2018). Dependendo da ligação à parede celular, eles podem ser de dois grupos: o ácido lipoteicóico (LTA), ancorados aos lipídios da membrana citoplasmática, e o ácido teicóico de parede (WTA), fortemente ligado às camadas de peptidoglicano (van der ES et al. 2016; Rohde 2019).

Os LTAs estão presentes em todas as espécies do grupo das Gram-positivas, exceto para algumas cepas de *Micrococcus* spp. Já os WTAs são encontrados principalmente em *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Enterococcus* spp. (Rajagopal e Walker 2017). Dependendo da condição do meio, a síntese de LTA ou WTA pode ser interrompida sem maiores complicações para a célula bacteriana, mas se a interrupção ocorrer simultaneamente pode ser letal (Rohde 2019). Para *S. aureus* foi demonstrado que WTA é essencial para a virulência e resistência bacteriana (β -lactâmicos), enquanto que o LTA é relevante nos processos de viabilidade e divisão celular (Rismondo et al. 2018). Um estudo, que analisou ácidos teicóicos modificados (sem d-alanina), demonstrou redução na colonização e adesão de *S. aureus* Resistente à Meticilina (MRSA) e *E. faecalis* Resistente à Vancomicina (VRE) em células do epitélio nasal (Naclerio et al. 2020). Esses dados sugerem que o LTA e o WTA são fundamentais para a formação do biofilme e podem desempenhar funções vitais nesses patógenos.

As bactérias Gram-negativas, por sua vez, apresentam um envelope celular constituída por duas membranas, uma interna formada por uma bicamada fosfolipídica e outra externa composta de Lipopolissacarídeos (LPS), também conhecido como endotoxina (Szentirmai et al. 2020). A molécula de LPS apresenta uma estrutura tripartida formada por uma parte hidrofóbica conservada (lipídio A), um oligossacarídeo central (núcleo) e um antígeno O (unidades repetidas de oligossacarídeos) sendo este último, uma estrutura variável e essencial para virulência microbiana (Maldonado et al. 2016; Sweeney e Lowary 2019). As mudanças fisiológicas que ocorrem no antígeno O dos LPS em isolados de *P. aeruginosa*, por exemplo, são cruciais para evitar a detecção e promover o estabelecimento da infecção crônica (Mccarthy et al. 2017).

Dentre os benefícios do LPS destaca-se a participação da integridade estrutural da membrana externa e a formação de uma barreira contra a entrada de substâncias tóxicas (Auer e Weibel 2017; Scala et al, 2020). Além disso, os LPS atuam na modulação da virulência,

respostas imunes inatas e adaptativas do hospedeiro, bem como na sepse bacteriana, que representa um dos fatores de virulência mais importantes em bactérias Gram-negativas (Barakat et al. 2019).

Na sepse bacteriana, o LPS é notadamente reconhecido como o mediador fundamental do choque séptico. Ao entrar na célula do hospedeiro é reconhecido pelo receptor Toll-like4 (TLR4) e desencadeia uma cascata inflamatória, responsável pela agressiva patogênese da sepse e do choque séptico (Martin e Bachman 2018). Em Gram-positivas os ácidos teicóicos são os principais responsáveis pelo choque séptico (Wilson et al. 2002). Há quase três décadas, foi demonstrado que alguns antibióticos podem contribuir com uma liberação extra de LPS durante o choque séptico provocado por *Enterobacter cloacae* (Crosby et al. 1994). Esses dados continuam sendo valiosos, pois a prescrição adequada de medicamentos é fundamental para o sucesso dos tratamentos clínicos.

Características Gerais das Toxinas

Entre os fatores de virulência descritos para bactérias se encontram algumas proteínas secretadas no meio extracelular e algumas delas são conhecidas como toxinas, que são moléculas proteicas e não proteicas produzidas para destruir ou danificar as células do hospedeiro. Essas substâncias modificam o ambiente da célula hospedeira e são responsáveis por interações célula-bactérias. As toxinas são divididas em endotoxinas, como o LPS produzido por bactérias Gram-negativas; e exotoxinas, que são polipetídeos produzidos tanto por bactérias Gram-negativas quanto Gram-positivas (Wu et al. 2008; Levinson 2010; Szentirmai et al, 2020).

Existem outras toxinas proteicas com função proteolítica, como as toxinas que são estáveis ao calor ou que modificam o exoesqueleto da célula hospedeira. As toxinas proteolíticas, que decompõem proteínas específicas das células do hospedeiro, podem causar paralisias (botulismo e tétano) e quebra da matriz celular propagando a infecção. A depender de onde é liberada, essas substâncias caracterizam manifestações clínicas da doença, alterando a liberação de neurotransmissores. Várias bactérias possuem esse tipo de toxina, com uma variedade de atuação enzimática (Wilson 2002; Otto 2015; Lahiani et al. 2017). A toxina do tétano (TeNT), produzida pela bactéria *Clostridium tetani*, por exemplo, é extremamente

potente e, sua ação inibitória de GABA ou de glicina dos interneurônios da medula espinhal, resulta em paralisia ou morte do hospedeiro (Pirazzini et al. 2016).

A toxina α (Hla) produzida por *S. aureus*, foi a primeira toxina bacteriana formadora de poros a ser descrita. Essa toxina se liga à membrana das células-alvo e interrompe processos metabólicos essenciais e, conseqüentemente, ocasiona a lise dos eritrócitos humanos (Lahiani et al. 2017). Essa bactéria produz três grupos de toxinas que prejudicam diretamente o hospedeiro: toxinas que modificam a membrana (funcionando de forma mediada ou independente do receptor), toxinas que interferem na função do receptor (não danificam a membrana) e enzimas secretadas que degradam as moléculas do hospedeiro ou afetam importantes mecanismos de defesa do hospedeiro (Kong et al. 2016; Acosta et al. 2017).

Em *Enterococcus* spp. a citolisina foi um dos principais fatores de virulência descobertos. Sua secreção danifica a membrana da célula hospedeira e facilita a infecção (Gao et al. 2018). Trata-se de uma toxina proteica modificada que é secretada para o meio extracelular na forma de duas subunidades estruturais (CylL-L e CylL-S). Os genes relacionados à produção da citolisina *cylLL*, *cylLS*, *cylM*, *cylB*, *cylA*, *cylI*, *cylR1* e *cylR2*, formam um *operon* que pode estar localizado em regiões de patogenicidade (Terra et al. 2018).

As bactérias Gram-negativas, por sua vez, apresentam como um dos seus principais fatores de virulência os sistemas de secreção (T1SS a T6SS). (Economou et al. 2006; Dalbey e Kuhn 2012). Enterobactérias são capazes de produzir esses sistemas como *E. coli*, que apresenta T6SS subdividido em três grupos: T6SS-1 a T6SS-3 (Russell et al., 2014). Enquanto *Proteus mirabilis* é capaz de produzir os tipos I, III, IV, V e VI, que fornecem cofatores e regulam o metabolismo intracelular. A hemolisina sintetizada por essa espécie, aparenta ser um fator de virulência significativo na patogênese dessa espécie, visto que cepas produtoras dessa toxina são mais letais e tóxicas para células do epitélio renal humano (Armbruster e Mobley 2012; Armbruster et al. 2017).

Providencia spp. representam outros patógenos humanos que produzem amplamente os sistemas de secreção, como o tipo III (T3SS), do qual proteínas (proteínas efetoras) podem manipular a atividade da célula hospedeira e toxinas podem ocasionar lise celular (Galac e Lazzaro 2012). Mais recentemente, Yuan et al. (2020) demonstraram as espécies do gênero *Providencia* como *P. alcalifaciens*, *P. rettgeri* e *P. stuartii*, podem adquirir genes por Transferência Horizontal de Genes (THG) e transcrever os componentes de quase todos os

sistemas de secreção (T1SS, T3SS, T4SS e T6SS). No entanto, destacam o tipo T4SS que, pode transportar substratos nas células hospedeiras e favorecer a adaptação bacteriana, e o tipo T6SS dividido em: T6SS-1, envolvido na formação de biofilme, T6SS-2 com a colonização, sobrevivência ou invasão e T6SS-3 como antibacterianos.

Nas espécies de *Pseudomonas* vários fatores de virulência permite adesão em superfícies de tecidos causando danos, facilitando sua disseminação e fornecimento de nutrientes e aumentando sua taxa de sobrevivência (Santajit et al. 2019). Um desses fatores é a Exotoxina A, que é o fator de virulência mais tóxico da bactéria patogênica. O mecanismo de regulação da toxina é complexo e não totalmente compreendido até o momento. Diferentes estudos estabeleceram uma relação entre a toxina e o metabolismo do ferro. A absorção eficiente de ferro é um fator importante para a colonização do hospedeiro (Michalska e Wolf 2015).

Apesar das endotoxinas serem essenciais para muitas espécies Gram-negativas, algumas consegue sobreviver em sua ausência, como é o caso da *A. baumannii* (Sperandeo et al. 2017). Outro exemplo é *K. pneumoniae*, que embora a presença do LPS contribua para o seu perfil de virulência, outros fatores como a síntese de polissacarídeo capsular também desempenham importantes papéis na sua patogenicidade (Aytenfisu et al. 2019).

Características Gerais das Cápsulas Bacterianas

As cápsulas, geralmente, são formadas por polissacarídeos e revestem algumas espécies de bactérias. Essas estruturas não são essenciais para a viabilidade celular, no entanto, micro-organismos encapsulados podem causar infecções mais graves uma vez que reduzem a resposta imune do hospedeiro. A proteção propulsão pelas cápsulas pode facilitar tanto a disseminação de bactérias de um hospedeiro para outro quanto aumentar as complicações dos quadros infecciosos (Singh et al. 2011; Champion et al. 2018).

