



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

JAILTON LOBO DA COSTA LIMA

ANÁLISE GENÔMICA E PROTEÔMICA DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *Pseudomonas aeruginosa* RESISTENTES AOS CARBAPENÊMICOS PRODUTORES DE BIOFILME

RECIFE

2021

JAILTON LOBO DA COSTA LIMA

ANÁLISE GENÔMICA E PROTEÔMICA DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *Pseudomonas aeruginosa* RESISTENTES AOS CARBAPENÊMICOS PRODUTORES DE BIOFILME

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Departamento de Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Medicina Tropical. Área de Concentração: Medicina Tropical.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Amélia Vieira Maciel

Co-orientador: Prof. Dr. Rafael Matos Ximenes

RECIFE

2021

Catálogo na fonte:
Bibliotecária: Elaine Freitas, CRB4:1790

L732a	Lima, Jailton Lobo da Costa Análise genômica e proteômica de isolados clínicos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistentes aos carbapenêmicos produtores de biofilme / Jailton Lobo da Costa Lima . – 2021. 139 f.; il. Orientadora: Maria Amélia Vieira Maciel. Coorientadora: Rafael Matos Ximenes. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical. Recife, 2021. Inclui referências e anexos. 1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>. 2. Biofilme. 3. Resistência bacteriana. I. Maciel, Maria Amélia Vieira. (orientadora). II. Ximenes, Rafael Matos. (coorientadora). III. Título. 616.9792 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2022 - 048)
-------	---

JAILTON LOBO DA COSTA LIMA

ANÁLISE GENÔMICA E PROTEÔMICA DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *Pseudomonas aeruginosa* RESISTENTES AOS CARBAPENÊMICOS PRODUTORES DE BIOFILME

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Departamento de Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Medicina Tropical. Área de concentração: Medicina tropical.

APROVADO EM 26/02/2021

AVALIADORES:

Prof^a. Dr^a Maria Amélia Vieira Maciel (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a Líbia Cristina Rocha Vilela Moura (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Bruno Severo Gomes (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Dr^a. Marcelle Aquino Rabelo (Examinador Externo)
Laboratório Federal de Defesa Agropecuária, LFDA/PE

Dr. Valdemir Vicente Silva Júnior (Examinador Externo)
Centro Universitário dos Guararapes, UNIFG

RECIFE

2021

Dedico,

A Deus, por toda força ao longo da caminhada e por não permitir que eu desistisse dos meus sonhos;

Aos meus familiares que sempre me incentivaram a buscar ser uma pessoa melhor a cada dia e que estiveram sempre ao meu lado.

Aos meus bisavós Maria Rosa Barros da Silva e Antônio Barros da Silva a quem prometi que daria muito orgulho.

AGRADECIMENTOS

A Deus que plantou o sonho em mim e por se fazer presente em todos os momentos firmes ou incertos da minha vida, transmitindo-me a segurança necessária para que eu pudesse alcançar os meus objetivos e ajudou-me a realizar meus sonhos;

Aos meus Pais (Lina Maria da Silva Lobo e Jairo da Costa Lima Júnior) que sempre me incentivaram a correr atrás dos meus sonhos;

A toda minha família, em especial aos meus avós (Neli Barros e Izaltino Lobo), a tia Carminha e aos meus irmãos e meu primo/afilhado Wesley, pelo apoio incondicional, amor, compreensão e incentivo durante todos os dias dessa jornada;

A Prof^a. Dr^a. Amélia Maciel, pela orientação, dedicação, ensinamentos, amizade, incentivo a minha carreira acadêmica (por não ter me deixado desistir do doutorado, desde a inscrição até a defesa), pelas palavras de conforto e por toda confiança depositada em mim;

Ao prof. Dr. Rafael Ximenes por sua co-orientação e ensinamentos;

A meu amigo Giwellington Albuquerque, por sua amizade ao longo dos anos, por nunca me deixar desistir dos meus sonhos e por me incentivar a sempre seguir em frente;

A minhas amigas Marília Torres e Bárbara Belo, pelo companheirismo e por todas as risadas que demos juntos e por todo incentivo para que eu chegasse até aqui;

Aos amigos do Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular: Marcelle, Armando, Jussyêgles, Rodrigo, Valdemir, Luciano e Aline;

Aos amigos da pós-graduação, em especial: Melyna, Ladjane, Karla e Isaura;

A todos que fazem parte da disciplina de Microbiologia e Imunologia da UFPE, em especial d. Djanira, Graça e Prof^a. Ivanize Aca;

Ao Prof. Bruno Severo Gomes por ter me ajudado com os primeiros passos na UFPE;

A Prof.^a Eulália por seus ensinamentos e amizade;

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste sonho, os meus mais sinceros agradecimentos.

A CAPES, ao CNPq e a UFPE, pelo suporte financeiro.

RESUMO

A ocorrência de *Pseudomonas aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos (CRPA) tornou-se um sério problema de saúde pública em todo o mundo, pois reduz as opções terapêuticas contra esse microrganismo, além disso, a produção de biofilme por estes microrganismos agrava ainda mais este problema. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a ocorrência de genes de β -lactamases e do quorum sensing (QS) em isolados de CRPA, analisar a produção de biofilme, avaliar a resposta deles frente à monoterapia com meropenem (MPM) ou polimixina B (POL B) e sua associação com azitromicina (AZT) usando pontos quânticos (QDs) e análise proteômica, além de analisar o genoma destes isolados. Seis isolados de CRPA foram analisados neste estudo. A busca dos genes das β -lactamases (*bla_{KPC}*, *bla_{SPM-1}*, *bla_{IMP}* e *bla_{VIM}*) e QS (*lasI*, *lasR*, *rhlI* e *rhlR*) foi realizada por meio de PCRs específicas e pesquisa da produção de biofilme por realizada por técnica quantitativa. Um isolado de CRPA, contendo o gene *bla_{KPC}* e produtor de biofilme, foi selecionado para avaliar sua resposta à terapia usando QDs conjugados a MPM como uma sonda e o MS pela técnica de dessorção a laser assistida por matriz / tempo de voo de ionização (MALDI-TOF) para avaliar a expressão de proteínas. O único gene de β -lactamase detectado foi o *bla_{KPC}* em 66,7% dos isolados. Todos os isolados foram produtores de biofilme e portadores dos genes do QS. Os conjugados QDs-MPM desencadearam a formação de biofilme pelo isolado e a associação com AZT inibiu esse efeito. A análise proteômica mostrou que os tratamentos com MPM ou POL B suprimiram a expressão da proteína transglicosilase, enquanto a terapia combinada com AZT resultou na expressão da proteína RpoN. O sequenciamento genômico dos isolados foi realizado usando a plataforma Illumina MiSeq. A montagem foi realizada usando o pipeline A5-miseq, e a predição do gene foi determinada usando os pipelines RAST e Prokka. A análise de MLST foi conduzida usando a ferramenta do site <http://www.genomicepidemiology.org/>. A análise genômica mostrou a presença de um genoma maior no isolado JX03, apresentando 6.136.978 bp, enquanto o isolado JX05 teve um genoma com 5.607.393 bp. O resistoma revelou que os isolados abrigavam o gene *bla_{KPC}* em um pequeno contig associado com ISKpn6, e ambos tinham genes relacionados à bombas de efluxo, mutações do gene *gyrA*, genes de porina e enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AMEs). A análise de MLST revelou que o isolado JX03 pertence ao tipo clonal ST244, enquanto o JX05 pertence ao ST277, clone epidêmico brasileiro. Além disso, descrevemos neste estudo o primeiro relato de um isolado pertencente

ao clone ST277 portador do gene *bla_{KPC}* sem apresentar o gene *bla_{SPM-1}*. Assim, este estudo mostra que o uso da fluorescência combinada com a análise proteômica foi promissor para entender como uma cepa de CRPA reage ao tratamento antimicrobiano e também demonstra a disseminação do gene *bla_{KPC}* no país como um dos principais mecanismos de resistência aos carbapenêmicos.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*; biofilme; resistência bacteriana.

