

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Pseudomonas aeruginosa isoladas de pacientes portadores e não portadores
de fibrose cística: avaliação da formação de biofilme, quorum-sensing,
auxotrofia e resistência antimicrobiana

LEANDRO REUS RODRIGUES PEREZ

Orientador: Prof. Dr. Afonso Luís Barth

PORTO ALEGRE, 2010.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Pseudomonas aeruginosa isoladas de pacientes portadores e não portadores de fibrose cística: avaliação da formação de biofilme, quorum-sensing, auxotrofia e resistência antimicrobiana

Tese apresentada por **LEANDRO REUS RODRIGUES PEREZ**
para obtenção do GRAU DE DOUTOR em Ciências
Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Afonso Luís Barth

PORTO ALEGRE, 2010.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível Doutorado, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Alexandre José Macedo

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Cícero Armídio Gomes Dias

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Prof. Dr. Pedro Alves d'Azevedo

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

P438p Perez, Leandro Reus Rodrigues
Pseudomonas aeruginosa isoladas de pacientes portadores e não portadores de fibrose cística: avaliação da formação de biofilme, quorum-sensing, auxotrofia e resistência antimicrobiana / Leandro Reus Rodrigues Perez. – Porto Alegre: UFRGS, 2010. – xiv, 121 p.: il.

Tese (doutorado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Microbiologia. 2. Pseudomonas aeruginosa. 3. Fibrose cística. 4. Biofilmes. 5. Resistência bacteriana. I. Barth, Afonso Luís. II. Título.

CDU: 616-74.32

Bibliotecária responsável:

Claudia da Silva Gonçalves de Leon – CRB 10/1012

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia do Hospital Mãe de Deus, Laboratório de Biologia Molecular do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha família.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Afonso Luís Barth, meu orientador, sobretudo pelo alto nível científico. Obrigado pela amizade, pelas oportunidades e por aceitar e acreditar na proposta deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Peixoto de Freitas, carinhosamente conhecida por Usha, pela parceria, amizade e ensinamentos compartilhados durante este período.

Ao Prof. Dr. Cícero Armídio Gomes Dias, indiscutivelmente meu maior exemplo de profissionalismo acadêmico e científico. Obrigado pelos ensinamentos, pelo exemplo de caráter e ser humano. Meus sinceros agradecimentos por me oportunizar estar ao seu lado.

À Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Souza Antunes, a quem eu admiro muito, pelo exemplo de ser humano. Obrigado pelas oportunidades, pela parceria, pela amizade que muito me honra. Obrigado por tudo.

Às colegas Fabiana Zettler e Silvana Superti, pelo apoio e incentivo, sobretudo na parte inicial deste trabalho.

Às colegas da Microbiologia do Hospital Mãe de Deus, Karen Oliveira Silva, Sabrina Cássia de Medeiros e Ana Paula Becker, pelo apoio incondicional,

auxílio em procedimentos experimentais, pelos momentos de carinho e descontração.

Aos colegas do Laboratório de Análises Clínicas, sobretudo à Maria Vanderléia Suzano, pelo apoio, carinho e amizade.

Aos colegas da Microbiologia e Biologia Molecular do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo apoio e auxílio.

A todos os co-autores das publicações relacionadas a esta tese, pela dedicação e parceria. Muito obrigado.

Aos amigos e a todos aqueles que, de certa forma, contribuíram para a realização deste trabalho. Obrigado!

À minha família.

RESUMO

Pseudomonas aeruginosa é um importante patógeno no âmbito hospitalar. O presente estudo teve o objetivo de caracterizar isolados clínicos de *P. aeruginosa* de pacientes portadores e não portadores de fibrose cística com relação a sua habilidade para a produção de biofilmes, requerimento nutricional, expressão fenotípica da produção de moléculas autoindutoras do sistema quorum-sensing (QS), detecção de genes envolvidos no controle do sistema QS e detecção de genes de carbapenemases, sobretudo metalo- β -lactamases (MBLs). Preliminarmente, 74 *P. aeruginosa* foram avaliadas com relação à capacidade de produção de biofilme. Nesta análise, 68% mostraram serem produtores de biofilme. Subseqüentemente, a produção de biofilme foi avaliada em 124 isolados clínicos utilizando-se dois diferentes meios: Tryptic Soy Broth (TSB) e um pool de escarros provenientes de pacientes com fibrose cística. A capacidade de produção de biofilme, nos dois meios, não apresentou diferença estatisticamente significativa, independentemente da origem dos isolados (fibrose cística ou não). Entretanto, uma maior produção de biofilme foi observada quando os isolados foram submetidos a este crescimento no meio TSB ($p=0,0198$).

Os isolados clínicos produtores de biofilme que foram obtidos de pacientes sem fibrose cística mostraram ser mais resistentes aos carbapenêmicos – imipenem e meropenem - do que aqueles isolados de pacientes com fibrose cística.

A auxotrofia foi avaliada entre 349 isolados de *P. aeruginosa* e detectada em 14 (4%) amostras, sendo apenas uma oriunda de paciente não-fibroscístico. O aminoácido mais requerido foi metionina (Met⁻) (8/14). As amostras auxotróficas foram avaliadas quanto a capacidade de produzir biofilme e apenas um isolado (Met⁻) foi não produtor de biofilme. Este foi o primeiro relato de auxotrofia entre *P. aeruginosa* isoladas de amostras clínicas no Brasil.

Muitos mecanismos, principalmente aqueles associados à virulência de *P. aeruginosa*, são controlados pelo sistema QS através de moléculas conhecidas como autoindutoras (AHLs). Neste estudo não encontramos diferença significativa entre isolados de fibrose cística e não fibrose cística, referente à detecção fenotípica de AHLs. Entretanto, a produção de moléculas autoindutoras parece estar associada àqueles com maior capacidade de

produção de biofilme, mostrando ser uma característica relacionada à densidade microbiana.

Quanto aos genes de resistência aos carbapenêmicos, 91 isolados foram avaliados para presença dos genes SPM-1, IMP-1 e VIM-2 codificadores de MBLs, pela reação em cadeia da polimerase. Entre estes, 21 (23.1%) isolados foram positivos para os genes de MBLs. A presença do gene SPM-1 foi maior entre os isolados não-fibroclásticos. Por outro lado, nós encontramos uma elevada prevalência do gene IMP-1 entre isolados de *P. aeruginosa* de pacientes com fibrose cística. Ao nosso conhecimento, este é o primeiro relato, no Brasil, de *P. aeruginosa* IMP-1 em pacientes com fibrose cística. Adicionalmente, todos isolados positivos para a presença de MBL mostraram capacidade, sobretudo moderada e forte, para produção de biofilme.

Testes fenotípicos têm sido utilizados para prever a presença de MBL em *P. aeruginosa*. Entretanto, nenhum tem sido preconizado pelos comitês internacionais. Nós avaliamos 14 diferentes combinações de testes fenotípicos de 1) sinergismo utilizando ceftazidima (CAZ) e imipenem (IMP) como substratos e ácido 2-mercaptopropiônico (2MPA) e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) como agentes inibidores da enzima em distâncias de 1, 2 e 2,5 cm entre os discos e de 2) disco-combinado de IMP e/ou CAZ com EDTA para prever a presença de MBL. Nesta etapa de estudo, foram avaliadas amostras provenientes de um surto hospitalar (n=7) e amostras de pacientes com fibrose cística (n=14). Nós encontramos uma tendência de melhor resultado para o teste de disco combinado IMP-EDTA, embora um resultado falso-positivo tenha ocorrido.

Finalmente, foi realizada uma análise para avaliação da presença dos genes que compõem os principais sistemas de QS e sua correlação com a produção de biofilme e moléculas AHLs. Um total de 91 isolados (85 produtores de biofilme e 6 não produtores de biofilme) foi avaliado. Entre os não produtores de biofilme, quatro isolados foram negativos para os genes *lasI*, *lasR*, *rhlI* e *rhlR*, e dois foram negativos para *lasI* e *lasR*. Este resultado mostra a importância do sistema *las* no controle da virulência em *P. aeruginosa*, sobretudo no processo de formação de biofilme.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*, fibrose cística, biofilme, resistência bacteriana.