As bactérias capsuladas são mais virulentas do que as não capsuladas e apresentam maior capacidade de invadir os tecidos (Rendueles et al. 2018), uma vez que as cápsulas são responsáveis por bloquear o componente 3 (C3) do sistema complemento interferindo, assim, na resposta imune. As cápsulas ao protegerem as células bacterianas das espécies reativas de oxigênio geradas pelo hospedeiro e evitar a fagocitose por macrófagos, consequentemente, impedem a ação bactericida de peptídeos antimicrobianos do hospedeiro. Dentre as diversas vantagens que elas fornecem observa-se também a regulação negativa das citocinas pró-

inflamatórias que, normalmente, atuam promovendo o processo inflamatório e garantindo que as reações ocorram e o agente invasor seja eliminado (Hiemstra et al. 2016; Rendueles et al. 2017).

Cepas de *K. pneumoniae*, por exemplo, que não possuem a capacidade de sintetizar a cápsula são bem menos virulentas do que as encapsuladas isogênicas em modelos de camundongos. Além disso, as cepas hipervirulentas de *K. pneumoniae* produzem uma hipercápsula, também conhecida como hipermucoviscosidade, que consiste em um revestimento bacteriano de exopolissacarídeo mucoviscoso mais robusto do que a cápsula típica. Esta hipercápsula pode contribuir significativamente para a hipervirulência em *K. pneumoniae* (Paczosa e Mecsas 2016).

Cápsulas também podem ser sintetizadas por bactérias Gram-positivas como ocorre em *E. faecalis*. A biossíntese do polissacarídeo capsular dessa espécie é codificada pelo operon *cps*, que inclui 11 genes, entretanto, apenas sete destes são essenciais para a produção de cápsula (*cpsC*, *cpsD*, *cpsE*, *cpsG*, *cpsI*, *cpsJ* e *cpsK*). Evidências genéticas prévias demonstraram que isolados de *E. faecalis* podem ser classificados em 1 dos 3 polimorfismos do operon *cps*: CPS 1 apresenta apenas *cpsA* e *cpsB*, enquanto que o CPS 2 apresenta todos os 11 genes do operon *cps* e CPS 5 apresenta todos os genes, exceto *cpsF*. CPS 2 e 5 expressam o polissacarídeo capsular, enquanto que CPS 1 não apresenta expressão. A presença de cápsula tem sido associada a linhagens patogênicas de *E. faecalis* isolados de pacientes hospitalizados (Saffari et al. 2017).

Os polissacarídeos capsulares também são produzidos por cepas de *Streptococcus pneumoniae*, em que a cápsula representa o seu principal fator de virulência (Kallin 1998). Outro exemplo de Gram-positivos encapsulados são os sorotipos CP5 e CP8 de *S. aureus*, que são os mais frequentes e codificados por genes cromossômicos (Singh 2011; Acosta et al. 2017). As cápsulas têm se mostrado um importante fator de virulência e podem ser investigadas como um alvo para o desenvolvimento de intervenções terapêuticas, assim como os íons metálicos que podem atuar como substâncias necessárias para o metabolismo bacteriano.

Capacidade de absorção de íons metálicos

Alguns metais como o Cobre (Cu), Ferro (Fe) e o Zinco (Zn) atuam como micronutrientes fundamentais para inúmeros sistemas biológicos, possuindo importância inquestionável para

sobrevivência de vários organismos, incluindo os patógenos bacterianos. A absorção de íons metálicos como o Fe^+ e o Zn^+ é vital para algumas bactérias, enquanto outros são citotóxicos (Hg^+ e Cu^+) sendo absorvidos acidentalmente por esses micro-organismos (Prince e Boyd 2020).

A literatura revela que dependendo do íon metálico ou de sua concentração, vários processos metabólicos em bactérias podem ser inibidos ou estimulados. Isso indica a existência de mecanismos de regulação homeostática destes íons. Proteínas reguladoras dependentes de metais (metáloreguladores) atuam mantendo a homeostase do metal, detectando a biodisponibilidade dos íons metálicos, controlando a transcrição dos genes envolvidos na importação, armazenamento, distribuição e fluxo iônico. Estes sensores interagem de forma reversível com um ou mais íons metálicos, alterando a afinidade da proteína reguladora para sequências específicas de DNA (Cotruvo e Stubbe 2012).

É importante ressaltar que, ao contrário de outros tipos de nutrientes essenciais, os íons metálicos não são bioquimicamente sintetizados e não podem ser degradados, portanto, a homeostase depende principalmente da modulação de transporte tanto para meio intracelular quanto extracelular. Alguns desses íons, como o Fe^+ , são essenciais em quantidades consideráveis para manter os inúmeros processos bioquímicos das bactérias em perfeito funcionamento, outros como o Zn^+ são necessários apenas em pequenas quantidades (Gonzalez et al. 2019). Quando presente em excesso em uma célula, o zinco tende a ocupar sítios de ligação inespecíficos, competir com outros metais essenciais ou interromper os sistemas de transporte de elétrons e, conseqüentemente, interromper importantes vias metabólicas e celulares (Capdevila et al. 2016).

Nas bactérias, baixas quantidades de metais ativam as vias que estão envolvidas na importação e mobilização, enquanto o excesso de metais induz efluxo e armazenamento (Chandrangsu et al. 2017). Alguns trabalhos relatam que os hospedeiros de bactérias patogênicas utilizam um mecanismo de controle conhecido como imunidade nutricional, essa estratégia utiliza-se da privação de nutrientes ou intoxicação por metais para combater tal agente patogênico (Henningar e McClung 2016; Vaidya et al. 2018). Kaur et al. (2020) observaram que *A. baumannii* apresenta um sistema especializado para manutenção das concentrações dos metais em condições fisiopatológicas, sendo capaz de driblar uma eventual imunidade nutricional do hospedeiro. Esse sistema é composto pela proteína Multicopper

Oxidase (MCOs) que, segundo os autores, consiste em importante componente da máquina de homeostase de íons metálicos nessa bactéria.

Rizvi et al. (2020) mostram que bactérias como *P. aeruginosa* e *Bacillus subtilis* são eficientes na remoção de alguns íons metálicos. Enquanto, Fathollahi et al. (2021) demonstram que concentrações elevadas de metais interferem no metabolismo bacteriano reduzindo o potencial de biofilme. Assim, esses estudos demonstram que é crucial o equilíbrio homeostático, pois a frequente exposição a metais indesejáveis resulta no desenvolvimento de alternativas de sobrevivência como a produção de biofilme (Araújo et al. 2019).

Fimbrias adesinas

Os fatores de virulência presentes nas superfícies de bactérias patogênicas, incluindo os diferentes tipos de proteínas filamentosas denominadas adesinas fimbriais, podem promover a adesão celular e o desenvolvimento do biofilme. Geralmente, as fimbrias se diferenciam dos flagelos pelo tamanho e diâmetro, além disso, não são responsáveis pela mobilidade da célula bacteriana. Existem uma variedade de fimbrias, especialmente nas bactérias Gram-negativas, que interagem com receptores específicos presentes nas superfícies inertes e nas células do hospedeiro (Zamani e Salehzadeh 2018).

Dentre a variedade de fimbrias responsáveis pela adesão bacteriana se destacam as do tipo 1, que podem reconhecer receptores glicoproteicos que contêm resíduos de manose. Essas são heteropolímeros formadas pela subunidade principal FimA e três subunidades auxiliares: FimF, FimG e FimH. Outras adesinas fimbriais comuns são as do tipo P, que se ligam a receptores glicolípidos e apresentam como componente principal o PapA, subunidades adaptadoras e PapG terminal. Além dessas, também se destacam as do tipo 3, que se ligam ao substrato alvo usando a subunidade MrkD associada à haste fimbrial que constitui a proteína MrkA (Zamani e Salehzadeh 2018; Alkhudhairya et al. 2019). Em várias espécies da família *Enterobacteriaceae* são identificados genes codificadores de fimbrias, bem como em bactérias de outras famílias, como é o caso de *A. baumannii* (Tavakol et al. 2018) e *Pseudomonas aeruginosa*, que sintetiza os pili do tipo IV para auxiliar na adesão à superfície (Lavery et al. 2014).

As fimbrias do tipo 1 são amplamente identificadas em cepas *Escherichia coli* Uropatogênica (UPEC), sendo um dos fatores de virulência relevantes na adesão desses patógenos no trato urinário (Zamani e Salehzadeh 2018). Essas fimbrias também são

identificados em outras enterobactérias como *Samonella* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* ssp. entre outras (Zeiner et al. 2012; Melo et al. 2014; Azevedo et al. 2018). Da mesma forma, as fímbrias do tipo 3 são encontradas em bactérias desta família como, por exemplo, *Citrobacter* spp e *Proteus* spp (Ong et al. 2010, Armbruster et al. 2017).

Hancock et at. (2011) ao investigarem a formação de biofilme de *E. coli* e de *K. pneumoniae* observaram que o biofilme de uma determinada espécie é dependente da condição experimental. Além disso, ressaltaram que para a formação de biofilme é essencial o equilíbrio de fatores genéticos como a expressão de fímbrias e fatores bioquímicos como a disponibilidade de nutrientes, as características da superfície aderente e do meio de crescimento. Posteriormente, foi demonstrado que a interação desses patógenos com células hospedeiras é mediada pela expressão de múltiplas fímbrias (Alcántar-Curiel et al. 2013; Izquierdo et al. 2014).