ABSTRACT

The occurrence of *Pseudomonas aeruginosa* resistant to carbapenems (CRPA) has become a serious public health problem worldwide, as it reduces the therapeutic options against this microorganism, in addition, the production of biofilm by these microorganisms further aggravates this problem. In this context, the present study aimed to evaluate the occurrence of β -lactamases and quorum sensing (QS) genes in CRPA isolates, analyze biofilm production, research their response to meropenem monotherapy (MPM) or polymyxin B (POL B) and its association with azithromycin (AZT) using quantum dots (QDs) and proteomic analysis, in addition to analyzing the genome of these isolates. Six CRPA isolates were analyzed in this study. The search for the genes of β -lactamases (*bla_{KPC}*, *bla_{SPM-1}*, *bla_{IMP}* e *bla_{VIM}*) and QS (*lasI*, *lasR*, *rhlI* e *rhlR*) was carried out by means of specific PCRs and research on biofilm production using a quantitative technique. A CRPA isolate, containing the *bla_{KPC}* gene and biofilm producer, was selected to assess its response to therapy using QDs conjugated to MPM as a probe and the MS by the ion-assisted matrix / flight time laser desorption technique (MALDI -TOF) to evaluate protein expression. The only β -lactamase gene detected was *bla_{KPC}* in 66.7% of the isolates. All isolates were biofilm producers and carriers of the QS genes. The QDs-MPM conjugates triggered the formation of biofilm by the isolate and the association with AZT inhibited this effect. Proteomic analysis showed that treatments with MPM or POL B suppressed the expression of the transglycosylase protein, while combined therapy with AZT resulted in the expression of the RpoN protein. Genomic sequencing of the isolates was performed using the Illumina MiSeq platform. The assembly was performed using the A5-miseq pipeline, and the gene prediction was determined using the RAST and Prokka pipelines. The MLST analysis was conducted using the tool on the website <http://www.genomicepidemiology.org/>. Genomic analysis showed the presence of a larger genome in isolate JX03, presenting 6,136,978 bp, while isolate JX05 had a genome with 5,607,393 bp. The resistoma revealed that the isolates harbored the *bla_{KPC}* gene in a small contig associated with ISKpn6, and both had genes related to efflux pumps, gyrA mutations, porin genes and aminoglycoside-modifying enzymes (AMEs). The MLST analysis revealed that the isolate JX03 belongs to the clonal type ST244, while the JX05 belongs to ST277, a Brazilian epidemic clone. In addition, we describe in this study the first report of an isolate belonging to clone ST277 carrying the *bla_{KPC}* gene without presenting the *bla_{SPM-1}* gene. Thus, this study shows that the use of fluorescence combined with proteomic analysis was

promising to understand how a CRPA strain reacts to antimicrobial treatment and also demonstrates the dissemination of the *bla_{KPC}* gene in the country as one of the main mechanisms of resistance to carbapenems.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa* biofilm; bacterial resistance

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição de carbapenemases de classe B na América Latina e no Caribe	20
Figura 2 - Distribuição de carbapenemases de classe A na América Latina e no Caribe	21
Figura 3 - Representação circular do genoma de <i>P. aeruginosa</i> PAO1	23
Figura 4 - Esquema de identificação de microrganismos pela técnica de MALDI-TOF MS	24
Figura 5 - Mecanismos de resistência a antibióticos mediada por biofilme	28
Figura 6 - Esquema representativo do desenvolvimento de um biofilme de <i>P. aeruginosa</i>	29
Figura 7 - Modelo esquemático do papel central do quorum sensing na regulação da produção de fatores de patogenicidade em <i>P. aeruginosa</i>	30
Figura 8 - Infecções relacionadas ao biofilme	32
Figura 9 - Principais alvos para combate aos biofilmes microbianos	33
Figura 10 - Representação esquemática de um ponto quântico	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Primers usados na detecção dos genes das β -lactamases e do QS	38
Tabela 2 - Grupos experimentais usados para análises proteômicas	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AHLs	Acil-homoserina lactonas
AZT	Azitromicina
BGNF	Bacilo Gram-negativo não fermentador
BHI	Brain Heart Infusion
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CBMB	Concentração Bactericida Mínima em Biofilme
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CEF	Cefepime
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CHCA	Ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DNA	Ácido desoxirribonucleico
GEN	Gentamicina
IRAS	Infecções relacionadas à assistência à saúde
MDR	Multidroga resistente
MDS	Multidroga sensível
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
MPM	Meropenem
MvfR	Múltiplo fator de virulência R
PBS	Solução salina tamponada, pH 7,4

QD	Quantum dots
QS	Quorum-sensing
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
XDR	Extensivamente droga resistente

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1	PSEUDOMONAS AERUGINOSA	18
2.2	<i>P. AERUGINOSA</i> RESISTENTE AOS CARBAPENÊMICOS (CRPA)	19
2.3	ABORDAGENS ÔMICAS PARA EXPLORAR O ESTILO DE VIDA DA <i>P. AERUGINOSA</i>	22
2.3.1	Sequenciamento Genômico	22
2.3.2	Maldi ToF MS	23
2.4	PAN-GENOMA	24
2.5	FATORES DE VIRULÊNCIA	25
2.6	BIOFILME	27
2.7	QUORUM SENSING	28
2.8	INFECÇÕES ASSOCIADAS AO BIOFILME	31
2.9	ESTRATÉGIAS DE COMBATE A FORMAÇÃO DE BIOFILME	32
2.10	QUANTUM DOTS	33
3	OBJETIVOS	35
3.1	OBJETIVO GERAL	35
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
4	MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1	IDENTIFICAÇÃO E TESTE DE SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA (TSA) ..	36
4.2	ENSAIO DA PRODUÇÃO DE BIOFILME	36
4.3	EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA	37
4.4	DETECÇÃO DOS GENES DE MβL (<i>bla_{SPM-1}</i> , <i>bla_{IMP}</i> , <i>bla_{VIM}</i>) e o <i>bla_{kpc}</i>	37
4.5	DETECÇÃO DOS GENES DO QS	37
4.6	ERIC-PCR	38

4.7	SÍNTESE DE CDTE QDS E CONJUGAÇÃO DE QDS AO MEROPENEM	39
4.8	INÓCULO BACTERIANO E MARCAÇÃO COM O CONJUGADO QDS-MPM ..	39
4.9	EFEITOS DOS CONJUGADOS DE QDS NO CRESCIMENTO BACTERIANO ..	39
4.10	EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DOS CONJUGADOS QDS-MPM COM AZITROMICINA	40
4.11	ANÁLISE PROTEÔMICA POR MALDI-TOF MS	40
4.12	SEQUENCIAMENTO GENÔMICO	42
4.13	MONTAGEM DO GENOMA	42
4.14	ANÁLISE GENÔMICA	42
4.15	PAN-GENOMA	42
4.16	<i>MULTILOCUS SEQUENCE TYPING</i> (MLST)	43
4.17	PREDIÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA	43
5	RESULTADOS	44
5.1	ARTIGO 1 - OCCURRENCE OF <i>BLA_{KPC}</i> GENE IN CLINICAL ISOLATES OF <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> PROCEEDING OF BRAZIL	44
5.2	ARTIGO 2 - ANALYSES OF THE RESPONSE OF CARBAPENEM RESISTANT <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> AGAINST MONOTHERAPY AND COMBINED THERAPY USING QUANTUM DOTS AND PROTEOMICS..	67
5.3	ARTIGO 3 - PANGENOMA ANALYSIS OF TWO CLINICAL ISOLATES OF CARBAPENEM-RESISTANT <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> HARBORING THE <i>BLA_{KPC}</i> GENE	95
6	CONCLUSÕES	118
	REFERÊNCIAS	119
	ANEXO A - COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO À REVISTA ABCS HEALTH SCIENCES	124
	ANEXO B - COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO À REVISTA MICROBIAL PATHOGENESIS	125
	ANEXO C - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	139

1 INTRODUÇÃO

Pseudomonas aeruginosa é um patógeno oportunista associado a diversos tipos de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), sendo, portanto, uma ameaça à saúde global devido à sua capacidade de adaptação a vários ambientes e ao elevado perfil resistência aos antimicrobianos (LIMA et al., 2020). Por esta razão, este microrganismo foi incluído na lista de microrganismos prioritários para desenvolvimento estratégias de controle e prevenção de infecções da organização mundial da saúde (OMS) (LUPO et al, 2018; BRINK 2019). *P. aeruginosa* coloniza o trato respiratório superior e o trato urinário, incluindo os rins. Devido à colonização prévia desses locais, *P. aeruginosa* é comumente relatada em infecções cirúrgicas, de feridas, do trato urinário (ITU), pneumonia, dermatite e em infecções respiratórias sistêmicas em pacientes com fibrose cística e bacteremia (KHAN, AHMAD & MEHBOOB, 2015). A patogênese da infecção por *P. aeruginosa* é mediada por diferentes fatores de virulência, dividindo-se em três fases: adesão e colonização bacteriana, invasão local e disseminação sistêmica da infecção (LIMA et al., 2018).