ABSTRACT

***Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis and non-cystic fibrosis patients: evaluation of biofilm production, quorum-sensing, auxotrophy and antimicrobial resistance**

Pseudomonas aeruginosa is an important pathogen that causes serious illness, especially in hospital settings, such as pneumonia, bacteremia and sepsis. This study aimed to characterize clinical isolates of *P. aeruginosa* from patients with and without cystic fibrosis (CF) according to their ability to produce biofilm, nutritional requirement, phenotypic expression of autoinducers molecules of quorum-sensing system (QS), detection of genes involved in control of the QS system and detection of metallo- β -lactamases (MBLs) genes. In a preliminary analysis, 74 *P. aeruginosa* were evaluated for the ability to produce biofilm and 68% proved to be biofilm producers. Subsequently, biofilm production was assessed in 124 isolates using two different media: Tryptic Soy Broth (TSB) and a pool of sputum from CF patients. There was no statistical difference in biofilm production regardless the origin of isolates (cystic fibrosis or non-CF), in both media. However, increased production of biofilm was observed when the isolates were submitted to grow in TSB medium ($p = 0.0198$). Biofilm producers from non-CF patients showed to be more resistant to carbapenems – imipenem and meropenem. Occurrence of auxotrophy is well documented among *P. aeruginosa* isolates from CF, and represents a bacterial adaptation to the pulmonary environment. The auxotrophy was evaluated among 349 isolates of *P. aeruginosa* and was detected in 14 (4%) isolates. All but one auxotrophic isolates were obtained from CF patients. The single amino acid more required was methionine (Met⁻) (8 / 14). Auxotrophic isolates were evaluated for biofilm production and only one Met⁻ isolate was non-biofilm producer. This was the first report of auxotrophy in *P. aeruginosa* isolated from clinical specimens in Brazil. The virulence factors in *P. aeruginosa* are controlled by the QS system through molecules known as autoinducers (AHLs). We found no significant difference between CF and non-CF isolates regarding AHLs production.

However, the production of autoinducers molecules appears to be associated with isolates with major capacity to form biofilm. Regarding resistance mechanisms, we evaluated 91 isolates for the presence of SPM-1, IMP-1 and VIM-2 genes that encoding MBLs. A total of 21 (23.1%) isolates were MBL producers. The presence of SPM-1 gene was more common among non-CF isolates while the IMP-1 gene was more prevalent in CF *P. aeruginosa* isolates. To our knowledge, this is the first report of *P. aeruginosa* harboring IMP-1 gene among CF patients. Additionally, all isolates harboring MBLs showed ability, especially moderate and strong, for biofilm production. Phenotypic tests have been used to predict the presence of MBL in *P. aeruginosa*. However, none has been recommended by international committees. We evaluated 14 different combinations of the phenotypic tests to predict the presence of MBL 1) double-disk synergy test, using ceftazidime (CAZ) and imipenem (IMP) as substrates and acid 2-mercaptopropiônico (2MPA) and ethylenediaminetetracetic acid (EDTA) as inhibitors of the enzyme at distances of 1, 2 and 2.5 cm between the disks; and 2) combined-disk using IMP and/or CAZ with EDTA. We evaluated isolates from a hospital outbreak (n = 7) and isolates from CF patients (n = 14). We found a tendency toward better result for the combined-disk test with IMP-EDTA, although a false-positive result has occurred. Finally, we evaluated the presence of genes that comprise the main QS systems of *P. aeruginosa* in relation to biofilm and AHLs production. A total of 91 isolates (85 producers and 6 non-biofilm producers) was evaluated. Among non-biofilm producers, four isolates were deficient for *lasI*, *lasR*, *rhlI* and *rhlR* genes, and two isolates were deficient for *lasI* and *lasR* genes. This result shows the importance of the QS systems, mainly *las* system, in controlling *P. aeruginosa* virulence, mainly in process in which biofilm production can be occurring.

Key-words: *Pseudomonas aeruginosa*, cystic fibrosis, biofilm, antimicrobial resistance

SUMÁRIO

<u>I. INTRODUÇÃO</u>	1
<u>II. REVISÃO DA LITERATURA</u>	3
<u>II. 1. Taxonomia</u>	3
<u>II. 2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i></u>	3
<u>II. 3. Significado Clínico</u>	5
<u>II. 4. Auxotrofia em <i>P. aeruginosa</i></u>	7
<u>II. 5. Biofilmes em <i>P. aeruginosa</i></u>	8
<u>II. 6. Formação de Biofilme e produção de alginato</u>	10
<u>II. 7. Biofilme e sua patogenicidade</u>	12
<u>II. 8. Quorum-sensing e controle de expressão dos fatores de virulência</u>	12
<u>II. 9. Quorum-sensing e biofilme</u>	13
<u>II. 10. Mecanismos de resistência em <i>Pseudomonas aeruginosa</i></u>	14
<u>III. OBJETIVOS</u>	17
<u>IV. ARTIGOS CIENTÍFICOS</u>	19
<u>IV.1. MANUSCRITO 1 - Evaluation of biofilm production by <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isolates recovered from cystic fibrosis and non-cystic fibrosis patients</u>	19
<u>IV.2. MANUSCRITO 2 - Biofilm production using distinct media and antimicrobial susceptibility profile between <i>Pseudomonas aeruginosa</i> biofilm-producing from cystic fibrosis and non-cystic fibrosis patients</u>	31
<u>IV.3. MANUSCRITO 3 - Nutritional requirement among <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isolates recovered from respiratory clinical specimens at a tertiary hospital from South of Brazil</u>	43
<u>IV.4. MANUSCRITO 4 - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> from cystic fibrosis and non-cystic fibrosis patients are not differentiated by the quorum-sensing signaling and biofilm production</u>	55
<u>IV.5. MANUSCRITO 5 - When the resistance gets clingy: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> harboring metallo-β-lactamase gene shows high ability to produce biofilm</u>	71

<u>IV.6. MANUSCRITO 6 – Screening tests to predict metallo-β-lactamase production among <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.....</u>	81
<u>IV. 7. MANUSCRITO 7 – Role of las and rhl quorum sensing systems in <i>Pseudomonas aeruginosa</i>: focus on biofilm.</u>	91
<u>V. DISCUSSÃO GERAL.....</u>	107
<u>VI. CONCLUSÕES GERAIS</u>	111
<u>VII. REFERÊNCIAS</u>	113

I. INTRODUÇÃO

Pseudomonas aeruginosa é um dos principais agentes de infecções nosocomiais e tem grande importância clínica devido às elevadas taxas de morbi-mortalidade (QUINN 2003).

Pseudomonas aeruginosa, além de causar diversos tipos de infecções, tem implicações de mau prognóstico em infecções do trato respiratório, tais como pneumonias associadas à ventilação mecânica, mas principalmente entre os pacientes portadores de fibrose cística (SINGH *et al.*, 2000). Estes pacientes, uma vez infectados, dificilmente, ou mesmo nunca, deixarão de ser colonizados (SINGH *et al.*, 2000). A cronicidade de infecção nestes pacientes é uma constante pela dificuldade de erradicação de *P. aeruginosa*.

A facilidade com que *P. aeruginosa* tem de se instalar, colonizar e infectar estes pacientes tem sido alvo de inúmeros estudos (SINGH *et al.*, 2000; AGARWAL *et al.*, 2005; KOBAYASHI 2005). Porém, a grande complexidade de mecanismos envolvidos, quer seja os já conhecidos ou ainda novos mecanismos, torna o assunto ainda pouco elucidado e de grande importância clínica e laboratorial para o desenvolvimento de novos recursos para a prática e a conduta terapêutica (KIRISITS *et al.*, 2005; SOBERON-CHAVEZ *et al.*, 2005).

Diversos mecanismos têm sido implicados em infecções por *P. aeruginosa*. Produção de biofilme tem sido descrita na literatura como importante fator de refratariedade dos pacientes ao tratamento com antimicrobianos (COSTERTON, 1999). Por outro lado, o mecanismo pelo qual este se inicia em processo infeccioso bem como os mecanismos auxiliares do controle de sua expressão não estão completamente elucidados (COSTERTON, 1999; TINGPEJ *et al.*, 2007).

Um dos mecanismos descritos no controle da expressão dos diversos fatores de virulência em *P. aeruginosa* é o complexo sistema de comunicação intercelular chamado “quorum sensing” (QS) (TINGPEJ *et al.*, 2007). Dois principais mecanismos de QS têm sido descritos em *P. aeruginosa*. Os sistemas *las* e *rhl* que são responsáveis pelo controle de expressão dos mecanismos de virulência associados ao QS. Um terceiro sistema mais recentemente descrito, *Mvfr* (multiple virulence factor R) contribui de forma a intercambiar a sinalização entre os sistemas *las* e *rhl* (TINGPEJ *et al.*, 2007).

Mecanismos de resistência aos agentes antimicrobianos, principalmente a produção de metalo- β -lactamases (MBLs) tem sido motivo de grande preocupação entre os clínicos, uma vez que reduz as opções de tratamento para as infecções (NORDMANN & POIREL, 2002). Em Porto Alegre, foram descritos casos de surtos ocasionados por *P. aeruginosa* produtoras de MBLs, principalmente SPM-1 (MARTINS *et al.*, 2007). A detecção deste tipo de mecanismo é realizada por métodos moleculares, como a reação em cadeia da polimerase, e através de testes fenotípicos. Entretanto, não há nenhuma padronização reconhecida por comitês oficiais quanto a sua detecção laboratorial, o que dificulta sua pesquisa para a rotina de um laboratório de microbiologia.

A abrangente diversidade de mecanismos de virulência e resistência em *P. aeruginosa* e a ocorrência concomitante destes mecanismos tornam sua detecção ainda mais necessária para o aprimoramento do manejo terapêutico.