As bactérias que, normalmente, causam infecções do trato urinário como *P. mirabilis* e *E. coli*, são capazes de se aderir às células da mucosa urinária por expressar diferentes tipos de fímbrias durante o processo infeccioso. Esses micro-organismos resistem às forças hidrodinâmicas, derivadas do efeito de urinar, por se aderir fortemente ao tecido epitelial da bexiga (Armbruster e Mobley 2012; Cordeiro et al. 2016). A aderência de *P. mirabilis* em superfícies bióticas e abióticas pode ser mediada pela expressão de 17 fímbrias distintas, especialmente, as fímbrias do tipo MR/P (Armbruster et al. 2017). Os estudos sobre os fatores que contribuem para a formação de biofilme são relevantes, uma vez que podem ser descobertos novos alvos e desenvolvidas novas estratégias terapêuticas como fármacos antiadesivos (Krammer et al. 2018).

Biofilme

O biofilme se inicia pela adesão microbiana a uma superfície, onde ocorre proliferação e formação de uma comunidade (Tretin et al. 2013). Estes, em estágios iniciais e de maturação são regulados por sinalizações químicas denominadas Quorum-Sensing (QS). Essa regulação leva a uma mudança geral na expressão gênica, aumentando a virulência, acelerando o ganho de resistência a antimicrobianos, permitindo que os micro-organismos tenham uma resposta unificada, facilitando a disseminação de mutações benéficas e melhorando o acesso a nutrientes.

Desse modo, o biofilme favorece adaptação a mudanças ambientais adversas (Verderosa al. 2019; Gebreyohannes et al. 2019).

A maior parte do biofilme é composta por exopolissacarídeos (EPS), mas também contém água, lipídeos, ácido nucleico e proteínas extracelulares, formando uma arquitetura porosa e com canais que permitem a passagem de nutrientes. A formação de biofilme depende de várias condições como os tipos de micro-organismos envolvidos, as superfícies de adesão, pH e temperatura. Além disso, pode ser influenciada por vários processos como, por exemplo, estresse causado por ambientes desfavoráveis (Flemming et al. 2016; Gebreyohannes et al. 2019; Vestby et al. 2020).

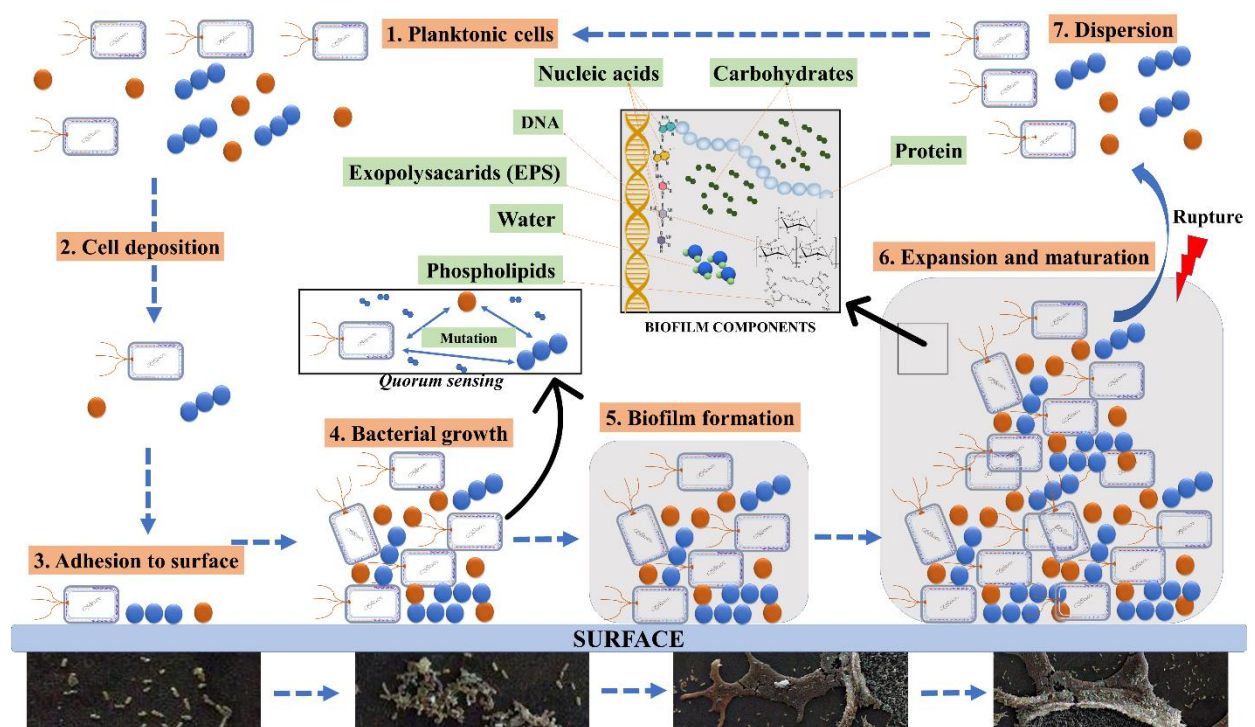


Figura 2. Imagens esquemáticas e de microscopia de varredura das fases de formação do biofilme. 1: Células bacterianas na forma livre ou dispersas do biofilme; 2 e 3: bactérias na fase inicial de adesão e no estágio reversível; 4: fase de comunicação celular com início do estágio irreversível; 5: biofilme na fase de maturação e no estágio irreversível; 6: biofilme robusto; 7: rompimento do biofilme e dispersão celular.

Dentre os patógenos formadores de biofilme mais comumente associados a infecções humanas encontra-se *K. pneumoniae*, que pode produzir uma camada espessa de biofilme e, comumente, expressa fímbrias tipo 1 e tipo 3, além de cápsulas que facilitam a aderência às células epiteliais e imunes, bem como a superfícies inanimadas (Alcántar-Curiel et al. 2013; Bandeira et al. 2017; Piperaki et al. 2017). Outro exemplo é *P. aeruginosa*, capaz de se aderir a

equipamentos médicos e tecidos hospedeiros utilizando de flagelos, pili e fímbrias, que contribuem para sua adesão inicial e perpetuação (Pinto 2011; Laila e Santos 2016). *A. baumannii* também se destacam na formação de biofilme, utilizando uma série de fatores físico-químicos e genéticos e persistindo em ambientes desfavoráveis (Lemos et al. 2013; McConnell et al. 2012).

Além destes patógenos, *Providencia stuartii* é capaz de se aderir e invadir células epiteliais de forma eficaz de acordo com seu estágio de crescimento (Kurmasheva et al. 2018). Entretanto, poucos estudos associam algum mecanismo envolvido com desenvolvimento do biofilme nessa espécie (El-Khatib et al. 2017; El-Khatib et al. 2018). Já em *E. cloacae* e a *E. hormoaechei*, o biofilme é um fator de virulência que merece destaque, especialmente, em pacientes hospitalizados, que fazem uso de dispositivos clínicos. Sua formação pode ser desencadeada por flagelos, genes codificadores de adesinas do tipo 1 e tipo 3, que desempenham um papel chave na adesão bacteriana e formação de biofilme (Davin-Regli et al. 2019).

Quanto aos patógenos Gram-positivos, *S. aureus* é uma das bactérias formadoras de biofilme mais comuns em infecções hospitalares. O desenvolvimento do seu biofilme ocorre em várias fases e sua adesão inicial depende de moléculas da sua superfície como a mureína hidrolase AtlA, proteínas de ligação a fibronectina e ácidos teicóicos (Gebreyohannes et al., 2019). *E. faecium* é a segunda espécie do gênero mais frequente e é considerada um dos patógenos prioritários. Além de fatores externo, a formação de biofilme possui vários genes e proteínas envolvidos na sua formação, que participam desde a adesão inicial como EbpABC, Esp, BepA e proteínas do grupo PTS, bem como, o gene *AtlA*, que tem papel fundamental na sua maturação (Gao et al. 2018; Ch'ng et al. 2019).

A maioria dos micro-organismos na natureza vivem na forma de biofilmes representando, assim, um desafio considerável para as equipes médicas. O principal desafio consiste na elevada tolerância às respostas imunológicas do hospedeiro e consequente aumento da morbidade e mortalidade em ambientes hospitalares (Tretin et al. 2013; Rumbaugh e Sauer 2020). Os biofilmes são variáveis entre as diferentes espécies, envolvendo uma série de fatores internos e externos. Portanto, é fundamental o conhecimento de sua dinâmica de formação, para o desenvolvimento de estratégias de controle e de novos alvos terapêuticos (Verderosa et al. Lima et al. 2020).

Conclusão

As bactérias patogênicas representam um grave problema de saúde pública, devido aos diferentes fatores de patogenicidade e virulência. O conjunto de informações apresentadas pelo presente estudo revela a crescente capacidade de adaptação dessas espécies e a problemática do tratamento e controle das mesmas. A compreensão da dinâmica de virulência desses patógenos é importante para ajudar nas estratégias de monitoramento, combate e prevenção no ambiente hospitalar e na comunidade.