Um fator de virulência importante produzido por *P. aeruginosa* que favorece a sua patogênese é a sua capacidade de formar biofilmes, uma vez que estas estruturas se tornaram um grande problema na área médica porque as infecções associadas ao biofilme apresentam alta resistência a antibióticos e a resposta imune do hospedeiro (LIMA et al., 2018; OLIVARES et a., 2020; RODRIGUES et al., 2020; SHAO et al., 2020). Biofilmes são comunidades estruturadas de microrganismos envolvidas por uma matriz extracelular (ME) aderida a superfícies bióticas ou abióticas, que favorecem a sua sobrevivência, principalmente em ambientes hostis. Além disso, o biofilme protege os microrganismos da resposta imune do hospedeiro, além de conferir tolerância à terapia antimicrobiana, pois impede a penetração da maioria dos antimicrobianos na ME, o que requer doses maiores que são praticamente impossíveis de atingir in vivo devido à sua toxicidade inerente (WU et al., 2015; LIMA et al., 2018; MAURICE et al., 2018; KAMALI et al., 2020).

Os antimicrobianos da classe dos carbapenêmicos são amplamente utilizados no tratamento de infecções por bactérias gram-negativas, atuando na inibição da síntese da parede celular bacteriana, sendo o meropenem (MPM) mais eficaz do que o imipenem contra cepas de *P. aeruginosa* (HORCAJADA et al., 2019, SANTOS et. Al., 2019). Outra vantagem desses antimicrobianos é a estabilidade contra as enzimas β -lactamases de espectro ampliado

(ESBL), embora sejam hidrolisadas pela enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), que possui maior poder hidrolítico. Devido ao surgimento de cepas de *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos (CRPA), tem havido uma limitação das opções terapêuticas, sugerindo o uso de combinações de antimicrobianos contra essas cepas, que podem incluir o uso de β -lactâmicos com inibidores de β -lactamases, polimixinas, aminoglicosídeos e até mesmo o uso de meropenem (HORCAJADA et al., 2019; MONTERO et al., 2019; PATRIER & TIMSIT 2019). A combinação de diferentes mecanismos de resistência nos isolados de CRPA com a capacidade de produção do biofilme, a dificuldade do tratamento da infecção será ainda maior (PANG et al, 2019).

Como alternativa terapêutica frente às infecções associadas a biofilmes de *P. aeruginosa*, a associação entre macrolídeos, principalmente a azitromicina e os antimicrobianos anti-*Pseudomonas*, tem se mostrado promissora por associar a ação antivirulência e anti-inflamatória dos macrolídeos com a ação bactericida de outros antimicrobianos, favorecendo o tratamento desta infecção. (ROVETA et al., 2007; TRÉ-HARDY et al., 2008; CIRIONI et al., 2011; SAINI; CHHIBBER; HARJAI, 2015; THELLIN et al., 2015; XU et al., 2015; WANG et al., 2016; THOMSEN et al., 2020) Embora os estudos demonstrem que as terapias associativas são promissoras frente aos biofilmes de *P. aeruginosa*, ainda não foi avaliado o efeito do tratamento associativo entre antimicrobianos anti-*Pseudomonas* e a azitromicina frente a biofilmes produzidos por isolados de *P. aeruginosa* multidroga resistente (MDR) e extensivamente resistente a drogas (XDR), requerendo a investigação da efetividade de novas associações de antimicrobianos frente a estas infecções associadas ao biofilme.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi detectar a ocorrência de genes de β -lactamases, analisar a capacidade de produção de biofilme e a presença de genes relacionados à formação do biofilme nestes isolados, avaliar a resposta de isolados de CRPA contra monoterapia com meropenem (MPM) ou polimixina B (POL B) e sua associação com azitromicina (AZT) usando pontos quânticos (QDs) e análise proteômica, além de analisar o genoma destes isolados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

O gênero *Pseudomonas* compreende mais de 130 espécies, sendo a maioria delas sapróbia (TODAR, 2009). Este gênero foi classificado em 5 grupos de homologia de *rRNA-DNA* sendo o grupo I de *rRNA* o que mantém a designação de gênero *Pseudomonas* (PALLERONI, 1984; KLOCKGETHER & TÜMMLER, 2017; BEHZADI, BARÁTH & GAJDÁCS, 2021). Bactéria caracterizada como bacilo Gram-negativo não fermentador (BGNF), pertencente à família *Pseudomonadaceae*, que se apresenta como bacilo reto ou ligeiramente curvo, com tamanho de 0,5 - 1,0 µm por 1,5 - 4,0 µm, aeróbio estrito, móvel (apresenta um ou mais flagelos polares), e não produz esporos (GIAMARELLOU, 2002; KLOCKGETHER & TÜMMLER 2017; BEHZADI, BARÁTH & GAJDÁCS, 2021).

Os microrganismos dessa espécie são ubíquos, com predileção por ambientes úmidos, podendo ser encontrados no solo, na água, nos alimentos, colonizando o trato gastrointestinal do ser humano e de outros animais, além do ambiente hospitalar (HARMSEN et al., 2010; KHAN, AHMAD & MEHBOOB, 2015). São pouco frequentes na microbiota de indivíduos saudáveis, entretanto, os pacientes hospitalizados, principalmente os internados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI), se colonizam facilmente devido a frequente exposição a instrumentos e aparelhos auxiliares, mãos dos profissionais de saúde e ao uso indiscriminado de antimicrobianos de largo espectro. O trato gastrointestinal é o principal sítio de colonização e de reservatório de *P. aeruginosa*, podendo ser encontrada ainda em outras áreas úmidas do corpo, como orofaringe, mucosa nasal e axilas (KISKA et al., 2003; KHAN, AHMAD & MEHBOOB, 2015).

Este microrganismo está envolvido em doenças oportunistas, sendo um dos principais causadores de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), particularmente em pacientes imunocomprometidos, podendo provocar dermatites, infecções urinárias e uma grande variedade de infecções sistêmicas, principalmente em ambientes hospitalares. Além de apresentar um elevado grau de resistência a diversos antimicrobianos (FIGUEIREDO et al., 2009; PEDROSA et al., 2014; LIMA et al., 2018). Sua patogenicidade é resultado de sua capacidade de adaptação fenotípica e seu elevado grau de plasticidade genômica. *P. aeruginosa* aumenta sua patogenicidade e síntese de fatores de virulência quando exposta a condições de estresse ou ainda quando altera seu modo de crescimento, gerando biofilmes

(RODRIGUES, 2014). Assim, ao promoverem o crescimento de populações bacterianas de forma coletiva, os biofilmes fornecem à espécie mecanismos adicionais de adaptação, como a capacidade de sintetizar substâncias sinalizadoras que medeiam o comportamento do biofilme bem como a síntese de determinantes de virulência (HAÜSSLER; BECKER, 2008).

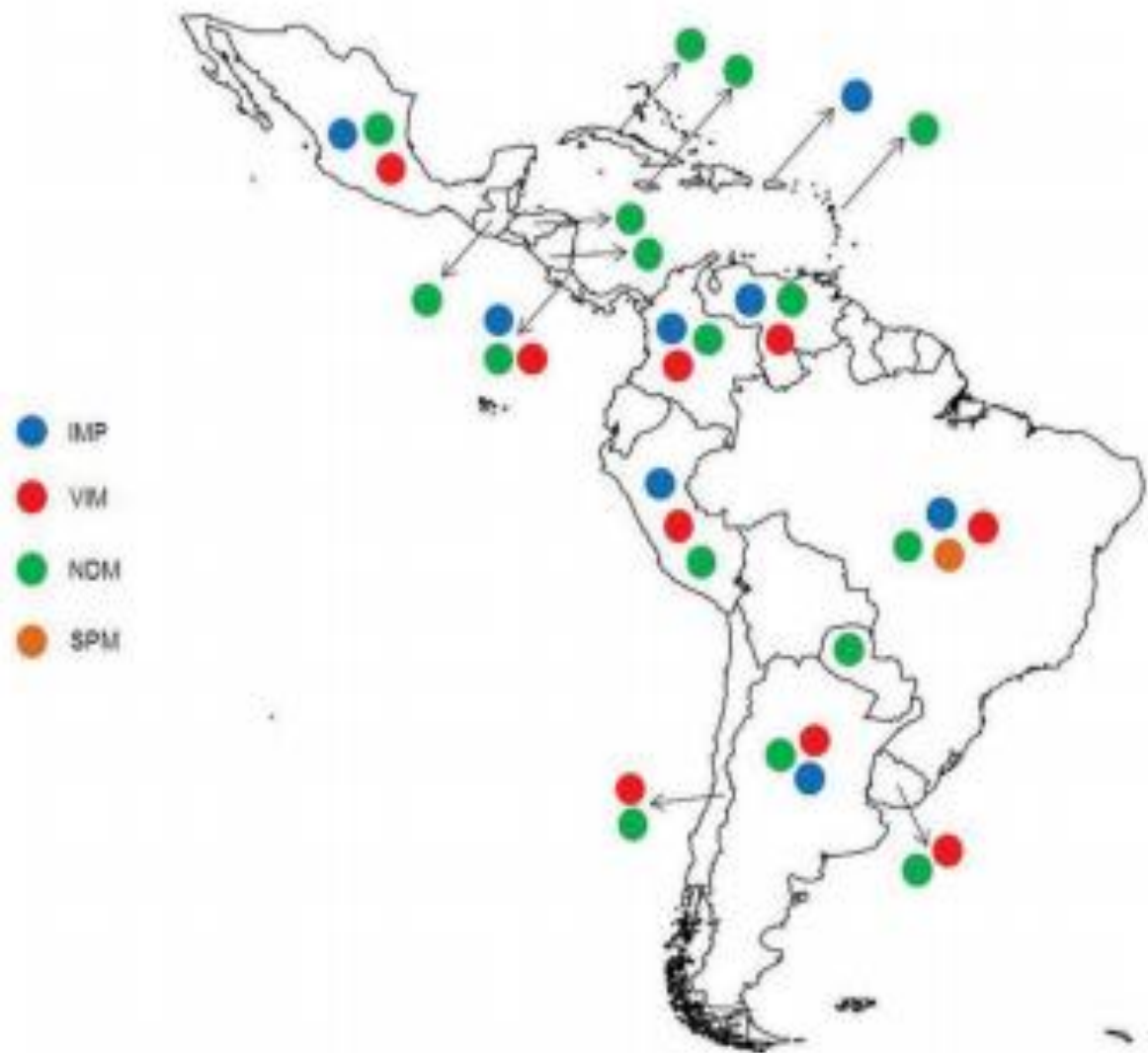
2.2 *P. AERUGINOSA* RESISTENTE AOS CARBAPENÊMICOS (CRPA)