II. REVISÃO DA LITERATURA

II. 1. Taxonomia

A classificação original do gênero *Pseudomonas* em cinco grupos homólogos de rRNA tem sofrido extensa revisão, resultando na reclassificação de muitas espécies de *Pseudomonas* em gêneros separados. Estes gêneros incluem *Burkholderia*, *Stenotrophomonas*, *Comamonas*, *Shewanella*, *Ralstonia*, *Methylobacterium*, *Sphingomonas*, *Acidovorax* e *Brevundimonas* (KISKA & GILLIGAN 1999). Muitas espécies de *Pseudomonas* permaneceram no gênero, embora estudos filogenéticos recentes baseados na seqüência 16S do RNA ribossômico permitiram sua transferência a um novo ou já existente gênero. O gênero *Pseudomonas* pode ser distinguido de gêneros relacionados com base na composição celular de ácidos graxos. Além disso, membros de *Pseudomonas (sensu stricto)* pode ser identificado pela presença do gene da lipoproteína de membrana externa I (*oprI*) detectado por análises de PCR e/ou *Southern blot* (KISKA & GILLIGAN 1999).

II. 2. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa é um bacilo gram-negativo, aeróbio estrito, não formador de esporos. Possui aproximadamente 1,5 a 5,0 µm de tamanho e 0.5 a 1.0 µm de largura e apresenta metabolismo respiratório estritamente dependente de oxigênio como aceptor terminal de elétron (KISKA & GILLIGAN 1999). Alguns isolados podem crescer sob condições anaeróbicas pelo uso de nitrato ou arginina como aceptores finais de elétron.

Pseudomonas aeruginosa são bactérias móveis devido à presença de um flagelo polar. Isolados clínicos são oxidase positivos e catalase positivos. Crescem sobre o Agar MacConkey, aparecendo como não-fermentadores de lactose. *P. aeruginosa*, assim como a maioria das espécies de *Pseudomonas*, degrada glicose pela via oxidativa e converte nitrato a nitrito ou a gás nitrogênio (KISKA & GILLIGAN 1999). As colônias de *Pseudomonas aeruginosa* podem ser rapidamente identificadas por sua aparência no meio de cultura, por

pigmentação verde-azulada e pelo odor de frutas característico (KISKA & GILLIGAN 1999). As colônias podem apresentar morfologias distintas, desde plana e difusa até colônias bem diminutas. Colônias com aspecto mucóide são comuns nas amostras isoladas de infecções do trato respiratório, particularmente em isolados clínicos de pacientes com fibrose cística (AGARWAL *et al.*, 2005).

Pseudomonas aeruginosa produz, no mínimo, quatro pigmentos distintos: piocianina (azul), pioverdina (amarelo-esverdeado), piorrubrina (vermelho) e piomelanina (marrom a preto) (KISKA & GILLIGAN 1999). São nutricionalmente pouco versáteis, com diferentes espécies sendo hábeis em utilizar uma variedade de carboidratos simples e complexos, álcoois, e aminoácidos como fontes de carbono. Certas espécies podem se multiplicar a 4°C, mas a maioria é mesofílica, com crescimento ótimo a temperaturas entre 30 e 37°C (KISKA & GILLIGAN 1999).

Espécies de *Pseudomonas* são encontradas na água e solo e em plantas, incluindo frutas e vegetais. Devido a sua habilidade de sobreviver em ambientes úmidos, *Pseudomonas aeruginosa* tem sido problemática no ambiente hospitalar. Ela é encontrada em uma variedade de soluções aquosas, incluindo desinfetantes, sabões, fluidos de irrigação, colírios, equipamentos e fluidos de diálise. *P. aeruginosa* é freqüentemente encontrada em ventiladores, pias, banheiras de hidroterapia e equipamentos respiratórios (DE KIEVIT *et al.*, 2001). Adicionalmente às fontes hospitalares, *P. aeruginosa* pode ser encontrada em piscinas, saunas, soluções de lentes de contato, cosméticos, unhas artificiais, drogas injetáveis, e nas solas de calçados. (KISKA & GILLIGAN 1999).

Pseudomonas aeruginosa é pouco freqüentemente encontrada como parte da flora microbiana de indivíduos saudáveis. A razão de colonização aumenta em pacientes hospitalizados, particularmente naqueles que tem um longo período de internação e/ou tem recebido terapia antimicrobiana de amplo

espectro ou quimioterapia. Os sítios de colonização nestes pacientes são semelhantes àsquelas de pessoas saudáveis, mas também inclui o trato respiratório inferior, especialmente em pacientes intubados (DENERVAUD *et al.*, 2004).

II. 3. Significado Clínico

Pseudomonas aeruginosa é o mais importante patógeno humano no gênero *Pseudomonas* com respeito ao número e aos tipos de infecções causadas e sua associação com altas taxas de morbi-mortalidade (QUINN 2003). O espectro das doenças causadas por este agente varia desde infecções superficiais de pele a sepsé fulminante.

Pseudomonas aeruginosa é causa de pneumonias adquiridas na comunidade em um pequeno número de pacientes que apresentam predisposição como histórico de tabagismo, idosos, pessoas expostas a águas aerossolizadas contaminadas. Por sua uma causa pouco usual de pneumonia comunitária, os pacientes raramente recebem terapia antimicrobiana empírica adequada e a mortalidade é relativamente alta (aproximadamente 33% dos casos).

Bacteremia e choque séptico devido a *P. aeruginosa* continuam sendo um dos principais problemas em pacientes hospitalizados com doenças de base, doenças cardiopulmonares, falência renal e diabetes. Em duas diferentes pesquisas realizadas em hospitais norte-americanos, *P. aeruginosa* foi o terceiro bacilo gram-negativo mais comumente isolado de sangue, atrás apenas de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (KISKA & GILLIGAN 1999; KOBAYASHI 2005). Bacteremia devido *P. aeruginosa* em usuários de droga intravenosa é usualmente associada com endocardite bacteriana, como resultado da injeção de drogas contaminadas. Nestes indivíduos, pode haver também o desenvolvimento de osteomielite (KISKA & GILLIGAN 1999).

Pseudomonas aeruginosa é a principal causa de infecções do trato respiratório em ambiente hospitalar. Pacientes submetidos à ventilação mecânica tem vinte vezes mais chance de desenvolver pneumonia hospitalar, com *P. aeruginosa* sendo o microrganismo mais freqüentemente isolado. Nesta população de pacientes, a mortalidade é de aproximadamente 40-50% (DENERVAUD *et al.*, 2004). *P. aeruginosa* também é um agente causador de outras infecções, como trato urinário, principalmente em paciente cateterizados, infecções de ferida, infecções em queimados e peritonite (QUINN 2003).

Um fenótipo “mucóide” de *P. aeruginosa* infecta, de forma crônica, aproximadamente 70-80% de adolescentes e adultos portadores de fibrose cística (MATHEE *et al.*, 1999).. A superprodução de alginato, um polímero polissacarídico, é responsável por este fenótipo “mucóide” (HENTZER *et al.*, 2001). Os eventos que estão relacionados ao estabelecimento do fenótipo mucóide nos pulmões de pacientes fibrocíticos não estão bem esclarecidos e são focos de muitos estudos (HENTZER *et al.*, 2001; FRAVE-BONTE *et al.*, 2002; HAUSSLER *et al.*, 2003). É especulado que após infecção por um isolado não-mucóide, a emergência do fenótipo mucóide ocorre devido à mutação no gene que controla a síntese de alginato (STAPPER *et al.*, 2004). O desenvolvimento de *P. aeruginosa* mucóide como “microcolônias”, as quais são pequenas colônias de microrganismo envoltas em grande quantidade de alginato, é peça central no desenvolvimento de infecções crônicas nas vias aéreas de pacientes com fibrose cística (ALKAWASH *et al.*, 2006). A esta forma de crescimento é creditada a capacidade de inibição da fagocitose, ao aumento de resistência antimicrobiana e a indução de uma significativa resposta do sistema imune nos pulmões de pacientes com fibrose cística via ação da elastase (ALKAWASH *et al.*, 2006). Altos níveis de elastase danificam o pulmão e tem um efeito cumulativo deletério sobre a capacidade pulmonar por um período de anos ou décadas, eventualmente resultando em morte. Bacteremia em pacientes com fibrose cística é rara, provavelmente devido ao alto nível de anticorpos circulantes aos vários fatores de virulência de *P. aeruginosa* nestes pacientes. *P. aeruginosa* mucóide ocasionalmente é vista

causando infecções pulmonares em indivíduos com outras doenças pulmonares crônicas ou infecções do trato urinário secundário a cateteres (CHAN *et al.*, 2005).

II. 4. Auxotrofia em *P. aeruginosa*

Os microrganismos podem ser classificados de acordo com seu requerimento nutricional para o crescimento em autotrófico e heterotrófico. Autotróficos são as formas mais versáteis e podem utilizar o CO₂ como única fonte de carbono e obter energia por oxidação de compostos inorgânicos (quimioautotróficos) ou da luz solar (fotoautotróficos). A maioria das bactérias saprófitas é classificada como autotróficas (BARTH & PITT, 1995).