Referências

- Acosta AC, Costa MM, Pinheiro Junior JW, Mota RA (2017) Fatores de virulência de *Staphylococcus aureus*. *Medicina Veterinária* 11:252-269.
- Alcántar-Curiel MD, Blackburn D, Saldaña Z, Gayosso-Vázquez C, Iovine NM, De la Cruz MA, Girón JA (2013) Multi-functional analysis of *Klebsiella pneumoniae* fimbrial types in adherence and biofilm formation. *Virulence* 4:129-38. <https://doi.org/10.4161/viru.22974>
- Alkhudhairy MK, Alshadeedi SMJ, Mahmood SS, Al-Bustan SA, Ghasemian A (2019) Comparison of adhesin genes expression among *Klebsiella oxytoca* ESBL-non-producers in planktonic and biofilm mode of growth, and imipenem sublethal exposure. *Microb Pathog* 134:103558. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103558>
- Araújo LCA, Purificação-Júnior AF, Silva SM, Lopes ACS, Veras DL, Alves LC, Santos FB, Napoleão TH, Santos Correia MT, Silva MV, Oliva MLV, Oliveira MBM (2019) In vitro evaluation of mercury (Hg²⁺) effects on biofilm formation by clinical and environmental isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Ecotoxicol Environ Saf* 169:669-677. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.11.036>
- Armbruster CE, Mobley HL (2012) Merging mythology and morphology: the multifaceted lifestyle of *Proteus mirabilis*. *Nat Rev Microbiol* 10:743-754. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2890>
- Armbruster CE, Mobley HLT (2018) Pearson MM. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* Infection. *EcoSal Plus* 8(1). <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0009-2017>
- Auer GK, Weibel DB (2017) Bacterial Cell Mechanics. *Biochemistry* 56:3710-3724. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b00346>
- Aytenfisu AH, Simon R, MacKerell AD Jr (2019) Impact of branching on the conformational heterogeneity of the lipopolysaccharide from *Klebsiella pneumoniae*: Implications for vaccine design. *Carbohydr Res* 475:39-47. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2019.02.003>

- Azevedo PAA, Furlan JPR, Oliveira-Silva M, Nakamura-Silva R, Gomes CN, Costa KRC, Stehling EG, Pitondo-Silva A (2018) Detection of virulence and β -lactamase encoding genes in *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae* clinical isolates from Brazil. *Braz J Microbiol* 1:224-228. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2018.04.009>
- Bandeira M, Borges V, Gomes JP, Duarte A, Jordao L (2017) Insights on *Klebsiella pneumoniae* Biofilms Assembled on Different Surfaces Using Phenotypic and Genotypic Approaches. *Microorganisms* 5:16. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5020016>
- Barakat MM, Dallal Bashi YH, Carson L, Graham WG, Gilmore BF, Flynn PB (2019) Atmospheric pressure non-thermal plasma exposure reduces *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide toxicity in vitro and in vivo. *Microb Pathog* 136:103679. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103679>
- Begg SL (2019) The role of metal ions in the virulence and viability of bacterial pathogens. *Biochem Soc Trans* 47:77-87. <https://doi.org/10.1042/BST20180275>
- Behzadi P (2020) Classical chaperone-usher (CU) adhesive fimbriome: uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) and urinary tract infections (UTIs). *Folia Microbiol (Praha)* 65:45-65. doi: <https://doi.org/10.1007/s12223-019-00719-x>
- Capdevila DA, Wang J, Giedroc DP (2016) Bacterial Strategies to Maintain Zinc Metallostasis at the Host-Pathogen Interface. *J Biol Chem* 291:20858-20868. <https://doi.org/10.1074/jbc.R116.742023>
- Champion AE, Bandara AB, Mohapatra N, Fulton KM, Twine SM, Inzana TJ (2018) Further Characterization of the Capsule-Like Complex (CLC) Produced by *Francisella tularensis* Subspecies *tularensis*: Protective Efficacy and Similarity to Outer Membrane Vesicles. *Front Cell Infect Microbiol* 8:182. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00182>
- Chandrangsu P, Rensing C, Helmann JD (2017) Metal homeostasis and resistance in bacteria. *Nat Rev Microbiol* 15:338-350. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.15>
- Ch'ng JH, Chong KKL, Lam LN, Wong JJ, Kline KA (2019) Biofilm-associated infection by enterococci. *Nat Rev Microbiol* 17:82-94. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0107-z>
- Claessen D, Errington J (2019) Cell Wall Deficiency as a Coping Strategy for Stress. *Trends Microbiol* 27:1025-1033. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.07.008>
- Cordeiro MA, Werle CH, Milanez GP, Yano T (2016) Curli fimbria: an *Escherichia coli* adhesin associated with human cystitis. *Braz J Microbiol* 47:414-416. <https://doi.org/doi:10.1016/j.bjm.2016.01.024>
- Cotruvo JA Jr, Stubbe J (2012) Metallation and mismetallation of iron and manganese proteins in vitro and in vivo: the class I ribonucleotide reductases as a case study. *Metallomics* 4:1020-1036. <https://doi.org/10.1039/c2mt20142a>

Crosby HA, Bion JF, Penn CW, Elliott TS (1994) Antibiotic-induced release of endotoxin from bacteria in vitro. *J Med Microbiol* 40:23-30. <https://doi.org/10.1099/00222615-40-1-23>.

Dalbey RE, Kuhn A (2012) Protein traffic in Gram-negative bacteria--how exported and secreted proteins find their way. *FEMS Microbiol Rev* 36:1023-45. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00327.x>

Davin-Regli A, Lavigne JP, Pagès JM. (2019) *Enterobacter* spp.: Update on Taxonomy, Clinical Aspects, and Emerging Antimicrobial Resistance. *Clin Microbiol Rev* 32:e00002-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00002-19>

Economou, A., Christie, P. J., Fernandez, R. C., Palmer, T., Plano, G. V., and Pugsley, A. P. (2006). Secretion by numbers: protein traffic in prokaryotes. *Mol. Microbiol.* 62, 308–319.

El-Khatib M, Nasrallah C, Lopes J, Tran QT, Tetreau G, Basbous H, Fenel D, Gallet B, Lethier M, Bolla JM, Pagès JM, Vivaudou M, Weik M, Winterhalter M, Colletier JP (2018) Porin self-association enables cell-to-cell contact in *Providencia stuartii* floating communities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115:E2220-E2228. <https://doi.org/10.1073/pnas.1714582115>

El Khatib M, Tran QT, Nasrallah C, Lopes J, Bolla JM, Vivaudou M, Pagès JM, Colletier JP (2017) *Providencia stuartii* form biofilms and floating communities of cells that display high resistance to environmental insults. *PLoS One* 12:e0174213. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174213>

Fathollahi A, Khasteganan N, Coupe SJ, Newman AP (2021) A meta-analysis of metal biosorption by suspended bacteria from three phyla. *Chemosphere* 268:129290. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129290>

Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S (2016) Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol* 14:563-75. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>

Galac MR, Lazzaro BP. Comparative genomics of bacteria in the genus *Providencia* isolated from wild *Drosophila melanogaster*. *BMC Genomics* 13:612. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-612>

Gao W, Howden BP, Stinear TP (2018) Evolution of virulence in *Enterococcus faecium*, a hospital-adapted opportunistic pathogen. *Curr Opin Microbiol* 41:76-82. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.11.030>

Gebreyohannes G, Nyerere A, Bii C, Sbhatu DB (2019) Challenges of intervention, treatment, and antibiotic resistance of biofilm-forming microorganisms. *Heliyon* 19:e02192. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02192>

Gonzalez MR, Ducret V, Leoni S, Perron K (2019) *Pseudomonas aeruginosa* zinc homeostasis: Key issues for an opportunistic pathogen. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech* 1862:722-733. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2018.01.018>

- Hancock V, Witsø IL, Klemm P (2011) Biofilm formation as a function of adhesin, growth medium, substratum and strain type. *Int J Med Microbiol* 301:570-6. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2011.04.018>
- Hiemstra PS, Amatngalim GD, van der Does AM, Taube C (2016) Antimicrobial Peptides and Innate Lung Defenses: Role in Infectious and Noninfectious Lung Diseases and Therapeutic Applications. *Chest* 149:545-551. <https://doi.org/10.1378/chest.15-1353>
- Izquierdo M, Navarro-Garcia F, Nava-Acosta R, Nataro JP, Ruiz-Perez F, Farfan MJ (2014) Identification of cell surface-exposed proteins involved in the fimbria-mediated adherence of enteroaggregative *Escherichia coli* to intestinal cells. *Infect Immun* 82:1719-1724. <https://doi.org/10.1128/IAI.01651-13>
- Jamal M, Ahmad W, Andleeb S, Jalil F, Imran M, Nawaz MA, Hussain T, Ali M, Rafiq M, Kamil MA (2018) Bacterial biofilm and associated infections. *J Chin Med Assoc* 81:7-11. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.07.012>
- Kalin M (1998) Pneumococcal serotypes and their clinical relevance. *Thorax* 53:159-62. <https://doi.org/10.1136/thx.53.3.159>
- Kandari D, Joshi H, Bhatnagar R (2021) Zur: Zinc-Sensing Transcriptional Regulator in a Diverse Set of Bacterial Species. *Pathogens* 10:344. <https://doi.org/10.3390/pathogens10030344>
- Kaur K, Sidhu H, Capalash N, Sharma P (2020) Multicopper oxidase of *Acinetobacter baumannii*: Assessing its role in metal homeostasis, stress management and virulence. *Microb Pathog* 143:104124. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104124>
- Kim SK, Lee JH (2016) Biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Microbiol* 54:71-85. <https://doi.org/10.1007/s12275-016-5528-7>.
- Kong C, Neoh HM, Nathan S (2016) Targeting *Staphylococcus aureus* Toxins: A Potential form of Anti-Virulence Therapy. *Toxins (Basel)* 8:72. <https://doi.org/10.3390/toxins8030072>
- Krammer EM, de Ruyck J, Roos G, Bouckaert J, Lensink MF (2018) Targeting Dynamical Binding Processes in the Design of Non-Antibiotic Anti-Adhesives by Molecular Simulation-The Example of FimH. *Molecules* 23:1641. <https://doi.org/10.3390/molecules23071641>
- Kurmasheva N, Vorobiev V, Sharipova M, Efremova T, Mardanova A (2018) The potential virulence factors of *Providencia stuartii*: motility, adherence, and invasion. *Biomed Res Int* 2018:3589135. <https://doi.org/10.1155/2018/3589135>
- Lahiani A, Yavin E, Lazarovici P (2016) The Molecular Basis of Toxins Interactions with Intracellular Signaling via Discrete Portals. *Toxins (Basel)* 9:107. <https://doi.org/10.3390/toxins9030107>

Laila HJEA, Santos RCV (2016) General aspects and molecular mechanisms involved in the formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*. *Disciplinarum Scientia. Série: Ciências da Saúde* 17:125-144.