O surgimento de cepas de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos (CRPA) está relacionado a diferentes mecanismos, dentre os quais se destacam a ocorrência de mutações que afetem a permeabilidade destes microrganismos para estes fármacos, além da hiperexpressão de sistemas de efluxo a múltiplos fármacos que podem conferir resistência a uma ampla variedade de antimicrobianos (PANG et al., 2019). Além destes mecanismos, deve-se destacar a produção de enzimas β -lactamases, incluindo as metalo- β -lactamases, destacando-se no Brasil a São Paulo metalo- β -lactamase (SPM-1), cuja ocorrência é endêmica, com todos os casos fora do Brasil estando relacionada a internamentos prévios no país, (figura 1).

Outras enzimas importantes são as carbapenamases, destacando-se a *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), que possui ampla atividade hidrolítica contra cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos (SANTOS et al., 2019).

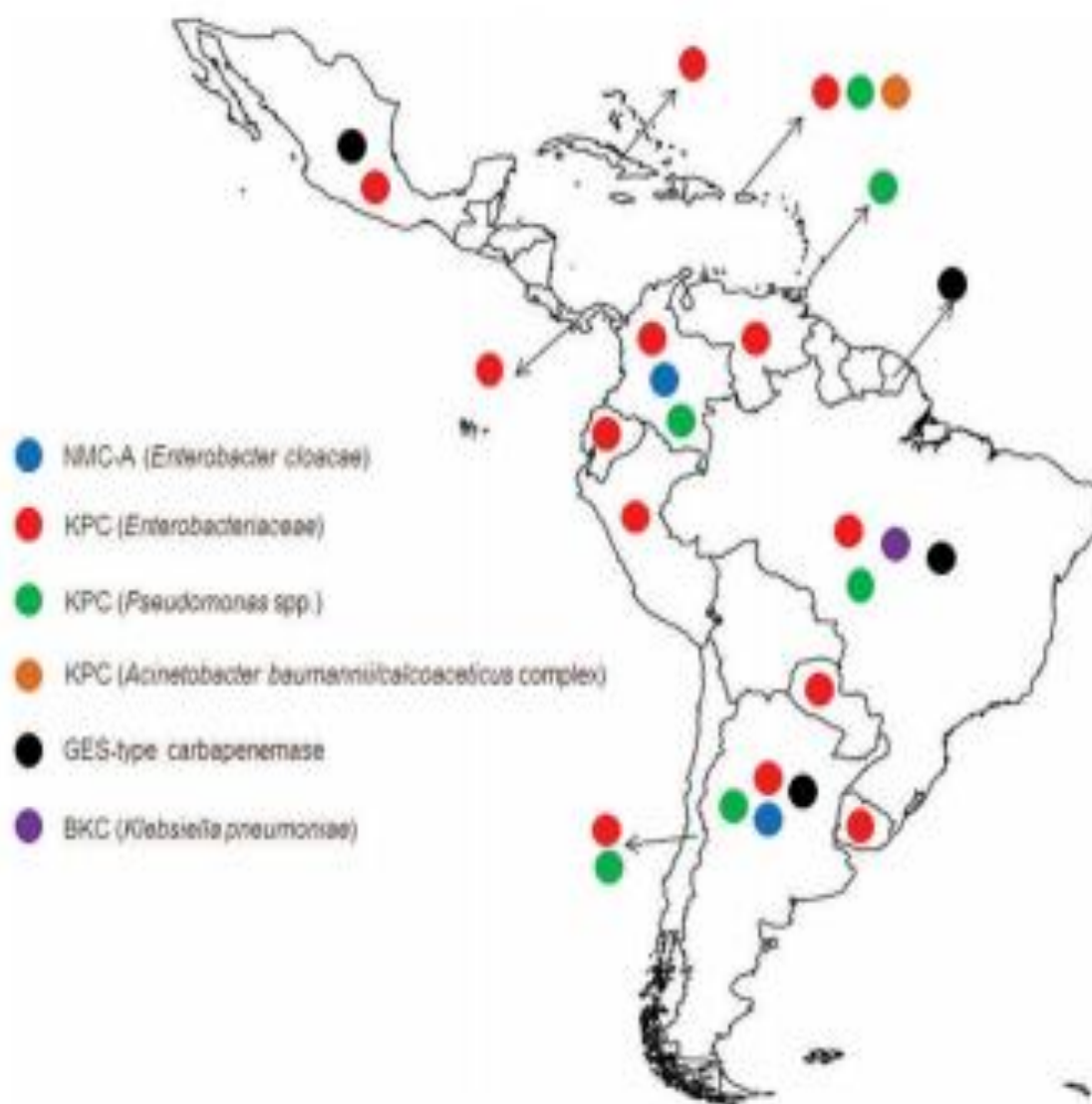
A enzima KPC apresenta elevada disseminação global, sendo amplamente detectada em membros da ordem Enterobacterales, sendo menos frequente entre os bacilos Gram-negativos não fermentadores (BGNNF), embora haja vários relatos da ocorrência desta enzima em *P. aeruginosa* no mundo, (figura 2). A descrição do primeiro relato dessa enzima neste microrganismo ocorreu em 2006 na Colômbia (VILLEGAS et al. 2007). Até o momento a sua ocorrência em *P. aeruginosa* foi relatada nos seguintes países: nas Américas: Brasil (JACOMÉ et al. 2012), Argentina (RAMIREZ et al., 2013), México (MORALES-ESPINOSA et al., 2017), Porto Rico (Wolter et al., 2009), Trinidad e Tobago (AKPAKA et al., 2009), Estados Unidos da América (EUA) (Poirel et al., 2010) e Canadá (WALKTY et al., 2019); na Europa: Alemanha (HAGEMANN et al., 2018) e Espanha (PEREZ-VAZQUEZ et al., 2020); na Ásia: China (GE et al., 2011), Índia e Irã (LARI et al., 2014).

Figura 1. Distribuição de carbapenemases de classe B na América Latina e no Caribe. Imipenemase (IMP), Verona metalo- β -lactamase (VIM), Nova Délhi metalo- β -lactamase (NDM) e São Paulo metalo- β -lactamase (SPM)



Fonte: ESCANDÓN-VARGAS et al. (2017)

Figura 2. Distribuição de carbapenemases de classe A na América Latina e no Caribe. Não metalo carbapenemase classe A (NMC-A), *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), Guiana β -lactamase de espectro estendido (GES) e *Klebsiella* carbapenemase brasileira (BKC).



Fonte: ESCANDÓN-VARGAS et al. (2017)

Em *P. aeruginosa* além dos mecanismos enzimáticos relacionados com o desenvolvimento de resistência aos carbapenêmicos pode-se destacar também a existência de mecanismos não enzimáticos, incluindo a perda de expressão de genes que codificam as porinas, mutações em genes de porina codificados cromossomicamente (como OprD), e a

superexpressão de genes que codificam bombas de efluxo (MexAB-OprM, MexXY-OprM ou MexCD-OprJ) (NORDMANN & POIREL 2019).