Heterotróficos, por outro lado, estes necessitam de compostos orgânicos como fonte de carbono. Carboidratos, aminoácidos, peptídeos ou lipídeos são comumente usados como fontes de carbono e energia. A maioria das espécies bacterianas causadoras de infecções é heterotrófica, mas podem diferir grandemente na capacidade de utilização de compostos orgânicos. Alguns são muito versáteis, como a maioria das espécies do gênero *Pseudomonas*, e podem utilizar uma variedade de compostos orgânicos como única fonte de carbono e energia, ao passo que outras espécies são muito mais específicas em seus requerimentos nutricionais (BARTH & PITT, 2005).

Heterotróficos podem ser subdivididos em prototróficos e auxotróficos. Prototróficos tem capacidade de crescer se forem providos de uma fonte única de carbono, mas auxotróficos não possuem uma variedade particular de enzimas necessárias para a síntese de moléculas essenciais (aminoácidos, purinas e pirimidinas, por exemplo) e necessitam destes fatores essenciais, em adição a fonte de carbono, para o crescimento. O termo auxotrofia (Latim *auxilium* = “ajuda”; grego *troph* = “alimento”) é, assim, utilizado para denotar isolados de *P. aeruginosa* com requerimento nutricional.

A auxotrofia em bactérias pode ser considerada em dois grupos maiores de acordo com o status nutricional das espécies quando do isolamento em uma amostra clínica. Certas bactérias são auxotróficas “naturais” e requerem compostos particulares para isolamento, crescimento e identificação “in vitro”. Exemplos destes auxotróficos naturais incluem *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Legionella pneumophila*, *Clostridium difficile* e *Helicobacter pylori*, entre outros (CATLIN, 1978). Auxotrofia no estado nativo pode ser encontrada em algumas *Pseudomonas*, como característica do gênero para a versatilidade nutricional de seus membros. Por outro lado, algumas bactérias as quais são prototróficas no “estado nativo” podem tornar-se auxotróficas sub circunstâncias específicas usualmente relacionadas à pressão ambiental.

O fenômeno da auxotrofia tem sido reportado em algumas bactérias que colonizam pacientes com fibrose cística (BARTH & PITT, 1995). Cepas mucóides de *P. aeruginosa* tem sido reconhecidas em pacientes com fibrose cística por sua habilidade de produção de mucoidia quando do crescimento em meio mínimo indicando que o crescimento destas cepas pode ser influenciado pelo ambiente nutricional (BARTH & PITT, 1995).

II. 5. Biofilmes em *P. aeruginosa*

Apesar das diferentes definições do termo biofilme, achados específicos mostram a existência desta forma de vida estruturada e metabolicamente ativa em comunidades microbianas embebidas em uma matriz polimérica extracelular e localizada em uma interface (DONLAN & COSTERTON, 2002). Em geral, biofilmes são formados em sistemas de fluxo na presença de substratos necessários ao crescimento. Virtualmente, em ambientes naturais, 95-99% dos microrganismos existem na forma de biofilmes. Devido à ausência do isolamento intracelular de processos aeróbicos e anaeróbicos, microrganismos, especialmente procarióticos, são forçados a formar associações com outros microrganismos e eles ganham proteção da potencial atividade danosa do oxigênio, especialmente das formas ativas

(SAUER *et al.*, 2002). Esta é uma das razões para o fato que microrganismos existirem na natureza, em grande parte, na forma de comunidades estruturadas. Assim, os biofilmes protegem seus habitantes microbianos não somente ao oxigênio, mas conseqüentemente, também contra fatores de stress do ambiente, nocivos aos microrganismos. São conhecidas quatro interfaces onde pode haver a formação de biofilmes: líquido-sólido, líquido-ar, entre dois líquidos imiscíveis e sólido-ar (NIKOLAEV & PLAKUNOV, 2007).

Os biofilmes podem apresentar diferentes estruturas: uma simples camada de células formada por uma ou diversas espécies microbianas, sem diferenciação morfológica expressa (este é o tipo de biofilme mais primitivo); comunidades microbianas formadas por diferentes espécies com diferentes capacidades fotossintéticas, metanogênicas, sulfato-redução, entre outros. As camadas das espécies neste biofilme exibem estratificação com relação ao fator regulador (prototropismo, nutrientes, potencial de oxidação, entre outros) e maior espessamento; biofilmes microbianos formados por uma complexa interação entre patógenos e saprófitas (como nas placas dentárias); biofilmes fúngicos; biofilmes marinhos (bênticos ou “floculação” bacteriana suspensa na água); entre outras formas menos freqüentes ou menos estudadas (NIKOLAEV & PLAKUNOV, 2007).

Sob condições naturais, uma superfície sólida imersa em água é imediatamente coberta por um filme primário (condicionamento do filme), o qual altera as propriedades desta superfície. A formação desta camada de moléculas no primeiro estágio precede a formação de um filme bacteriano. O próximo estágio é a própria adesão microbiana de forma ainda reversível. Até este estágio, nenhuma força físico-química de interação atua entre as moléculas e estruturas sobre a superfície dos microrganismos e substrato sólido (forças de Van der Waals, hidrofóbica, eletrostática). Tanto células microbianas vivas quanto mortas são capazes deste tipo de adesão. A fase seguinte é a de adesão irreversível, onde as células microbianas aderem-se irreversivelmente à superfície. Após a aderência à superfície, as células podem se locomover ao longo da superfície por meio de flagelos e pili tipo IV. Ao

término desta motilidade microbiana, as células se aderem umas às outras e através da excreção de substâncias poliméricas extracelulares (polissacarídeos, lipopolissacarídeos, glicoproteínas) formam uma matriz polimérica extracelular. Como resultado da divisão celular, microcolônias compactas emergem, ligando-se com esta matriz. Colonizadores secundários (microrganismos de outras espécies que se aderem às células aderidas à superfície) tornam o filme ainda mais espesso e complexo. Simultaneamente, com o aumento da espessura do biofilme, estruturas específicas são formadas: cavidades, canais, protuberâncias e poros. Sob condições favoráveis, este leva à formação de biofilmes maduros, que podem permanecer por grandes períodos de tempo, enquanto que sob condições desfavoráveis, este biofilme entra em seu estágio final, de desintegração, degradação, perda de algumas células e liberação de outras na sua forma livre (planctônica) para o ambiente (NIKOLAEV & PLAKUNOV, 2007).

Fatores ambientais ligados às células microbianas afetam o processo de formação de biofilme e suas características. Os mais importantes fatores do ambiente são: o pH, a salinidade, a osmolaridade, oxigênio, acesso às fontes nutricionais, além da hidrofobicidade da interface, força físico-química e corrente de fluxo (principalmente em meios líquidos).

Um biofilme microbiano pode apresentar diversas interações. Entre as diferentes interações de troca, a transferência de informação genética entre componentes do biofilme tem uma notável importância pela possibilidade de disseminação de fatores relacionados à resistência antimicrobiana e à fatores de virulência (DONLAN & COSTERTON, 2002).

II. 6. Formação de Biofilme e produção de alginato

No crescimento em biofilme, as células bacterianas apresentam arquitetura e propriedades bioquímicas e fenotípicas distintas daquelas que crescem de forma livre (planctônicas) (YANG *et al.*, 2005). Uma das propriedades mais bem conhecidas, e específicas do biofilme, é o

desenvolvimento de resistência antimicrobiana, que pode ser até 1000 vezes maior do que aquela apresentada por células planctônicas (MOSKOWITZ *et al.*, 2004).

A habilidade em formar biofilmes é um fator crucial em infecções causadas por *P. aeruginosa* e tem feito desta bactéria um organismo modelo com respeito à formação de biofilme. Durante a colonização crônica, *P. aeruginosa* realiza a conversão do fenótipo não mucóide em mucóide. O achado mais característico do fenótipo mucóide é a secreção de uma grande quantidade de exopolissacarídeo extracelular altamente viscoso (STAPPER *et al.*, 2004). O copolímero alginato, o qual é composto de manuronato e guluronato, aparece como o maior componente do polissacarídeo secretado e, além de ácidos nucléicos e proteínas, é o principal fator no desenvolvimento de biofilme mucóide. Infecções por *P. aeruginosa* produtora de alginato, em pacientes com fibrose cística, tem sido associado com uma superativação da resposta imune e uma piora da condição clínica, sugerindo que a produção de alginato é um fator de virulência (HENTZER *et al.*, 2001; STAPPER *et al.*, 2004). Biofilmes formados por *P. aeruginosa* tem sido associados ao aumento da resistência aos antimicrobianos e de colonização pulmonar em fibrose cística. A formação de uma matriz de substâncias extrapoliméricas tem um papel importante no estabelecimento de um biofilme sustentável. É postulado que a expressão de genes para produção de alginato pode ser crítico para a formação de biofilme por *P. aeruginosa* porque a expressão do gene *algC* é elevada em cepas mucóides, como a cepa PA 8830, sob condições de crescimento em biofilme (HENTZER *et al.*, 2001). Além disso, o produto de gene *algC* está envolvido na síntese de lipopolissacarídeos e produção de alginato (HENTZER *et al.*, 2001).