Laverty G, Gorman SP, Gilmore BF (2014) Biomolecular Mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* Biofilm Formation. *Pathogens* 3:596-632. <https://doi.org/10.3390/pathogens3030596>

Leitão JH (2020) Microbial Virulence Factors. *International Journal of Molecular Sciences* 21:5320. <https://doi.org/10.3390/ijms21155320>

Lemos EV, de la Hoz FP, Einarson TR, McGhan WF, Quevedo E, Castañeda C, Kawai K (2014) Carbapenem resistance and mortality in patients with *Acinetobacter baumannii* infection: systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect* 20:416-23. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12363>

Levinson W (2010) *Microbiologia Médica e Imunologia*. MC Graw-Hill, Porto Alegre

Lima AVA, Silva SM, Nascimento Júnior JAA, Correia MDS, Luz AC, Leal-Balbino TC, Silva MV, Lima JLDC, Maciel MAV, Napoleão TH, Oliveira MBM, Paiva PMG (2020) Occurrence and Diversity of Intra- and Interhospital Drug-Resistant and Biofilm-Forming *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Drug Resist* 26:802-814. <https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0214>

Maldonado RF, Sá-Correia I, Valvano MA (2016) Lipopolysaccharide modification in Gram-negative bacteria during chronic infection. *FEMS Microbiol Rev* 40:480-93. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw007>

Martin RM, Bachman MA (2018) Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Front Cell Infect Microbiol* 8:4. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00004>

McCarthy RR, Mazon-Moya MJ, Moscoso JA, Hao Y, Lam JS, Bordi C, Mostowy S, Filloux A (2017) Cyclic-di-GMP regulates lipopolysaccharide modification and contributes to *Pseudomonas aeruginosa* immune evasion. *Nat Microbiol* 6:17027. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.27>

McConnell MJ, Actis L, Pachón J (2013) *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS Microbiol Rev* 37:130-55. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00344.x>

Michalska M, Wolf P (2015) *Pseudomonas* Exotoxin A: optimized by evolution for effective killing. *Front Microbiol* 6:963. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00963>

Mohajeri P, Sharbati S, Farahani A, Rezaei Z (2016) Evaluate the frequency distribution of nonadhesive virulence factors in carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* isolated

from clinical samples in Kermanshah. J Nat Sci Biol Med 7:58-61. <https://doi.org/10.4103/0976-9668.175071>

Mulani MS, Kamble EE, Kumkar SN, Tawre MS, Pardesi KR (2019) Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. Front Microbiol 10:539. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00539>

Naclerio GA, Onyedibe KI, Sintim HO (2020) Lipoteichoic Acid Biosynthesis Inhibitors as Potent Inhibitors of *S. aureus* and *E. faecalis* Growth and Biofilm Formation. Molecules 25:2277. <https://doi.org/10.3390/molecules25102277>

Oliveira AC, Paula AO, Iquiapaza R, Gama CS (2017) Profile of microorganisms associated with colonization and infection in intensive therapy. Journal of Epidemiology and Infection Control 7:1-6. <http://dx.doi.org/10.17058/reci.v7i2.8302>

Oliveira DMP, Forde BM, Kidd TJ, Harris PNA, Schembri MA, Beatson SA, Paterson DL, Walker MJ (2020) Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. Clin Microbiol Rev 33:e00181-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00181-19>.

Ong CL, Beatson SA, Totsika M, Forestier C, McEwan AG, Schembri MA (2010) Molecular analysis of type 3 fimbrial genes from *Escherichia coli*, *Klebsiella* and *Citrobacter* species. BMC Microbiol 10:183. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-183>

Otto M (2015) *Staphylococcus aureus* toxins. Curr Opin Microbiol 17:32-37. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.11.004>

Paczosa MK, Meccas J (2016) *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. Microbiol Mol Biol Rev 80:629-61. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00078-15>

Piperaki ET, Syrogiannopoulos GA, Tzouvelekis LS, Daikos GL (2017) *Klebsiella pneumoniae*: Virulence, Biofilm and Antimicrobial Resistance. Pediatr Infect Dis J 36:1002-1005. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000001675>

Pirazzini M, Azarnia Tehran D, Leka O, Zanetti G, Rossetto O, Montecucco C (2016) On the translocation of botulinum and tetanus neurotoxins across the membrane of acidic intracellular compartments. Biochim Biophys Acta 1858:467-474. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.08.014>

Price EE, Boyd JM (2020) Genetic Regulation of Metal Ion Homeostasis in *Staphylococcus aureus*. Trends Microbiol 28:821-831. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.04.004>

Pyclik M, Srutkova D, Schwarzer M, Górská S (2020) Bifidobacteria cell wall-derived exopolysaccharides, lipoteichoic acids, peptidoglycans, polar lipids and proteins - their chemical structure and biological attributes. Int J Biol Macromol 147:333-349. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.227>

Radkov AD, Hsu YP, Booher G, VanNieuwenhze MS (2018) Imaging Bacterial Cell Wall Biosynthesis. *Annu Rev Biochem* 87:991-1014. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-012921>

Rajagopal M, Walker S (2017) Envelope Structures of Gram-Positive Bacteria. *Curr Top Microbiol Immunol* 404:1-44. https://doi.org/10.1007/82_2015_5021

Rendueles O, Garcia-Garcerà M, Néron B, Touchon M, Rocha EPC (2017) Abundance and co-occurrence of extracellular capsules increase environmental breadth: Implications for the emergence of pathogens. *PLoS Pathog* 24:e1006525. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006525>

Rendueles O, Sousa JAM, Bernheim A, Touchon M, Rocha EPC (2018) Genetic exchanges are more frequent in bacteria encoding capsules. *PLoS Genet* 14:e1007862. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007862>

Rismondo J, Percy MG, Gründling A (2018) Discovery of genes required for lipoteichoic acid glycosylation predicts two distinct mechanisms for wall teichoic acid glycosylation. *J Biol Chem* 293:3293-3306. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA117.001614>

Rizvi A, Ahmed B, Zaidi A, Khan MS (2020) Biosorption of heavy metals by dry biomass of metal tolerant bacterial biosorbents: an efficient metal clean-up strategy. *Environ Monit Assess* 192:801. <https://doi.org/10.1007/s10661-020-08758-5>

Rohde M (2019) The Gram-Positive Bacterial Cell Wall. *Microbiol Spectr* 7:3. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0044-2018>

Rumbaugh KP, Sauer K (2020) Biofilm dispersion. *Nat Rev Microbiol* 18:571-586. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0385-0>

Russell AB, Wexler AG, Harding BN, Whitney JC, Bohn AJ, Goo YA, Tran BQ, Barry NA, Zheng H, Peterson SB, Chou S, Gonen T, Goodlett DR, Goodman AL, Mougous JD (2014) A type VI secretion-related pathway in *Bacteroidetes* mediates interbacterial antagonism. *Cell Host Microbe* 16:227-236. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.07.007>

Saffari F, Dalfardi MS, Mansouri S, Ahmadrajabi R (2017) Survey for Correlation between Biofilm Formation and Virulence Determinants in a Collection of Pathogenic and Fecal *Enterococcus faecalis* Isolates. *Infect Chemother* 49:176-183. <https://doi.org/10.3947/ic.2017.49.3.176>

Santajit S, Seesuy W, Mahasongkram K, Sookrung N, Pumirat P, Ampawong S, Reamtong O, Chongsang-Nguan M, Chaicumpa W, Indrawattana N (2020) Human Single-chain Variable Fragments Neutralize *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing Molecule, 3O-C12-HSL, and Prevent Cells From the HSL-mediated Apoptosis. *Front Microbiol* 11:1172. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01172>

Scala R, Di Matteo A, Coluccia A, Lo Sciuto A, Federici L, Travaglini-Allocatelli C, Visca P, Silvestri R, Imperi F (2020) Mutational analysis of the essential lipopolysaccharide-transport protein LptH of *Pseudomonas aeruginosa* to uncover critical oligomerization sites. *Sci Rep* 9:11276. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68054-7>

Shon AS, Bajwa RP, Russo TA (2013). Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed. *Virulence* 4:107-118. <https://doi.org/10.4161/viru.22718>

Singh A, Wyant T, Anaya-Bergman C, Aduse-Opoku J, Brunner J, Laine ML, Curtis MA, Lewis JP (2011) The capsule of *Porphyromonas gingivalis* leads to a reduction in the host inflammatory response, evasion of phagocytosis, and increase in virulence. *Infect Immun* 79:4533-42. <https://doi.org/10.1128/IAI.05016-11>