2.3 ABORDAGENS ÔMICAS PARA EXPLORAR O ESTILO DE VIDA DA *P.*

AERUGINOSA

Estudos genômicos, proteômicos e metabolômicos têm possibilitado a compreensão do comportamento de *P. aeruginosa* nos diversos tipos de infecções, bem como este microrganismo responde aos tratamentos antimicrobianos através da ativação de mecanismos de virulência e resistência que possibilitam a sua sobrevivência nos diversos tipos de ambientes (BOTELHO, GROSSO & PEIXE 2019).

2.3.1 Sequenciamento Genômico

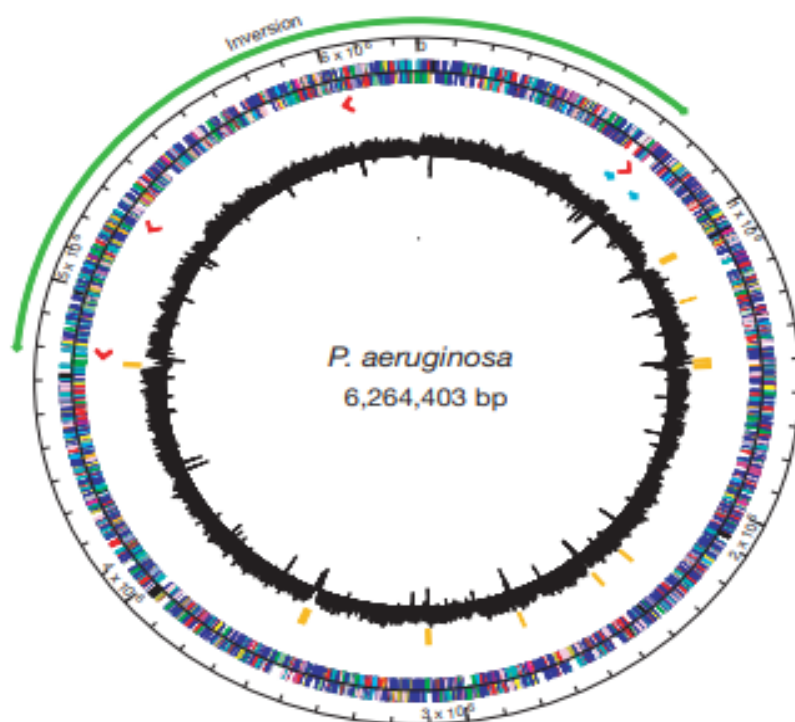
O sequenciamento do genoma completo é uma das abordagens mais recentes para estudar mecanismos de resistência em microrganismos. Fornecendo numerosas informações sobre os genes presentes em um patógeno, uma vez que esta técnica é capaz de processar várias sequências de DNA em paralelo apresentando alto rendimento, com custo e tempo reduzidos. É um protocolo poderoso, que revolucionou o estudo dos genomas microbianos (MADAHA et al., 2020)

A cepa de *P. aeruginosa* PAO1 foi a primeira cepa deste microrganismo que teve seu genoma sequenciado (STOVER et al., 2000). Esta cepa foi isolada de ferida crônica da década de 1950 e agora tornou-se uma cepa de referência, usada em diferentes tipos de estudos. O genoma de PAO1 tem 6,3 Mbp de tamanho (5570 sequências abertas de leitura), se tornando no ano 2000 um dos maiores genomas bacterianos sequenciados (figura 3) (STOVER et al., 2000).

Aproximadamente esta cepa apresentou 9,4% do seu genoma constituído por genes regulatórios previstos estando diretamente ligado ao tamanho do genoma, uma tendência frequentemente encontrada em espécies bacterianas com elevada capacidade de adaptação aos diferentes ambientes (MATHEE et al., 2008; Stover et al., 2000). Além disso, cerca de 150 genes identificados nesta cepa estão relacionados com a codificação de proteínas da membrana externa envolvidas na adesão, motilidade, resistência aos antibióticos e com os fatores de virulência, um descomunal número em comparação com outros genomas (CHEVALIER et al., 2017). O número de genes e o tamanho do genoma das diferentes cepas

de *P. aeruginosa* é variável, estando relacionado com a aquisição de novos genes. Sendo, portanto, dividido em um genoma central, que compreende genes que são identificados em quase todas as cepas de *P. aeruginosa* e um genoma acessório, abrangendo genes específicos de cepas geralmente inseridos em bloco e agrupados em certos loci que podem codificar propriedades de adaptação de nicho (CHANDLER et al., 2018; FRESCHI et al., 2018).

Figura 3. Representação circular do genoma de *P. aeruginosa* PAO1



Fonte: STOVER et al. (2000)

2.3.2 Maldi Tof MS

O diagnóstico de microrganismo hoje tem cada vez mais exigido rapidez e qualidade, por esta razão novos métodos diagnósticos que não dependam do crescimento dos microrganismos e que inclusive sejam capazes de identificar quando os microrganismos não estão viáveis, têm sido desenvolvidos. Métodos empregando análises de ácidos nucleicos têm sido utilizados na prática clínica, porém, apesar de serem mais rápidos do que as culturas demandam maior tempo de trabalho e profissional com elevado treinamento. Um grande progresso é o uso de estudos proteômicos para diagnóstico rápido - tão rápido como 5 a 15 minutos - na etiologia de infecções, e é aí que vem a espectrometria de massa com fonte de

ionização e dessorção a laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS) (*Matrix Associated Laser Desorption-Ionization – Time of Flight*) (PASTERNAK 2012).

Esta metodologia que emprega espectrometria de massas consiste num sistema no qual material biológico é aplicado em uma placa em que há a matriz polimérica. O material é irradiado por um laser que vaporiza a amostra e há ionização de várias moléculas, que são aspiradas num tubo de vácuo e levadas a um detector: conforme a molécula, o tempo de chegada ao detector é diferente. Isso é colocado em gráfico, dando vários picos e, para cada espécie bacteriana ou fúngica, obtém-se um gráfico específico. Uma base de dados computadorizada interpreta e fornece o resultado rapidamente (BENAGLI et al., 2011).

Além de ser utilizado para identificar microrganismos, o MALDI-TOF tem um alto potencial para conduzir uma investigação rápida da resistência aos antimicrobianos. Essa ferramenta gera espectros, nos quais proteínas ribossomais aparecem com massa molecular variando de 2 a 20 kDa, o que pode ser uma vantagem, pois podem ser utilizadas como biomarcadores. A identificação de microrganismos, bem como a análise de resistência antimicrobiana pela técnica de MALDI-TOF MS, ocorre por meio da comparação dos espectros adquiridos com espectros de referência incluídos no banco de dados de microrganismos de coleções de culturas de todo o mundo (figura 4) (ROBERTO et al., 2020).

Figura 4. Esquema de identificação de microrganismos pela técnica de MALDI-TOF MS.



Fonte: ALMEIDA JÚNIOR et al. (2014)

2.4 PAN-GENOMA

Os avanços nas análises envolvendo genomas bacterianos despertou o interesse em estudos de comparação dos pan-genomas (VERNIKOS et al. 2015). O pan-genoma

representa o pool genético completo de uma espécie bacteriana. Assim, a descrição de um pan-genoma depende da quantidade de dados de sequências disponíveis nas bases de dados genômicos. (KLOCKGETHER et al., 2011) Vários pan-genomas estão sendo descritos, permitindo a caracterização da estrutura populacional (LEFEBURE & STANHOPE 2007), biogeografia (BOSI 2016; VINCENT & CHARETTE 2017), análises das trajetórias evolutivas (LEFEBURE & STANHOPE 2007) e patogenicidade (Jacobsen et al. 2011; Bosi 2016) de diferentes espécies bacterianas de interesse ecológico ou médico.