Entretanto, recentemente, foi notado que mutantes de *P. aeruginosa* não produtores de alginato, assim como o fenótipo não mucóide, também são capazes de formar biofilme (WOZNIAK *et al.*, 2003). Estes biofilmes não mucóides possuem uma arquitetura diferente daqueles formados por isolados de *P. aeruginosa* mucóide superprodutores de alginato. Biofilmes não

mucóides produzidos por *P. aeruginosa* ou mutantes não produtores de alginato não mostraram diferenças com respeito a sua arquitetura ou resistência antimicrobiana. STAPPER *et al.*, (2004) mostraram que a produção de alginato afeta o desenvolvimento e a arquitetura do biofilme de *P. aeruginosa*, mas não seria essencial para a formação do mesmo. De fato, a associação entre a produção de alginato e formação de biofilme é, ainda, um campo desconhecido que necessita de mais estudos para sua elucidação.

II. 7. Biofilme e sua patogenicidade

A formação de biofilme leva a formação de estruturas que protegem às células microbianas contra diferentes condições de stress, dentre estes: privação de nutrientes, trocas de pH e oxidação. Diferentes camadas do biofilme apresentam diferentes reações frente às condições de stress. Devido à este modo peculiar de resposta aos diferentes estímulos, temos o chamado “fenótipo biofilme”, o qual pode expressar, por exemplo, diferentes vias de metabolismo ou resistência (SAUER *et al.*, 2002).

Na fibrose cística, a reduzida hidratação das vias aéreas associada à deficiência da atividade mucociliar, favorecem a formação de um muco mais viscoso e propício às reações inflamatórias e infecções bacterianas das vias aéreas. Pacientes fibrocísticos adolescentes e adultos comumente tornam-se colonizados com *P. aeruginosa*. A doença “per se” propicia um nicho pulmonar favorável para colonização microbiana, o qual inclui receptores específicos sobre a superfície das células epiteliais, que facilitam o reconhecimento e aderência inicial de *P. aeruginosa*.

II. 8. Quorum-sensing e controle de expressão dos fatores de virulência

Sistemas de sinalizações intercelulares, denominado quorum-sensing (QS), permitem às bactérias regular a expressão gênica de acordo com a densidade populacional (SINGH *et al.*, 2000). Os mecanismos regulatórios de QS são disseminados entre os grupos de bactérias, sendo descritos em gram-

positivos e gram-negativos (DE KIEVIT & IGLEWSKI 1999). Em sistemas QS baseados na produção de moléculas N-acil-homoserina lactonas (HSLs), o crescimento bacteriano produz estas pequenas moléculas, denominadas autoindutores, que se acumulam ao redor do ambiente (DE KIEVIT *et al.*, 2001). A uma densidade celular específica, a concentração de autoindutores torna-se suficiente para interagir com proteínas ativadoras transcricionais autoindutores-dependentes e alteram a expressão gênica.

Em *P. aeruginosa*, os sistemas de quorum-sensing têm sido extensivamente estudados (DE KIEVIT & IGLEWSKI 1999; DE KIEVIT *et al.*, 2001; FRAVE-BONTE *et al.*, 2003; DENERVAUD *et al.*, 2004). Dois sistemas baseados em HSLs, os sistemas *las* e *rhl*, tem sido descritos. Os genes *LasI* e *RhII* sintetizam os autoindutores N-(3-oxododecanoil)-L-homoserina lactona (3-oxo-C12-HSL) e N-butilil-L-homoserina lactona (C4-HSL), respectivamente (FRAVE-BONTE *et al.*, 2003). Um terceiro sistema, mais recentemente descrito, conhecido como *Mvfr* (*multiple virulence factor R*) atua de forma a interagir com os sistemas *las* e *rhl* (TINGPEJ *et al.*, 2007).

Sistemas quorum-sensing são considerados cruciais para a patogênese de *P. aeruginosa*. Um processo infeccioso no qual o QS tem papel importante é a infecção pulmonar em fibrose cística. Estas infecções podem propiciar um ambiente perfeito para a expressão dos sistemas de quorum-sensing, uma vez que os pulmões são ambientes espacialmente limitados e *P. aeruginosa* pode crescer em elevadas densidades (10^7 a 10^8 / mL) em secreções respiratórias. Estas condições devem ser suficientes para induzir a expressão dos genes que regulam o mecanismo de QS em *P. aeruginosa* em pulmões de pacientes com fibrose cística (DE KIEVIT *et al.*, 2001).

II. 9. Quorum-sensing e biofilme

Pseudomonas aeruginosa pode colonizar permanentemente o pulmão de pacientes com fibrose cística apesar de agressivos tratamentos antimicrobianos, o que sugere que *P. aeruginosa* pode estar na forma de

crescimento de biofilmes (DE KIEVIT *et al.*, 2001). *P. aeruginosa* utiliza sinais extracelulares de QS para coordenar a formação de biofilme. O sinal de quorum-sensing requerido para a diferenciação em microcolônias em biofilmes é 3-O-C12-HSL. Limitações dos ensaios normalmente utilizados para detectar acil-HSLs entre os microrganismos podem subestimar a influência que estas moléculas efetivamente provocam durante um processo infeccioso e seu papel regulatório sobre a virulência de *P. aeruginosa* (FRAVE-BONTE *et al.*, 2002).

Quorum sensing é um relevante mecanismo associado a colonização e virulência de certas bactérias torna-o um atrativo alvo terapêutico. Compostos naturais têm sido avaliados com relação à capacidade de inibição do sistema quorum-sensing. Por exemplo, macrolídeos tem um significativo efeito sobre mecanismos de quorum-sensing utilizado por *P. aeruginosa* na mediação de fatores de virulência. Por diminuir a comunicação bacteriana, macrolídeos podem reduzir a aderência de *P. aeruginosa* às células epiteliais pela supressão da formação de biofilme (IMAMURA *et al.*, 2004).

II. 10. Mecanismos de resistência em *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa apresenta resistência intrínseca a diversos antimicrobianos num grau variado, sendo, caracteristicamente, menos susceptível que as Enterobactérias à maioria dos antimicrobianos (LIVERMORE 2001).

Os principais mecanismos de resistência em *P. aeruginosa* são:

- ◆ sistema de efluxo;
- ◆ perda de porina;
- ◆ expressão de enzimas, como AmpC, betalactamases de espectro estendido (ESBL), carbapenemases (em especial metaloenzimas), entre outras.

A expressão da bomba de efluxo MexA-MexB-OprM em *P. aeruginosa* aparece com elevada frequência como resultante de mutações, culminando na elevação da concentração inibitória mínima (CIM) de penicilinas, cefalosporinas, quinolonas, tetraciclina e cloranfenicol, mas com modesta atuação sobre a classe dos carbapenêmicos. As cepas mutantes podem ser selecionadas *in vitro* ou durante terapia com fluoroquinolonas, penicilinas e cefalosporinas (LIVERMORE 2001).

A resistência à classe dos carbapenêmicos reflete-se na absorção reduzida deste antimicrobiano como resultado da perda da porina OprD, uma proteína permeável, principalmente a imipenem (TSAKRIS *et al.*, 2000). Resistência plena aos agentes carbapenêmicos, imipenem e meropenem, surge a partir de dois eventos mutacionais que levaria a perda de OprD somada a superexpressão da bomba de efluxo MexA-MexB-OprM (LIVERMORE 2001).

Outro mecanismo de resistência que tem grande impacto na conduta clínico-terapêutica e epidemiológica, devido a sua grande capacidade de disseminação, é a produção de enzimas que tem atividade hidrolítica sobre os antimicrobianos. As ESBL, que compreendem a classe A de Ambler, já foram descritas, embora de forma pouco freqüente, em *P. aeruginosa*, com os tipos TEM, SHV, PER-1, VEB-1 e GES, que tem atividade hidrolítica sobre ceftazidima e cefepima, sendo que a enzima GES pode, ainda, apresentar uma fraca atividade hidrolítica sobre carbapenêmicos.

As enzimas da classe B de Ambler, denominadas de metalo- β -lactamases (MBL) compreendem as famílias IMP, VIM, SPM, GIM e SIM, e são as principais enzimas já descritas em *P. aeruginosa*. As MBL possuem um amplo perfil de hidrólise conferindo resistência todos os agentes β -lactâmicos exceto monobactams (LIVERMORE 2001; NORDMANN & POIREL 2002).

III. OBJETIVOS

- ⇒ Caracterizar, fenotipicamente, amostras de *P. aeruginosa* isoladas de espécimes clínicos do trato respiratório de pacientes portadores e não portadores de fibrose cística, provenientes de unidades hospitalares do Hospital de Clínicas de Porto Alegre;

- ⇒ Avaliar a formação de biofilmes entre os isolados de *P. aeruginosa*;

- ⇒ Determinar a frequência da resistência aos antimicrobianos utilizados para o tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa*: aminoglicosídeos, macrolídeos, quinolonas e carbapenêmicos.

- ⇒ Avaliar o fenômeno da auxotrofia entre os isolados de *P. aeruginosa*;

- ⇒ Detectar, através de testes fenotípicos e da Reação em Cadeia da Polimerase, os determinantes genéticos envolvidos no sistema de quorum-sensing e genes que codificam para a produção de metalo- β -lactamases.