Sperandeo P, Martorana AM, Polissi A (2017) The lipopolysaccharide transport (Lpt) machinery: A nonconventional transporter for lipopolysaccharide assembly at the outer membrane of Gram-negative bacteria. *J Biol Chem* 292:17981-17990. <https://doi.org/10.1074/jbc.R117.802512>

Stubbe J, Cotruvo JA Jr (2011) Control of metallation and active cofactor assembly in the class Ia and Ib ribonucleotide reductases: diiron or dimanganese? *Curr Opin Chem Biol* 15:284-290. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2010.12.001>

Sweeney RP, Lowary TL (2019) New insights into lipopolysaccharide assembly and export. *Curr Opin Chem Biol* 53:37-43. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.07.004>

Szentirmai É, Massie AR, Kapás L (2021) Lipoteichoic acid, a cell wall component of Gram-positive bacteria, induces sleep and fever and suppresses feeding. *Brain Behav Immun* 92:184-192. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.12.008>

Tavakol M, Momtaz H, Mohajeri P, Shokoohzadeh L, Tajbakhsh E (2018) Genotyping and distribution of putative virulence factors and antibiotic resistance genes of *Acinetobacter baumannii* strains isolated from raw meat. *Antimicrob Resist Infect Control* 7:120. <https://doi.org/10.1186/s13756-018-0405-2>

Terra RM, Costa LC, Mucinhato RMD, Furlaneto MC, Furlaneto-Maia L (2018) Food as a potential reservoir of *Enterococcus* that host determinants of virulence and resistance. *Braz J Surg Clin Res* 22:86-93

Trentin DS, Giordani RB, Macedo AJ (2013) Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. *Revista Liberato* 22:113-238.

Vaidya MY, McBain AJ, Butler JA, Banks CE, Whitehead KA (2017) Antimicrobial Efficacy and Synergy of Metal Ions against *Enterococcus faecium*, *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* in Planktonic and Biofilm Phenotypes. *Sci Rep* 7:5911. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05976-9>

van der Es D, Berni F, Hogendorf WFJ, Meeuwenoord N, Laverde D, van Diepen A, Overkleeft HS, Filippov DV, Hokke CH, Huebner J, van der Marel GA, Codée JDC (2018) Streamlined Synthesis and Evaluation of Teichoic Acid Fragments. *Chemistry* 24:4014-4018. <https://doi.org/10.1002/chem.201800153>

van der Es D, Groenia NA, Laverde D, Overkleeft HS, Huebner J, van der Marel GA, Codée JDC (2016) Synthesis of *E. faecium* wall teichoic acid fragments. *Bioorg Med Chem* 24:3893-3907. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.03.019>

Verderosa AD, Totsika M, Fairfull-Smith KE (2019) Bacterial Biofilm Eradication Agents: A Current Review. *Front Chem* 28:824. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00824>

Vestby LK, Grønseth T, Simm R, Nesse LL (2020) Bacterial Biofilm and its Role in the Pathogenesis of Disease. *Antibiotics (Basel)* 3:59. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9020059>

WHO - World Health Organization 2017 Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis. WHO/EMP/IAU/2017.12

Wilson JW, Schurr MJ, LeBlanc CL, Ramamurthy R, Buchanan KL, Nickerson CA (2002) Mechanisms of bacterial pathogenicity. *Postgrad Med J* 78:216-224. <https://doi.org/10.1136/pmj.78.918.216>

Wu HJ, Wang AH, Jennings MP (2008) Discovery of virulence factors of pathogenic bacteria. *Curr Opin Chem Biol* 12:93-101. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2008.01.023>

Yuan C, Wei Y, Zhang S, Cheng J, Cheng X, Qian C, Wang Y, Zhang Y, Yin Z, Chen H (2020) Comparative Genomic Analysis Reveals Genetic Mechanisms of the Variety of Pathogenicity, Antibiotic Resistance, and Environmental Adaptation of *Providencia* Genus. *Front Microbiol* 11:572642. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.572642>

Zamani H, Salehzadeh A (2018) Biofilm formation in uropathogenic *Escherichia coli*: association with adhesion factor genes. *Turk J Med Sci* 48:162-167. <https://doi.org/10.3906/sag-1707-3>

Zeiner SA, Dwyer BE, Clegg S (2012) FimA, FimF, and FimH are necessary for assembly of type 1 fimbriae on *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun* 80:3289-96. <https://doi.org/10.1128/IAI.00331-12>

6 CONCLUSÃO

- Neste estudo, os isolados de *P. stuartii* avaliados apresentaram resistência para a maioria dos antimicrobianos especialmente aos betalactâmicos, possivelmente, devido à presença dos *aac(6')-Ib-cr* e *bla_{KPC}*, sendo assim menos eficazes para o tratamento de infecções causadas por esta espécie. Mas de modo geral, os isolados apresentaram menor resistência a amicacina e aztreonam, podendo estes serem uma opção de tratamento.
- Os resultados demonstram algumas especificidades de *P. stuartii* quanto ao seu potencial de formação de biofilme. A superfície celular hidrofílica desta bactéria indica que pode ocorrer a interação com a superfície abiótica investigada e, consequentemente, pode facilitar a interação célula-célula. Além disso, outros tipos de adesinas fimbriais ainda não relatadas na literatura podem estar relacionadas à sua formação de biofilme.
- Os trabalhos de revisão desta tese também demonstram que bactérias patogênicas utilizam uma diversidade de fatores de virulência revelando, assim, a problemática dos tratamentos clínicos e a necessidade de estratégias eficazes de monitoramento e prevenção.

REFERÊNCIAS

- ABDALLAH, M; BALSHI, A. First literature review of carbapenem-resistance *Providencia*. **New Microbes New Infect.** 4(25): 16-23, 2018.
- ABDALLAH, M. et al. First report of carbapenem-resistant *Providencia stuartii* in Saudi Arabia. **New Microbes New Infect.** 2018 Sep 20;26:107-109.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Medidas de prevenção e controle de infecções por enterobactérias multirresistentes. Brasília: ANVISA; 2013. 9 p.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Medidas de prevenção de infecção relacionada à assistência à saúde. Brasília (DF): Segurança do paciente e qualidade em serviços de saúde, 2017.
- AIRES, C. A. M. et al. Selection of KPC-2-producing *Providencia stuartii* during treatment for septicemia. **Diagn Microbiol Infect Dis.** 84:95-6, 2016.
- ALBORNOZ, E. et al. Analysis of plasmid-mediated quinolone resistance genes in clinical isolates of the tribe Proteaeae from Argentina: First report of qnrD in the Americas. **J Glob Antimicrob Resist.** 2(4), 322 - 326, 2014.
- ALKHUDHAIRY, M. K. et al. Comparison of adhesin genes expression among *Klebsiella oxytoca* ESBL-non-producers in planktonic and biofilm mode of growth, and imipenem sublethal exposure. **Microbial Pathogenesis**, v. 134. 103558, 2019.
- ALMEIDA, W. B. et al. Infecção hospitalar: controle e disseminação nas mãos dos profissionais de saúde de uma Unidade de Terapia. **Revista Eletrônica Acervo Saúde.** v. 11, n. 2, p. 1–7, 2019.
- ALÓS, J. I. Antibiotic resistance: A global crisis. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 33, n. 10, p. 692–699, 2015.
- AMARETTI, A. et al. Antibiotic Resistance, Virulence Factors, Phenotyping, and Genotyping of Non-*Escherichia coli* Enterobacterales from the Gut Microbiota of Healthy Subjects. **Int J Mol Sci.** v. 21, p. 1847, 2020.
- AMBLER, R. P. The structure of b-lactamases. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.** 289:321–331, 1980.
- ARAÚJO, L. C. A. et al. In vitro evaluation of mercury (Hg²⁺) effects on biofilm formation by clinical and environmental isolates of *Klebsiella pneumoniae*. **Ecotoxicol Environ Saf.** v. 169, p. 669-677, 2019.
- ARMBRUSTER, C. E.; MOBLEY, H. L. T.; PEARSON, M. M. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* Infection. **EcoSal Plus.** 8(1), 2018.

AZEVEDO, P. A. A. et al. 2018. Detection of virulence and β -lactamase encoding genes in *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae* clinical isolates from Brazil. *Braz J Microbiol.* v. 49, p. 224-228, 2018.

BERLANGA, M.; UERRERO, R. Living together in biofilms: the microbial cell factory and its biotechnological implications. **Microb Cell Fact.** 15(1):165, 2016.

BHARUCHA, T. et al. *Ochromobactrum* intermedium: An emerging opportunistic pathogen - case of recurrent bacteraemia associated with infective endocarditis in a haemodialysis patient. **New Microbes New Infect.** 15, 14–15 (2017).

BLAIR, J. M. A. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 42–51, 2015.

Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - BrCAST. Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos de inibição. BrCAST – EUCAST, versão 10, 2020.

BUENO, J. V. C.; PIO, D. A. M.; CHIRELLI, M. Q. Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde: análise de um discurso multiprofissional em um Pronto-Socorro. **Investigação Qualitativa em Saúde.** v. 2, 2019.

BUSH, K.; FISHER, J. F. Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new β -lactamases from gram-negative bacteria. **Annual Review of Microbiology.** v. 65, p. 455-478, 2011.

BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** v. 39, n. 6, p. 1211-33, 1995.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of beta-lactamases. **Antimicrobial agents and chemotherapy.** v. 54, n. 3. 969-76, 2010.