Para espécies que apresentam elevada diversidade na composição de seu genoma acessório como é o caso de *P. aeruginosa*, a adição de cada nova sequência ao genoma aumentará o conjunto geral de genes. O tamanho do genoma central que estará presente em todas as cepas diminuirá simultaneamente. Para definir o genoma central e o pan-genoma, os genomas são selecionados sequencialmente para ortólogos, procurando o melhor recíproco através do BLAST. Para realizar a análise do pan-genoma de *P. aeruginosa* pode ser utilizada a ferramenta “Pesquisa Comparativa do Genoma” fornecida por *Pseudomonas Genome Database2*. (KLOCKGETHER et al., 2011)

As principais características descritas no pan-genoma de *P. aeruginosa* são: quantidade de genomas descritos em bases de dados, total de genes, tamanho médio do genoma, tamanho do pan-genoma (genes não redundantes), tamanho do genoma central, tamanho do genoma acessório, número de genes únicos, média do número de genes únicos e o número de famílias de genes sob seleção positiva. (MOSQUERA-RENDÓN et al., 2016)

2.5 FATORES DE VIRULÊNCIA

P. aeruginosa é considerada a espécie mais virulenta dentre os bacilos Gram-negativos não fermentadores (BGNMF), como resultado da produção de uma grande variedade de fatores de virulência celulares e extracelulares que favorecem a sua patogênese. As exoenzimas protease alcalina, elastase, gelatinase, exotoxina A, exoenzima S e hemolisina são produzidos durante o curso da infecção clínica e contribuem para o desenvolvimento de infecções em modelos animais (STEHLING; SILVEIRA; LEITE, 2008; TODAR, 2009).

Estas enzimas proteolíticas produzidas por este patógeno exercem papel de destaque na virulência durante a colonização contribuindo para o rompimento das barreiras físicas do hospedeiro favorecendo assim a proliferação bacteriana, devido ao fornecimento de aminoácidos e proteínas teciduais a estas bactérias. Em estágio mais avançado podem

interferir com a resposta imune por degradar as imunoglobulinas (STEHLING, SILVEIRA, LEITE, 2008; TODAR, 2009).

Outros fatores de virulência incluem a produção de alginato, um exopolissacarídeo viscoso, que protege a célula bacteriana da ação fagocitária da resposta imunológica do hospedeiro. A produção de biofilme dificulta o reconhecimento desse microrganismo pelo sistema imunológico e provoca a diminuição da eficácia dos antimicrobianos. A leucocidina inibe a ação dos neutrófilos e linfócitos. A produção de pigmentos, como a piocianina, inibe o crescimento de outras bactérias e a atividade ciliar da mucosa respiratória (STEHLING, SILVEIRA, LEITE, 2008; TODAR, 2009).

O alginato é um exopolissacarídeo mucoso constituído por repetições de polímeros de ácido manurônico e ácido glicurônico. Encontra-se na matriz dos biofilmes e contribui para a lesão tecidual do hospedeiro, além de atenuar a resposta imunológica (KANJ, SEXTON, 2012). Estirpes produtoras de alginato são frequentes em doentes com fibrose cística e a produção excessiva de alginato protege ainda a bactéria da ação antibiótica (KIPNIS; SAWA; WIENER-KRONISH, 2006). Cerca de 85% dos isolados de *P. aeruginosa* obtidos a partir destes doentes apresentam uma morfologia mucoide, devido à produção excessiva de alginato, enquanto apenas menos de 1% dos isolados obtidos de outros locais apresentam este fenótipo, denotando a sua importância particular para a colonização e sobrevivência no ambiente pulmonar (STAPPER et al., 2004). Estes autores demonstraram ainda que o alginato é importante para a arquitetura e desenvolvimento dos biofilmes, mas não para a sua formação inicial.

A aderência de *P. aeruginosa* ao epitélio respiratório e/ou à mucosa respiratória parece ser a principal responsável pelo papel no processo inicial de colonização. O epitélio prejudicado por infecção viral ou colonização prévia por outra bactéria, predispõe à fixação da bactéria ao tecido. Acredita-se que *P. aeruginosa* adere ao epitélio primário por meio de pili, mas a exoenzima S e o alginato também possuem propriedades aderentes (BARTH; PITT, 1998).

P. aeruginosa na sua forma mucoide resultante de uma superprodução do alginato é a forma mais virulenta (DEVRIES; OHMAN, 1994), podendo ser encontrada em pacientes com infecções graves muitas vezes no mesmo paciente onde existe na sua forma não mucoide. Estudos revelam que a distinção destas formas da bactéria é importante para o modo do tratamento. Muitas vezes a forma mucoide e não mucoide podem ser originadas da mesma

cepa, porém podem apresentar perfis bioquímicos e de susceptibilidade aos antimicrobianos muito diferentes (MILLER; GILLIGAN, 2003; LIMA et al., 2018; LIMA et al., 2020).

2.6 BIOFILME

A formação de biofilmes, causa consideráveis problemas na área biomédica e industrial, por estas estruturas provocarem uma maior resistência ao tratamento com antibióticos e biocidas (figura 5), além de reduzirem a ação da resposta imunológica do hospedeiro. Devido a sua complexidade e ao impacto do seu desenvolvimento, os biofilmes microbianos têm sido alvo de vários estudos para tentar elucidar como estas estruturas são formadas e conseguem interagir dentro dessa comunidade para tentar amenizar as consequências da sua formação (TRENTIN, GIORDANI, MACEDO, 2013; PANG et al. 2019).

O conhecimento sobre os estímulos ambientais, elementos genéticos e os mecanismos moleculares que estão envolvidos na formação do biofilme são necessários para um desenho racional de estratégias para eliminar os biofilmes ou para prevenir a formação dos mesmos (HARMSEN et al., 2010).

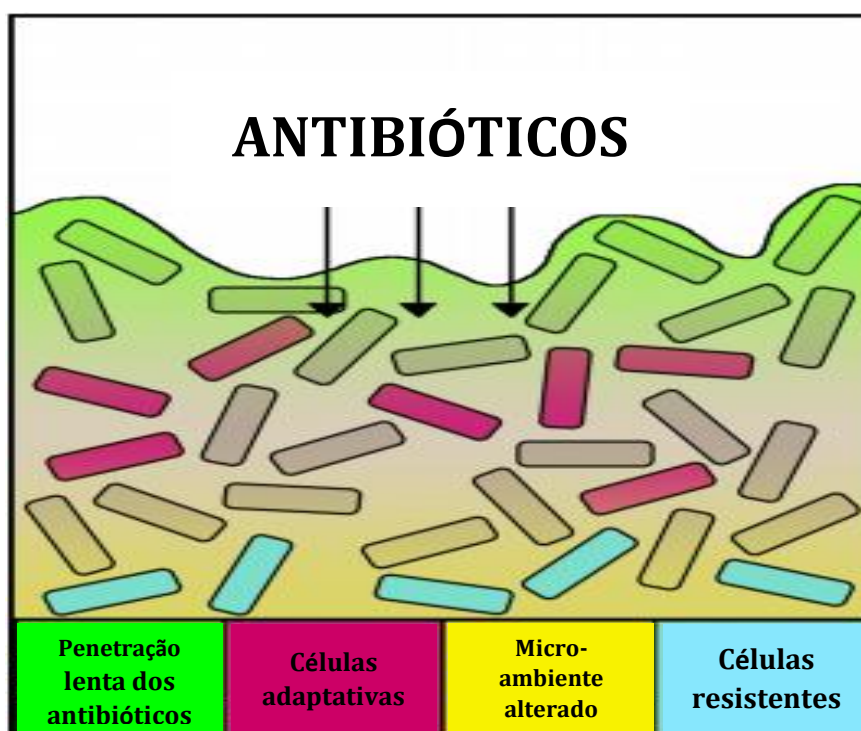
Os biofilmes podem ser estruturas formadas por uma única espécie microbiana (como é o caso de alguns biofilmes associados a infecções e biofilmes que crescem em implantes médicos) ou, mais frequentemente, por várias espécies formando consórcio de fungos, algas e bactérias (WIMPENNY; MANZ; SZEWZYK, 2000). O desenvolvimento e a persistência dos biofilmes são afetados por muitos fatores, entre eles, podem-se citar aqueles associados ao microrganismo como: hidrofobicidade da parede celular, presença de pili, fimbrias e flagelos, produção de exopolissacarídeo (EPS) e de moléculas sinalizadoras (figura 5) (OLIVEIRA, 2014), espécie e cepa, sistema Quorum Sensing (TRENTIN, GIORDANI, MACEDO, 2013), fatores genéticos, virulência e resistência do microrganismo (KASNOWSKI et al., 2010). Fatores ligados à superfície de adesão, como textura, hidrofobicidade, características químicas da superfície, carga elétrica e filme condicionante. E fatores ligados ao microambiente: velocidade de fluxo, pH, temperatura, presença de cátions e de antimicrobianos, além da disponibilidade de oxigênio, nutrientes e metabólicos provenientes do microrganismo (MEDEIROS, 2011).