IV. ARTIGOS CIENTÍFICOS

IV.1. MANUSCRITO 1 - Evaluation of biofilm production by *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from cystic fibrosis and non-cystic fibrosis patients

Manuscrito aceito para publicação no *Brazilian Journal of Microbiology*

IV.2. MANUSCRITO 2 - Biofilm production using distinct media and antimicrobial susceptibility profile between *Pseudomonas aeruginosa* biofilm-producing from cystic fibrosis and non-cystic fibrosis patients

Manuscrito aceito para publicação no *Brazilian Journal of Infectious Diseases*

Antimicrobial agents	Cystic fibrosis patients (N ^b =50)			Non-cystic fibrosis patients (N ^b =66)		
	% susceptible ^c	% intermediate ^c	% resistant ^c	% susceptible ^c	% intermediate ^c	% resistant ^c
Amikacin	76	8	16	72.7	-	27.3
Aztreonam	52	16	32	57.7	9	33.3
Cefepime	28	40	32	30.3	24.2	45.5
Ceftazidime	40	20	40	30.3	24.2	45.5
Ciprofloxacin	52	-	48	54.5	-	45.5
Gentamicin	48	28	24	63.6	-	36.4
Imipenem	72	8	20	33.3	18.2	48.5
Meropenem	92	-	8	36.4	-	63.6
Piperacillin-tazobactam	68	-	32	81.8	-	18.2

^a Considering any degree of biofilm production (weak, moderate or strong).

^b N is the total number of isolates with biofilm producer status.

^c Susceptible, intermediate and resistant phenotypes, from CLSI breakpoints

IV.3. MANUSCRITO 3 - Nutritional requirement among *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from respiratory clinical specimens at a tertiary hospital from South of Brazil

Artigo aceito para publicação no Brazilian Journal of Microbiology

IV.4. MANUSCRITO 4 - *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis and non-cystic fibrosis patients are not differentiated by the quorum-sensing signaling and biofilm production

Artigo a ser submetido para publicação no Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica (APMIS)

IV.5. MANUSCRITO 5 - When the resistance gets clingy: *Pseudomonas aeruginosa* harboring metallo- β -lactamase gene shows high ability to produce biofilm

Artigo submetido para publicação ao *Journal of Medical Microbiology*

IV.6. MANUSCRITO 6 – Screening tests to predict metallo- β -lactamase production among *Pseudomonas aeruginosa*.

Artigo a ser submetido ao Journal of Medical Microbiology

IV. 7. MANUSCRITO 7 – Role of *las* and *rhl* quorum sensing systems in *Pseudomonas aeruginosa*: focus on biofilm.

Manuscrito a ser submetido ao *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*

V. DISCUSSÃO GERAL

Diversos estudos têm avaliado os diferentes mecanismos de virulência e resistência antimicrobiana em *P. aeruginosa*. Tais estudos objetivam melhor elucidar a influência destes mecanismos sobre o processo infeccioso causado por este microrganismo nos diferentes tipos estágios de evolução clínica dos pacientes. Entretanto, novos mecanismos têm sido recentemente descritos, tais como o complexo sistema de comunicação intercelular, “quorum sensing”, e a formação de aglomerados celulares, “slimes” ou biofilmes, já melhor elucidados em ambientes naturais, mas ainda um campo ainda não bem elucidado no que se refere ao seu envolvimento com a patogênese das infecções.

Os resultados apresentados neste estudo mostraram que, independentemente da origem (pacientes com ou sem fibrose cística), mas internados, principalmente em unidades de terapia intensiva, os isolados de *P. aeruginosa* não diferiram quanto à capacidade de produção de biofilme (manuscritos 1, 2 e 4). Nossos achados corroboram com outros estudos com relação às elevadas taxas de produção de biofilme, embora haja na literatura resultados que reportam uma grande variabilidade, variando desde 18 a 100% de produção de biofilme.

Diferentes metodologias têm sido aplicadas para avaliação da formação de biofilmes (microplacas com ou sem “pegs”, microscopia confocal, sistemas contendo fluxo contínuo de meio líquido, como o “*biofilm reactor*” ou “*Calgary Device*”, ou ainda aqueles com base a utilização de meios sólidos, como o agar “congo red”. Variabilidade entre os diferentes métodos é previsto. Contudo, devido à sua praticidade, facilidade de incorporação à rotina laboratorial e menor custo, o ensaio utilizando microplacas é o mais amplamente utilizado nas pesquisas científicas. Adaptações à este modelo tem sido realizadas de forma a obter padronização, com excelentes resultados de reprodutibilidade, para a determinação da concentração mínima para erradicação de biofilmes. Em nosso

estudo, o ensaio em microplacas foi testado para a categorização das amostras em fraca, moderadas, fortes ou não produtores de biofilmes. A maioria das amostras analisadas foram categorizadas como fraca produtoras de biofilme, nas condições estabelecidas (incubação à $35\pm 1^\circ\text{C}$, durante um período de 24h, sem agitação). Uma pequena amostragem de isolados susceptíveis a meropenem revelou que as amostras em estado de crescimento em biofilme foram até 64 vezes mais resistentes do que quando crescidas em estado planctônica (manuscrito 5).

Auxotrofia é um fenômeno que ocorre devido a uma adaptação microbiana ao seu microambiente. *P. aeruginosa* deixa de sintetizar elementos importantes para seu crescimento por estes estarem em concentrações elevadas no ambiente em que a bactéria se encontra. Esta condição é bem caracterizada no ambiente pulmonar de pacientes com fibrose cística. Nosso estudo demonstrou a ocorrência de isolados auxotróficos em pacientes com fibrose cística e, ainda, um isolado auxotrófico foi encontrado em amostra de paciente não fibrocístico. O maior requerimento nutricional único foi metionina, achado concordante com dados da literatura. Entretanto, auxotrofia para outros aminoácidos, ou combinações destes foi também estabelecida (manuscrito 3). Como esperado, todos isolados auxotróficos, exceto um, foram capazes de produzir biofilmes *in vitro*.

Uma grande preocupação para a conduta terapêutica das infecções por *P. aeruginosa* é devido ao fato deste microrganismo apresentar uma grande versatilidade de mecanismos de resistência e virulência. A associação destes, em muitos processos infecciosos, é freqüente. Nós alertamos para a ocorrência de amostras que abrigavam genes codificadores para produção de metalo- β -lactamases com elevada capacidade de formação de biofilmes (manuscrito 5). Conforme previsto, de acordo co dados da literatura, os isolados recuperados de amostras de pacientes sem fibrose cística possuíam o gene SPM-1. Surpreendentemente, isolados de *P. aeruginosa* abrigando gene IMP-1 foram

encontrados em nosso estudo. Ao nosso conhecimento, esta é a primeira descrição no Brasil. Resistência aos carbapenêmicos em amostras de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes com fibrose cística deve-se, principalmente, a mecanismos outros (impermeabilidade de membrana e perda de porina) que não a produção de metalo-enzimas. É de notar também a diferença entre os grupos de amostras avaliadas (fibrocísticas e não fibrocísticas). A ocorrência maior de IMP-1 em amostras de pacientes com fibrose cística mostra bem uma diferença entre os grupos de pacientes, uma vez que todos aqueles sem fibrose cística que isolaram *P. aeruginosa* com metalo-enzima, esta foi do tipo SPM-1 (manuscritos 5 e 6).

Tendo em visto o elevado custo das metodologias moleculares, sua implantação na rotina laboratorial não tem sido incentivada para a maioria dos laboratórios. Conseqüentemente, a utilização de métodos fenotípicos para prever o mecanismo de resistência aos carbapenêmicos mediado pela produção de MBLs tem sido amplamente descrito. Contudo, é importante ressaltar que nenhum comitê preconiza, oficialmente, a utilização de técnicas moleculares, tampouco fenotípicas. Nós avaliamos, para um seletivo grupo de amostras, em 14 combinações diferentes para cada isolado clínico, a performance de duas metodologias fenotípicas (teste de sinergismo com duplo disco e teste de disco combinando) utilizando como substratos cefatazidima (CAZ) e imipenem (IMP) e como agentes inibidores da enzima o ácido etilenodiamintetracético (EDTA) e o ácido 2-mercaptopropiônico (2MPA). Para os isolados provenientes de um surto hospitalar, todos foram positivos para o gene SPM-1. Uma maior concordância de resultados, para estes isolados, foi verificada com o teste do disco combinado IMP-EDTA. Para o outro grupo de amostras, provenientes de pacientes com fibrose cística, uma maior concordância foi também verificada para o teste de disco combinado EDTA-IMP. Entretanto, para este grupo de amostras, mais resultados falso-positivos (teste fenotípico positivo sem a presença do gene) foi verificada, principalmente para os testes de sinergismo com duplos discos (manuscrito 6). Cabe salientar que o inibidor 2MPA parece ter produzido resultados menos preditores do que o EDTA.