CABRAL, A. B. et al. Detection of blaKPC-2 in *Proteus mirabilis* in Brazil. **Rev Soc Bra Med Trop**, v. 48, n. 1, p. 94-95, 2015.

CABRAL, A. B. et al. Multidrug resistance genes, including blaKPC and blaCTX-M-2, among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife, Brazil. **Rev Soc Bra Med Trop**, v.45, n. 5, p. 572-578, 2012.

CABRAL, A. B. et al. Clonal spread and accumulation of β -lactam resistance determinants in *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae* complex isolates from infection and colonization in patients at a public hospital in Recife, Pernambuco, Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 66, p. 70-77, 2017.

CARRARO-EDUARDO, J. C.; GAVA, I. A. Use of vaccines for prophylaxis of urinary tract infections. **J Bras Nefrol.** 34(2):178-183, 2012.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28th ed. Supplement M100. Wayne, PA, 2018.

CROUCHER, N. J. et al. Horizontal DNA Transfer Mechanisms of Bacteria as Weapons of Intragenomic Conflict. **PLOS Biology**. 14(3): 1–42, 2016.

EFTEKHAR, F.; SEYEDPOUR, S. M. Prevalence of *qnr* and *aac(6')-Ib-cr* genes in clinical isolates of *Klebsiella Pneumoniae* from Imam Hussein Hospital in Tehran. **Iran J Med Sci**. 40(6): 515-21, 2015.

EL-KHATIB, M. et al. Porin self-association enables cell-to-cell contact in *Providencia stuartii* floating communities. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 115, n. 10, p. E2220–E2228, 2018.

EL-KHATIB, M. et al. *Providencia stuartii* form biofilms and floating communities of cells that display high resistance to environmental insults. **PLoS ONE**, v. 12, n. 3, p. 1–17, 2017.

ELRAMALLI, A.; ALMSHAWT, N.; AHMED, M. O. Current challenges and emergence of carbapenemase-producing bacteria: a brief report from a Libyan hospital. **Pan Afr Med J**. v. 29; n. 26 p. 180, 2017.

ELSHAMY, A. A.; ABOSHANAB, K. M. A review on bacterial resistance to carbapenems: epidemiology, detection and treatment options. **Future Science OA**. 6(3): FSO438, 2020.

FERNANDES, R.; AMADOR, P.; PRUDÊNCIO, C. β -Lactams: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance. **Reviews in Medical Microbiology**. 24:7–17, 2013.

FLEMMING, H. C. et al. Biofilms: An emergent form of bacterial life. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 563–575, 2016.

FLEMMING, H.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Publishing Group**, v. 8, n. 9, p. 623–633, 2010.

GALANTE, J. et al. Quorum Sensing and Biofilms in the Pathogen, *Streptococcus pneumoniae*. **Current Pharmaceutical Design**, v. 21, n. 1, p. 25–30, 2014.

GIROTI, A. L. B. et al. Programas de Controle de Infecção Hospitalar: avaliação de indicadores de estrutura e processo. **Rev Esc Enfer USP**, v. 52, n. 0, p. 1–7, 2018.

GOMES, M. F.; MORAES, V. L. O programa de controle de infecção relacionada à assistência à saúde em meio ambiente hospitalar e o dever de fiscalização da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Revista de Direito Sanitário**, v. 18, n. 3, p. 43, 2018.

GUIMARÃES, D.O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quim. Nova**. Vol. 33, No. 3, 667-679, 2010.

HOARD, A. et al. Genomic Analysis of two NDM-1 *Providencia stuartii* Strains Recovered from a Single Patient. **Curr Microbiol.** 2020 Dec;77(12):4029-4036.

HOU, J. et al. Extracellular polymeric matrix production and relaxation under fluid shear and mechanical pressure in *Staphylococcus aureus* biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 1, p. 1–14, 2018.

HULTON, C. S.; HIGGINS, C. F.; SHARP, P. M. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. **Mol Microbiol**, v. 5, p. 825-34, 1991.

IRIE, Y. et al. The *Pseudomonas aeruginosa* PSL polysaccharide is a social but noncheatable trait in biofilms. **mBio**. 8(3): e00374-17, 2017.

KATZUNG, B. G; MASTERS, S. B.; TREVOR, A. J. **Farmacologia básica e clínica**. 12 ed. Porto Alegre: AMGH, 2014.

KHOSRAVI, A. D. et al. Molecular Identification of Clinical Isolates of *Mycobacterium fortuitum* by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Polymerase Chain Reaction and ERIC PCR. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 9, n. 12, p.DC01-DC05, 2015.

KHOSRAVI, A. D. et al. Genotyping of multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn and wound infections by ERIC-PCR. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 31, n. 3, 2016.

KOO, H. et al. Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. **Nat Rev Microbiol.** 2017 Dec;15(12):740-755.

KOTTWITZ, L. B.M.; OLIVEIRA, T. C. R. M. Methods of phenotypic and genotypic characterization of *Salmonella* Enteritidis and the usefulness of PFGE technique in epidemiologic studies. **Biosaúde**, v. 13, n. 1 / 2, 2011.

KRAUSE, K. M. et al. Aminoglycosides: An overview. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 6, n. 6, p. 1–18, 2016.

KRAMMER, E. M. et al. Targeting dynamical binding processes in the design of non-antibiotic anti-adhesives by molecular simulation - the example of FimH. **Molecules**, v. 23, n. 7, 2018.

KSENTINI, I. et al. *Providencia entomophila* sp. nov., a new bacterial species associated with major olive pests in Tunisia. **PLoS One**. 2019 Oct 22;14(10):e0223943.

KUMAR, A.; KUMAR, A.; PRATUSH, A. Molecular diversity and functional variability of environmental isolates of *Bacillus* species. **Springer Plus**. 3: 312, 2014.

KURMASHEVA, N. et al. The Potential Virulence Factors of *Providencia stuartii*: Motility, Adherence, and Invasion. **BioMed Research International**, v. 2018, 2018.

LIBERTUCCI, J. et al.. Bacteria Detected in both Urine and Open Wounds in Nursing Home Residents: a Pilot Study. **mSphere**. 2019 Aug 28;4(4):e00463-19.

LIMA, A. V. A. et al. Occurrence and Diversity of Intra- and Interhospital Drug-Resistant and Biofilm-Forming *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Microb Drug Resist**, v. 6, n. 7, p. 802-814, 2020.

LIMA, M. F. P. et al. *Staphylococcus aureus* And Nosocomial Infections - Literature Review. **Revista Uningá**, v. 21, n. 2178–2571, p. 32–39, 2015.

LIU, T. et al. Bacterial characterization of Beijing drinking water by flow cytometry and MiSeq sequencing of the 16S rRNA gene. **Ecology and Evolution**. 6(4): 923–934, 2016.

MACEDO, A.; ABRAHAM, W.R. Can Infectious Biofilm be Controlled by Blocking Bacterial Communication? **Medicinal Chemistry**. 5(6): 517-528, 2009.

MACÊDO, H. R. A. et al. Estudo da molhabilidade do titânio tratado termicamente. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**. v.5, p. 61-67, 2010.

MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 14 ed. Porto Alegre: ArtMed, 2016.

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**. 18(3): 268-81, 2012.

MAILLARD, J. Y.; MCBAIN, A. Biofilm in healthcare settings and their control. **Lett Appl Microbiol**. 68(4):268, 2019.

MAO, Y. C. et al. Laboratory investigation of a suspected outbreak caused by *Providencia stuartii* with intermediate resistance to imipenem at a long-term care facility. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 51, n. 2, p. 214–219, 2018.

MARTINS, W. M. B. S. et al. SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* ST277 clone recovered from microbiota of migratory birds. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 90, n. 3, p. 221–227, 2018.

MENEGUETI, M. G. et al. Evaluation of nosocomial infection control programs in health services. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 23, n. 1, p. 98–105, 2015.

MENEZES, J. M. R. M.; PORTO, M. L. S.; PIMENTA, C. L. R. M. Perfil da infecção bacteriana em ambiente hospitalar. **Rev. Ciênc. Méd. Biol**. v. 15, n. 2, p. 199-207, 2016.

MIRÓ, E. et al. Characterization of aminoglycoside-modifying enzymes in enterobacteriaceae clinical strains and characterization of the plasmids implicated in their diffusion. **Microbial Drug Resistance**, v. 19, n. 2, p. 94–99, 2013.