A figura 6 demonstra um esquema da formação e desenvolvimento do biofilme de *P. aeruginosa*. As fases de formação e desenvolvimento do biofilme são: 1) **fase inicial** –

respondendo a sinais ambientais, as células planctônicas aderem a uma superfície sólida por meio de adesinas, flagelos e pili; 2) **fase de desenvolvimento** – as células sofrem alterações nos seus fenótipos, reprimindo a expressão dos flagelos e pili e iniciam a formação da matriz exopolissacarídica do biofilme, passando a ficar “irreversivelmente” aderentes à superfície; 3) as células sésseis agrupam-se mais e multiplicam-se levando a um maior amadurecimento do biofilme e ao início da sua “arquitetura”; 4) **fase madura** – amadurecimento total da arquitetura do biofilme, que apresenta, em alguns locais, um formato tipo cogumelo, característica dos biofilmes de *P. aeruginosa*; 5) **fase de disseminação** – no interior do biofilme, algumas células readquirem estruturas de mobilidade (flagelos) e o biofilme rompe, lançando essas células para o meio ambiente (STOODLEY et al., 2002).

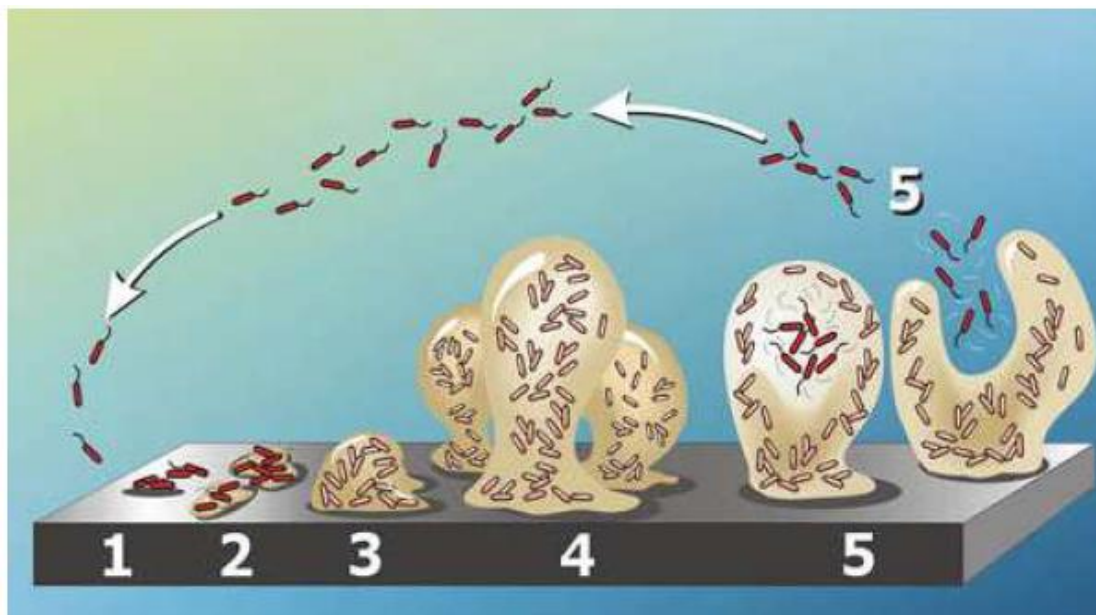
A comunicação celular nos biofilmes ocorre pela elaboração e reconhecimento de pequenas moléculas, sendo este mecanismo denominado de *quorum sensing* (QS) (SAKURAGI; KOLTER, 2007, LIMA et al., 2018). Os sistemas QS estão envolvidos na regulação de uma variedade de processos fisiológicos incluindo biossíntese de antibióticos, motilidade, transferência de plasmídeos, produção de biofilme entre outros (JUHAS; EBERL; TÜMMLER, 2005). Em *P. aeruginosa* três sistemas de QS interconectados, os sistemas Las, Rhl e Pqs, foram descritos e estes estão envolvidos na produção e regulação da matriz do biofilme desta espécie bacteriana (SAKURAGI; KOLTER, 2007).

Figura 5. Mecanismo de resistência a antibióticos mediado por biofilme.



Fonte: Adaptado de PANG et al. (2019)

Figura 6. Esquema representativo do desenvolvimento de um biofilme de *P. aeruginosa*.



Fonte: Adaptado de STOODLEY et al. (2002).

2.7 QUORUM SENSING

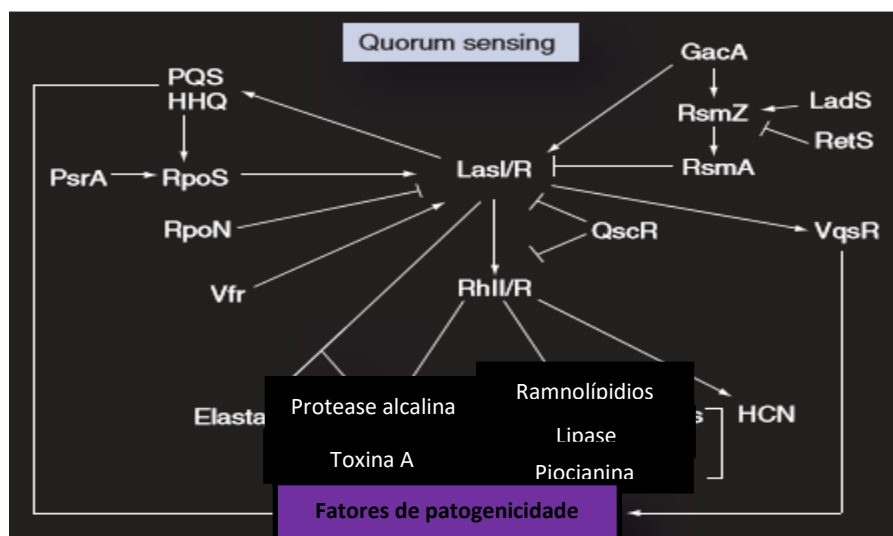
O *quorum sensing* (QS) de *P. aeruginosa* é um mecanismo de reconhecimento celular e de regulação da expressão de várias centenas de genes das células bacterianas quando estas se encontram agrupadas, mediado, sobretudo por três sistemas interconectados, os sistemas Las, Rhl e Pqs (HARMSEN et al., 2010). É importante na formação e manutenção de biofilmes por permitir, em tempo real, reconhecer a densidade populacional e as condições ambientais em que as células se encontram e promover as necessárias alterações para garantir a sua sobrevivência, através da produção de pequenas moléculas, as acil-homoserinas-lactonas (AHL) (GIRARD; BLOEMBERG, 2008; LIMA et al., 2018; RODRIGUES et al., 2020).

N-acil-homoserina-lactonas (AHLs) são moléculas sinalizadoras que são secretadas por muitas bactérias Gram negativas, sendo utilizadas para detectar a densidade populacional bacteriana, para facilitar o controle da expressão gênica. O *quorum sensing* é um dos mais importantes sistemas de regulação para a expressão de fatores de virulência que favorecem a patogenicidade bacteriana (GIRARD, BLOEMBERG, 2008). Estas atuam em 3 etapas: produção de AHLs, acumulação de AHLs em função da densidade populacional e a resposta por parte das células bacterianas quando uma determinada concentração de AHLs é atingida (CHUN et al., 2004).

Alguns estudos parecem evidenciar que as AHLs podem participar de forma direta na patogênese, promovendo, em alguns casos, a apoptose em macrófagos e neutrófilos (ZHU et al., 2004). Por outro lado, estas moléculas são também alvos para a resposta imunológica inata e adquirida do hospedeiro, tendo-se demonstrado que células epiteliais pulmonares, devido a ação dos macrófagos alveolares, conseguem inativar uma das AHLs (N-(3-oxododecanoil)-l-homoserina lactona (3OC12-HSL) e N-butanoil-l-homoserina lactona (C4-HSL)), que participam do QS de *P. aeruginosa* (CHUN et al., 2004).

Muitos dos genes regulados por QS expressam fatores de virulência (STRATEVA; MITOV, 2011), pelo que a sua importância para a patogenicidade é enorme. Resumidamente, o sistema Las regula, entre outros, a expressão dos genes *lasI*, *lasR*, *lasA*, *lasB*, *apr* e *toxA*, o sistema Rhl controla a expressão de *rhlI*, *rhlR*, *rhlA* e *rhlB*, associados à produção de ramnolípídios, e o sistema Pqs regula diversos genes com impacto no “fitness” celular e outros associados a elastases, ramnolípídios e piocianina (STRATEVA; MITOV, 2011). Alguns estudos parecem evidenciar que as AHLs podem participar de uma forma direta na patogênese, promovendo, em alguns casos, a apoptose em macrófagos e neutrófilos (TATEDA et al., 2003). Por outro lado, estas moléculas são também alvos para o sistema imunitário, inato e adquirido do hospedeiro, tendo demonstrado que células epiteliais pulmonares conseguem inativar a N-(3-oxododecanoil)-l-homoserina lactona que participa no QS de *P. aeruginosa* (CHUN et al., 2004). A figura 7 representa o papel central do *quorum sensing* na regulação da produção de fatores de patogenicidade em *P. aeruginosa*.