Por fim, nós avaliamos a presença dos principais genes envolvidos nos circuitos de quorum sensing descritos em *P. aeruginosa*. Nossos revelaram quatro amostras deficientes para os genes *lasI*, *lasR*, *rhlI* e *rhlR*, e duas amostras deficientes para os genes *lasI* e *lasR*. Interessantemente, todos estes isolados foram incapazes de produzir biofilme *in vitro*. Este resultado corrobora com achados de outros estudos que demonstram uma perda de infecividade/virulência entre *P. aeruginosa* defectivas no sistema quorum sensing, principalmente com relação ao sistema *las* (manuscrito 7). Ao nosso conhecimento, no Brasil, esta é a primeira descrição de amostras *lasI/lasR*⁻ e *rhlI/rhlR*⁻. Uma amostra abrigando todos os genes foi incapaz de produzir biofilme. Isto pode demonstrar que outros fatores/componentes genéticos ainda pouco elucidados possam estar concomitantemente influenciando sobre o mecanismo de produção de biofilme e expressão de moléculas acil-homoserina-lactonas.

VI. CONCLUSÕES GERAIS

Este trabalho obteve as seguintes conclusões:

A produção de biofilmes é uma característica da maioria das amostras de *P. aeruginosa*, independentemente do sítio de isolamento e da condição clínica do paciente;

Um variado grau de formação de biofilme pode ser apresentado por *P. aeruginosa*. Esta característica possivelmente é influenciada por condições intrínsecas e extrínsecas à bactéria;

Pseudomonas aeruginosa isoladas de pacientes com fibrose cística apresentam níveis de resistência semelhantes àsquelas isoladas de pacientes sem fibrose cística quanto às diferentes classes de antimicobianos, exceto carbapenêmicos (imipenem e meropenem);

A auxotrofia é um fenômeno relacionado à condição do paciente, principalmente àqueles portadores da doença fibrose cística, embora, menos freqüentemente, é possível sua ocorrência em outras condições clínicas;

Metionina é o principal aminoácido único requerido pela maioria dos isolados auxotróficos;

A produção de moléculas autoindutoras (AHLs) é semelhantemente produzida por *P. aeruginosa* (tal qual a produção de biofilme) e parece ser uma característica dependente da densidade celular;

SPM-1 foi o gene de metalo- β -lactamase (MBL) mais prevalente entre os isolados de *P. aeruginosa* de origem não fibrocística e IMP-1, em nosso grupo de amostras, foi o mais prevalente entre isolados clínicas de fibrose cística;

O modo de crescimento em biofilme e expressão de mecanismos de resistência, como produção de MBL, pode coexistir. A sobreposição destes fatores leva a uma maior dificuldade de erradicação das infecções ocasionadas por *P. aeruginosa*;

A deficiência em algum sistema de quorum sensing pode tornar a bactéria menos virulenta ou, até mesmo, avirulenta e representa um importante alvo para novas estratégias de tratamento das infecções.

VII. REFERENCIAS

AGARWAL, G.; KAPIL, A.; KABRA, S.K.; DAS, B.K.; DWIVEDI, S.N. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from chronically infected children with cystic fibrosis in India. *BMC Microbiology*, v. 5, p. 43-46, 2005.

ALKAWASH, M.A.; SOOTHILL, J.S., SCHILLER, N.L. Alginate lyase enhances antibiotic killing of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *Acta Patologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, v. 114, p. 131-138, 2006.

ARAKAWA, Y.; SHIBATA, N.; SHIBAYAMA, K.; KUROKAWA, H.; YAGI, T.; FUJIWARA, H.; GOTO, M. Convenient Test for Screening Metallo- β -lactamase-Producing Gram-Negative Bacteria by Using Thiol Compounds. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 17, p. 40-43, 2000.

BAKER, N.R.; MINOR, V.; DEAL, C.; SHAHRABADI, M.S.; SIMPSON, D.A.; WOODS, D.E. *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S is an adhesion. *Infection and Immunity*, v. 59, p. 2859-2863, 1991.

BARTH, A.L.; PITT, T.L. Auxotrophy of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* from cystic fibrosis patients. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 33, p. 2192-2194, 1995.

BARTH, A.L.; WOODFORD, N.; PITT, T.L. Complementation of methionine auxotrophs of *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis. *Current in Microbiology*, v. 36, p. 190-195, 1998.

BHAMRA, M.; TYRRELL, M.R.; HULME, A.L.; DYE, J.F.; DUDLEY, H.A. Targeting of microdiscs in white cells to tibial abscesses in rabbits. *Journal of Orthopaedic Research*, v. 11, p. 412-415, 1993.

BORRIELLO, G.; RICHARDS, L.; EHRLICH, G.D.; STEWART, P.S. Arginine or nitrate enhances antibiotic susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 50, p. 382-384, 2006.

BORRIELLO, G.; WERNER, E.; ROE, F.; KIM, A.M.; EHRLICH, G.D.; STEWART, P.S. Oxygen limitation contributes to antibiotic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 48, p. 2659-2664, 2004.

BRUMLIK, M.J.; STOREY, D.G. Zinc and iron regulate translation of the gene encoding *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *Molecular Microbiology*, v. 6, p. 337-344, 1992.

CATLIN, B.W. Genetic basis of the association of sulphonamide resistance with methionine auxotrophy in *Neisseria gonorrhoeae*. *Journal of Genetic Microbiology*, 135: 1101-1111, 1989.

CHAN, C.; BURROWS, L.L.; DEBER, C.M. Alginate as an auxiliary bacterial membrane: binding of membrane-active peptides by polysaccharides. *Journal of Peptide Research*, v. 65, p. 343-351, 2005.

CICMANEC, J.F.; HOLDER, I.A. Growth of *Pseudomonas aeruginosa* in normal and burned skin extract: role of extracellular proteases. *Infection and Immunity*, v. 25, p. 477-483, 1979.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Seventeenth Informational Supplement, CLSI document M100-S17. Wayne, PA: Clinical Laboratory and Standards Institute (formerly NCCLS), 2007.

COMITE DE L'ANTIBIOGRAMME DE LA SOCIETE FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE. Report 2000-2001.

COSTERTON, J.W.; LAM, J.; LAM, K.; CHAN, R. The role of the microcolony mode of growth in the pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Reviews in Infectious Diseases*, v. 5, p. S867-S873, 1983.

DE KIEVIT, T.R.; GILLIS, R.; MARX, S.; BROWN, C.; IGLEWSKI, B.H. Quorum-sensing genes in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: their role and expression patterns. *Applied in Environmental Microbiology*, v. 67, p. 1865-1873, 2001.

DE KIEVIT, T.R.; IGLEWSKI, B.H. Quorum sensing, gene expression, and *Pseudomonas* biofilms. *Methods Enzymology*, v. 310, p. 117-128, 1999.

DENERVAUD, V.; TUQUOC, P.; BLANC, D.; FRAVE-BONTE, S.; KRISHNAPILLAI, V.; REIMMANN, C.; HAAS, D.; VAN DELDEN, C. Characterization of cell-to-cell signaling-deficient *Pseudomonas aeruginosa* strains colonizing intubated patients. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, p. 554-562, 2004.

DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 15, p. 167–193, 2002.

FRAVE-BONTE, S.; KOHLER, T.; VAN DELDEN, C. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*: role of the C4-HSL cell-to-cell signal and inhibition by azithromycin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 52, p. 598-604, 2003.

FRAVE-BONTE, S.; PACHE, J.C.; ROBERT, J.; BLANC, D.; PECHERE, J.C., VAN DELDEN, C. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals in lung tissue of cystic fibrosis patients. *Microbial Pathogenicity*, v. 32, p. 143-147, 2002.

FIELD, T.R.; WHITE, A.; ELBORN, J.S.; TUNNEY, M.M. Effect of oxygen limitation on the in vitro antimicrobial susceptibility of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* grown planktonically and as biofilms. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v. 24, p. 677-687, 2005.

FILIATRAULT, M.J.; PICARDO, K.F.; NGAI, H.; PASSADOR, L.; IGLEWSKI, B.H. Identification of *Pseudomonas aeruginosa* genes involved in virulence and anaerobic growth. *Infection and Immunity*, v. 74, p. 4237-4245, 2006.

GAMBELLO, M.J.; IGLEWSKI, B.H. Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* lasR gene, a transcriptional activator of elastase expression. *Journal of Bacteriology*, v. 173, p. 3000-3009, 1991.

HASSETT, D.J.; CUPPOLETTI, J.; TRAPNELL, B.; LYMAR, S.V.; ROWE, J.J.; YOON, S.S.; HILLIARD, G.M.; PARVATIYAR, K.; KAMANI, M.C.; WOZNIAK, D.J.; HWANG, S.H.; MCDERMOTT, T.R.; OCHSNER, U.A. Anaerobic metabolism and quorum sensing by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in chronically infected cystic fibrosis airways: rethinking antibiotic treatment strategies and drug targets. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 54, p. 1425-43, 2002.

HAUSSLER, S.; ZIEGLER, I.; LOTTEL, A.; VON GOTZ, F.; ROHDE, M.; WEHMHOHNER, D.; SARAVANAMUTHU, S.; TUMMLER, B.; STEINMETZ, I.