- MOHAJERI, P. et al. Evaluate the frequency distribution of nonadhesive virulence factors in carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* isolated from clinical samples in Kermanshah. **J Nat Sci Biol Med.** v. 7, p. 58-61, 2016
- MOLNÁR, S. et al. Dissemination of NDM-1 carbapenemase-producer *Providencia stuartii* strains in Romanian hospitals: a multicentre study. **J Hosp Infect.** 103(2):165-169, 2019.
- NAPARSTEK, L. et al. Biofilm formation and susceptibility to gentamicin and colistin of extremely drug-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 4, p. 1027–1034, 2014.
- NODARI, C. S.; BARTH, A. L. Antimicrobial resistance among enterobacteriaceae: focus on carbapenemase production. **Journal of Infection Control.** 5:1, 2016.
- NOGUEIRA SANTO, H. et al. Antibacterianos: Principais Classes, Mecanismos De Ação E Resistência. **Revista Unimontes Científica**, v. 18, n. 2, p. 96–108, 2016.
- NORDMANN, P.; DORTET, L.; POIREL, L. Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm. **Trends in Molecular Medicine**, v. 18, n. 5, p. 263–272, 2012.
- OLIVEIRA, A. C. et al. Perfil dos microrganismos associados à colonização e infecção em Terapia Intensiva. **Rev Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 7, n. 2, p. 1–6, 2017.
- OIKONOMOU, O. et al. *Providencia stuartii* Isolates from Greece: Co-Carriage of Cephalosporin (blaSHV-5, blaVEB-1), Carbapenem (blaVIM-1), and Aminoglycoside (rmtB) Resistance Determinants by a Multidrug-Resistant Outbreak Clone. **Microbial Drug Resistance**, v. 22, n. 5, p. 379–386, 2016.
- O'HARA, C. M., BRENNER, F. W.; MILLER, J. M. Classification, Identification, and Clinical Significance of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. **Clinical Microbiology Reviews.** 13(4): 534–546, 2000.
- PELLING, H. et al. Bacterial biofilm formation on indwelling urethral catheters. **Letters in Applied Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 277–293, 2019.
- PEREIRA, F. G. F. et al. Caracterização das infecções relacionadas à assistência à saúde em uma Unidade de Terapia Intensiva. **Vigilância Sanitária em Debate**, v. 4, n. 1, p. 70, 2016.
- PERNA, T. D. G. DA S. et al. Prevalência de infecção hospitalar pela bactéria do gênero *klebsiella* em uma unidade de terapia intensiva. **Rev. Soc. Bras. Clín. Méd.**, v. 13, n. 2, p. 119–123, 2015.
- PIRII L. E. et al. Extensive colonization with carbapenemase-producing microorganisms in Romanian burn patients: infectious consequences from the Colectiv fire disaster. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** 2018 Jan;37(1):175-183

REN, Y. et al. Emergent heterogeneous microenvironments in biofilms: Substratum surface heterogeneity and bacterial adhesion force-sensing. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 42, n. 3, p. 259–272, 2018.

ROJAS, G. C.; ULATE, L. A. Resistencia antimicrobiana: microorganismos más resistentes y antibióticos con menor actividad. **Rev. Med. de Costa Rica y Centroamerica**. 621: 757 - 763, 2016.

ROMERO, M.; ACUNA, L.; OTERO, A. Patents on Quorum Quenching: Interfering with Bacterial Communication as a Strategy to Fight Infections. **Recent Patents on Biotechnology**, 6(1), 2–12, 2012.

ROSENBERG, M.; GUTNICK, D.; ROSEMBERG, E. Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. **FEMS Microb. Letts**. v. 9, p. 29-33, 1980.

SAMBROOK, J. F.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: A laboratory manual**. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.

SANTIAGO, G. S. et al. Revisão: Produção de β -lactamases do Tipo AmpC em Enterobacteriaceae. **Rev. Bras. Med. Vet**, v. 38, p. 17-30, 2016.

SANTOS, D. V. A. et al. Antibiotics through the approach of mechanism of bacterial resistance. **Ciência Atual**. v. 11, n. 1, p. 02-14, 2018.

SANTOS, G. S. et al. Study of the *Enterobacteriaceae* Group CESP (*Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Providencia*, *Morganella* and *Hafnia*): A Review. **Published**, 2015.

SEIFI, K. Evaluation of Biofilm Formation Among *Klebsiella pneumoniae* Isolates and Molecular Characterization by ERIC-PCR. **Jundishapur J Microbiol**, v. 9, p. 30682, 2016.

SEYEDJAVADI, S. S.; GOUDARZI, M.; SABZEHALI, F. Relation between blaTEM, blaSHV and blaCTX-M genes and acute urinary tract infections. **Journal of Acute Disease**. 5 (1): 71-76, 2016.

SHIMA, A. et al. Prevalence of *Providencia* Strains among Patients with Diarrhea and in Retail Meats in Thailand. **Jpn J Infect Dis**. 69(4): 323-5, 2016.

SHUKLA, A. et al. Exemplifying an archetypal thorium-EPS complexation by novel thoriotolerant *Providencia thoriotolerans* AM3. **Sci Rep**. 2021 Feb 4;11(1):3189.

SILVA, F. H. et al. **Infecções relacionadas à assistência em saúde e suas correlações com os fatores de virulência microbianos**. 1 ed. São José dos Pinhais: Latin American Publicações, 2020.

SOUSA, A. F. F. L.; OLIVEIRA, L. B.; MOURA, M. E. B. Perfil epidemiológico das infecções hospitalares causadas por procedimentos invasivos em unidade de terapia intensiva. **Revista Prevenção de Infecção e Saúde**, v. 1, n. 4, p. 11, 2016.

STAHLHUT, S. G. et al 2009. Population variability of the FimH type 1 fimbrial adhesin in *Klebsiella pneumoniae*. **J Bacteriol**, v. 191, p. 1941-1950, 2009.

STEPANOVIC S. et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **Journal Compilation APMIS**. 115: 891, 2007.

SUÁREZ, C.; GUDIOL, F. Beta-lactam antibiotics. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 27, n. 2, p. 116–129, 2009.

TAVAKOL, M. et al. Genotyping and distribution of putative virulence factors and antibiotic resistance genes of *Acinetobacter baumannii* strains isolated from raw meat. **Antimicrob Resist Infect Control**. v. 7, n. 120, 2018.

TAVARES, C. P. et al. Molecular epidemiology of KPC-2–producing Enterobacteriaceae (non-*Klebsiella pneumoniae*) isolated from Brazil. **Diagn Microbiol Infect Dis**. 82(4): 326-30, 2015.

TRENTIN, D. S. et al. Surface & Coatings Technology N 2 / H 2 plasma surface modifications of polystyrene inhibit the adhesion of multidrug resistant bacteria. **Surface & Coatings Technology**, v. 245, p. 84–91, 2014.

TRENTIN, D. S. et al. Natural Green Coating Inhibits Adhesion of Clinically Important Bacteria. **Scientific Reports**. v. 5, n. 8287, 2015.

TRENTIN, D. S.; GIORDANI, R. B.; MACEDO, A. J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Revista Liberato**. v. 14, n. 22, p. 113-238, 2013.

UCHIYA, K. I. et al. *Salmonella* Fimbrial Protein FimH Is Involved in Expression of Proinflammatory Cytokines in a Toll-Like Receptor 4-Dependent Manner. **Infect Immun**. v. 87, p. 00881-18, 2019.

VELÔSO, S. D.; CAMPELO, V. Incidence of bacterial infections and antimicrobial profile used in the treatment of patients in a teaching hospital. **Rev. Interd. Ciên. Saúde**, v. 4, n.2, p. 19-28, 2017.

VON WINTERSDORFF, C. J. H. et al. Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. **Frontiers in Microbiology**. v. 7, p. 1–10, 2016.

WANG, Y.; LEE, S. M.; DYKES, G. The physicochemical process of bacterial attachment to abiotic surfaces: Challenges for mechanistic studies, predictability and the development of control strategies. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 452–464, 2015.

WEI, S. H. Clinical significance of *Providencia* bacteremia or bacteriuria. **Korean J Intern Med**, 30:167-169, 2015.

World Health Organization (WHO). Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis. Geneva: WHO; 2017. 77 p.

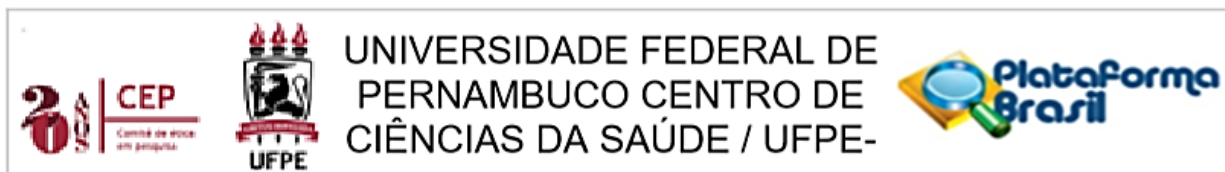
WILLIAM A.; PETRI, J. Penicilinas, cefalosporinas e outros antibióticos β -lactâmicos. In: BRUNTON, L. L. et al. (org.). **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman**. 12.ed. Porto Alegre: AMcGraw Hill, 2012. p. 1477-1504.

YIGIT, H. et al. Novel Carbapenem-Hydrolyzing-Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob Agents Chemother**. 45(4): 1151-61, 2001.

ZAMANI, H.; SALEHZADEH, A. Biofilm formation in uropathogenic *Escherichia coli*: Association with adhesion factor genes. **Turkish Journal of Medical Sciences**, v. 48, n. 1, p. 162–167, 20

ZOTHANPUIA. et al. Detection of antibiotic-resistant bacteria endowed with antimicrobial activity from a freshwater lake and their phylogenetic affiliation. **PeerJ**, 2016.

ANEXO A: CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: CARACTERIZAÇÃO DE MECANISMOS DE RESISTÊNCIA E ANÁLISE PROTEÔMICA DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *Providencia* spp

Pesquisador: SIVONEIDE MARIA DA SILVA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 84509218.3.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.581.723

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia da estudante Sivoneide Maria da Silva, orientada pela Prof^a. Dr^a. Maria Tereza dos Santos Correia e co-orientada pela Prof^a. Dr^a. Maria Betânia Melo de Oliveira. Este projeto tem como finalidade investigar a ocorrência de genes de resistência a betalactâmicos e aminoglicosídeos e verificar o potencial de formação de biofilme em isolados de *Providencia* spp obtidos de hospitais de Recife-PE, bem como analisar alterações na expressão proteica desses isolados.