Highly adherent small-colony variants of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Journal of Medical Microbiology*, v. 52, p. 295-301, 2003.

HENTZER, M.; TEITZEL, G.M.; BALZER, G.J.; HEYDORN, A.; MOLIN, S.; GIVSKOV, M.; PARSEK, M.R. Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function. *Journal of Bacteriology*, v. 183, p. 5395-5401, 2001.

HINGLEY, S.T.; HASTIE, A.T.; KUEPPERS, F.; HIGGINS, M.L.; WEINBAUM, G. Bacterial ciliostatic factors; effect on respiratory cilia. *European Journal of Respiratory Diseases Suppl.* 146, p. 291-293, 1986.

HOWE, T.R.; IGLEWSKI, B.H. Isolation and characterization of alkaline protease-deficient mutants of *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and in a mouse eye model. *Infection and Immunity*, v. 43, p. 1058-1063, 1984.

IGLEWSKI, B.H.; SADOFF, J.; BJORN, M.J.; MAXWELL, E.S. *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S: an adenosine diphosphate ribosyltransferase distinct from toxin A. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 75, p. 3211-3215, 1978.

IMAMURA Y, YANAGIHARA K, MIZUTA Y, SEKI M, OHNO H, HIGASHIYAMA Y, MIYAZAKI Y, TSUKAMOTO K, HIRAKATA Y, TOMONO K, KADOTA J, KOHNO S. Azithromycin inhibits MUC5AC production induced by the *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer N-(3-Oxododecanoyl) homoserine lactone in NCI-H292 cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 48, p. 3457–3461, 2004.

INOUE, H.; NAKAGAWA, T.; MORIHARA, K. *Pseudomonas aeruginosa* proteinase. II. Molecular weight and molecular dimension. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.73, p. 125-131, 1963.

JANDA, J.M.; BOTTONE, E.J. *Pseudomonas aeruginosa* enzyme profiling: predictor of potential invasiveness and use as an epidemiological tool. *Journal of Clinical Microbiology* v. 14, p. 55-60, 1981.

KANTHAKUMAR, K.; TAYLOR, G.; TSANG, K.W.; CUNDELL, D.R.; RUTMAN, A.; SMITH, S.; JEFFERY, P.K.; COLE, P.J.; WILSON, R. Mechanisms of action of *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin on human ciliary beat in vitro. *Infection and Immunity*, v. 61, p. 2848-2853, 1993.

therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian teaching hospital. *Epidemiology and Infection*, v.135, p. 343-345, 2007.

MATHEE, K.; CIOFU, O.; STERNBERG, C.; LINDUM, P.W.; CAMPBELL, J.I.; JENSEN, P.; JOHNSEN, A.H.; GIVSKOV, M.; OHMAN, D.E.; MOLIN, S.; HOIBY, N.; KHARAZMI, A. Mucoïd conversion of *Pseudomonas aeruginosa* by hydrogen peroxide: a mechanism for virulence activation in the cystic fibrosis lung. *Microbiology*, v. 145, p. 1349-1357, 1999.

MISFELDT, M.L. Microbial "superantigens". *Infection and Immunity*, v. 58, p. 2409-2413, 1990.

MOSKOWITZ, S.M.; FOSTER, J.M.; EMERSON, J.; BURNS, J.L. Clinically feasible biofilm susceptibility assay for isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, p. 1915-1922, 2004.

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

NIKOLAEV, Y.A.; PLAKUNOV, V.K. Biofilm - "City of Microbes" or an analogue of multicellular organisms? *Microbiology*, v. 76, p. 125-138, 2007.

NORDMANN, P.; POIREL, L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 8; p. 321-331, 2002.

PELLEGRINO, F.L.P.C.; SANTOS, K.R.N.; RILEY, L.W.; MOREIRA, B.M. *bla*GES carrying *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a public hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 10, p. 251-253, 2006.

PICÃO, R.C.; POIREL, L.; GALES, A.C.; NORDMAN, P. Diversity of β -Lactamases Produced by Ceftazidime-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Causing Bloodstream Infections in Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 53, p. 3908-3913, 2009.

QUINN, J.P. *Pseudomonas aeruginosa* infections in the intensive care unit. *Semin Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 24, p. 61-68, 2003.

RAS, G.J.; ANDERSON, R.; TAYLOR, G.W.; SAVAGE, J.E.; VAN NIEKERK, E.; JOONE, G.; KOORNHOF, H.J.; SAUNDERS, J.; WILSON, R.; COLE, P.J. Clindamycin, erythromycin, and roxithromycin inhibit the proinflammatory interactions of *Pseudomonas aeruginosa* pigments with human neutrophils in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 36, p. 1236-1240, 1992.

SAUER, K.; CAMPER, A.K.; EHRLICH, G.D.; COSTERTON, J.W.; DAVIES, D.G. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Journal of Bacteriology*, v. 184, p. 1140–1154, 2002.

SCHARMANN, W. Interaction of purified leukocidin from *Pseudomonas aeruginosa* with Bovine polymorphonuclear leukocytes. *Infection and Immunity*, v. 13, p. 1046-1053, 1976.

SCHARMANN, W.; JACOB, F.; PORSTENDORFER, J. The cytotoxic action of leucocidin from *Pseudomonas aeruginosa* on human polymorphonuclear leukocytes. *Journal of Genetic Microbiology*, v. 93, p. 303-308, 1976.

SHELLITO, J.; NELSON, S.; SORENSEN, R.U. Effect of pyocyanine, a pigment of *Pseudomonas aeruginosa*, on production of reactive nitrogen intermediates by murine alveolar macrophages. *Infection and Immunity*, v. 60, p. 3913-3915, 1992.

SINGH, P.K.; SCHAEFER, A.L.; PARSEK, M.R.; MONINGER, T.O.; WELSH, M.J.; GREENBERG, E.P. Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. *Nature*, v. 407, p. 762-764, 2000.

SOBERON-CHAVEZ, G.; AGUIRRE-RAMIREZ, M.; ORDONEZ, L. Is *Pseudomonas aeruginosa* only "sensing quorum"? *Critical Reviews in Microbiology*, v. 31, p. 171-182, 2005.

STAPPER, A.P.; NARASIMHAN, G.; OHMAN, D.E.; BARAKAT, J.; HENTZER, M.; MOLIN, S.; KHARAZMI, A.; HOIBY, N.; MATHEE, K. Alginate production affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development and architecture, but is not essential for biofilm formation. *Journal of Medical Microbiology*, v. 53, p. 679-690, 2004.

TINGPEJ, P.; SMITH, L.; ROSE, B.; ZHU, H.; CONIBEAR, T.; AL NASSAFI, K.; MANOS, J.; ELKINS, M.; BYE, P.; WILLCOX, M.; BELL, S.; WAINWRIGHT, C.; HARBOUR, C. (2007) Phenotypic characterization of clonal and nonclonal

Pseudomonas aeruginosa strains isolated from lungs of adults with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 45, p. 1697-1704, 2007.

TSAKRIS, A.; POURNARAS, S.; WOODFORD, N.; PALEPOU, M.F.; BABINI, G.S.; DOUBOYAS, J.; LIVERMORE, D.M. Outbreak of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1 carbapenemase in Greece. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 38, p. 1290-1292, 2000.

VASIL, M.L. *Pseudomonas aeruginosa*: biology, mechanisms of virulence, epidemiology. *Journal of Pediatrics*, v. 108, p. 800-805, 1986.

VASIL, M.L.; CHAMBERLAIN, C.; GRANT, C.C. Molecular studies of *Pseudomonas* exotoxin A gene. *Infection and Immunity*, v. 52, p. 538-548, 1986.

VENTRE, I.; GOODMAN, A.L.; VALLET-GELY, I.; VASSEUR, P.; SOSCIA, C.; MOLIN, S.; BLEVES, S.; LAZDUNSKIA LORY, S.; FILLOUX, A. Multiple sensors control reciprocal expression of *Pseudomonas aeruginosa* regulatory RNA and virulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 103, p. 171-176, 2006.

WHITELEY, M.; BANGERA, M.G.; BUMGARNER, R.E.; PARSEK, M.R.; TEITZEL, G.M.; LORY, S.; GREENBERG, E.P. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature*, v. 413, p. 860-864, 2001.

WICK, M.J.; FRANK, D.W.; STOREY, D.G.; IGLEWSKI, B.H. Identification of regB, a gene required for optimal exotoxin A yields in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, v. 4, p. 489-497, 1990.

WOZNIAK, D.J.; WYCKOFF, T.J.; STARKEY, M.; KEYSER, R.; AZADI, P.; O'TOOLE, G.A.; PARSEK, M.R. Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 100, p. 7907-7912, 2003.

YANG, W.; SHI, L.; JIA, W.X.; YIN, X.; SU, J.Y.; KOU, Y.; YI, X.; SHINODA, S.; MIYOSHI, S. Evaluation of the biofilm-forming ability and genetic typing for clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* by enterobacterial repetitive intergenic consensus-based PCR. *Microbiology and Immunology*, v. 49, p. 1057-1061, 2005.