Figura 7. Modelo esquemático do papel central do quorum sensing na regulação da produção de fatores de patogenicidade em *P. aeruginosa*.



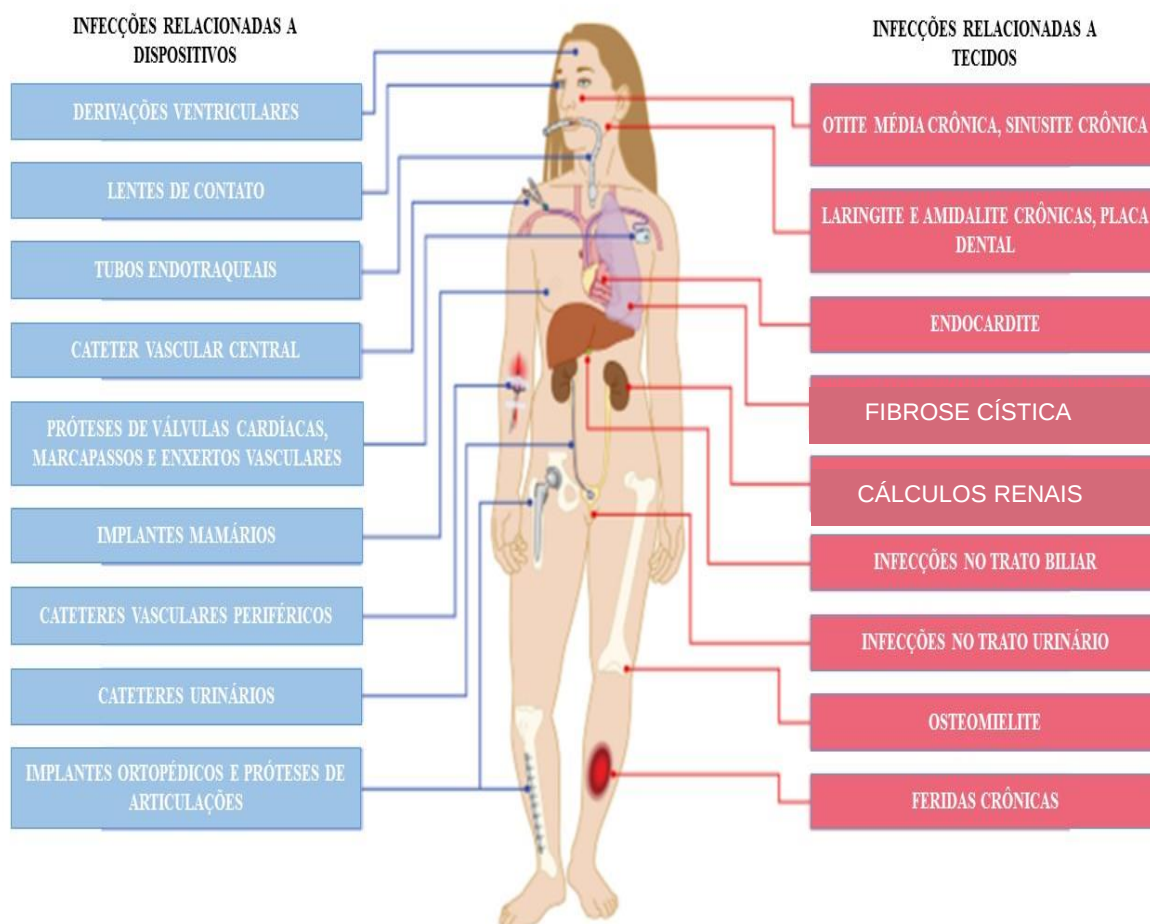
Fonte: Adaptado de GIRARD e BLOEMBERG (2008)

2.8 INFECÇÕES ASSOCIADAS AO BIOFILME

Infecções, causadas por agentes etiológicos amplamente resistentes aos antimicrobianos, representam um dos grandes desafios atuais da saúde pública, acarretando altas taxas de morbi-mortalidade, aumento no tempo de internação e nos gastos do sistema de saúde (NEIDELL et al., 2012). O crescente uso de biomateriais implantáveis vem elevando a expectativa de vida humana, através do reestabelecimento de inúmeras funções vitais, mas concomitantemente, exacerba esse problema, sendo que as infecções associadas a biomateriais passaram a ser reconhecidas como um dos maiores problemas clínicos (BUSSCHER et al., 2012). De acordo com o órgão norte-americano “National Institute of Health”, aproximadamente 80% de todas as infecções no mundo estão associadas a biofilmes, especialmente, envolvendo biomateriais (figura 8).

O desenvolvimento dos biofilmes ocorre em diversos dispositivos biomédicos, destacando-se os cateteres venosos centrais, válvulas cardíacas, dispositivos de assistência ventricular, endoproteases coronarianas, implantes de estimulação neurológica, próteses articulares e os dispositivos para fixação de fraturas (CRESPO, 2014).

Figura 8. Infecções relacionadas ao biofilme.



Fonte: Adaptado de LEBEAUX, GHIGO e BELOIN (2014)

2.9 ESTRATÉGIAS DE COMBATE A FORMAÇÃO DE BIOFILME

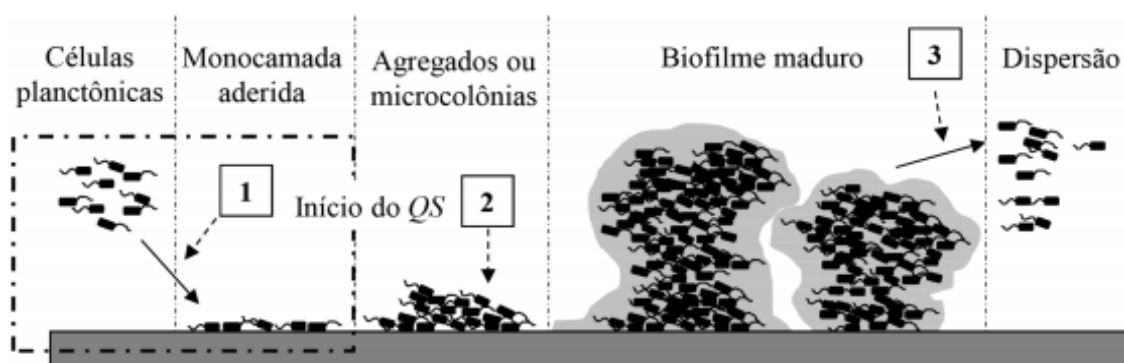
O entendimento sobre as diferentes vias empregadas para o tratamento e controle de biofilmes tem resultado da valorização crescente do impacto que eles causam na medicina moderna. As estratégias para o combate de biofilmes podem, basicamente, ser divididas em dois segmentos: a inibição da formação de biofilmes e a erradicação ou tratamento de biofilmes já formados (TRENTIN, GIORDANI, MACEDO, 2013; SHAO et al., 2020), cujos principais alvos para intervenção são ilustrados na (figura 9).

Considerando o modo como pode ser alcançada a inibição da formação de biofilmes, duas grandes classificações podem ser feitas: 1- através da inibição do crescimento bacteriano, pelo uso de compostos bactericidas ou bacteriostáticos ou, 2 - através do bloqueio da adesão bacteriana e, conseqüentemente, da formação de biofilme por uma via que não

envolve a morte bacteriana - característica marcante de um novo conceito de terapia: as terapias antivirulência (TRENTIN, GIORDANI, MACEDO, 2013).

As terapias antivirulência exploram novos mecanismos de ação de compostos, visando dificultar o rápido desenvolvimento de resistência bacteriana. Por não afetar o crescimento de bactérias e por manter as células em estado planctônico, a inibição de fatores de virulência (como a formação de biofilmes) deve tornar o patógeno mais suscetível ao sistema imunológico e aos antimicrobianos tradicionalmente utilizados (CLATWORTHY; PIERSON; HUNG, 2007; RASKO; SPERANDIO, 2010). Assim, essas novas terapêuticas podem ser consideradas alternativas e/ou complementares à antibioticoterapia tradicional, com base em novos mecanismos de ação em diferentes alvos (TRENTIN, GIORDANI, MACEDO, 2013).

Figura 9. Principais alvos para combate aos biofilmes microbianos: a inibição da formação de biofilmes via bloqueio da adesão bacteriana à superfície (etapa 1) ou o rompimento da comunicação celular bacteriana - *Quorum sensing* (etapa 2) e erradicação ou tratamento de biofilmes já formados (etapa 3).

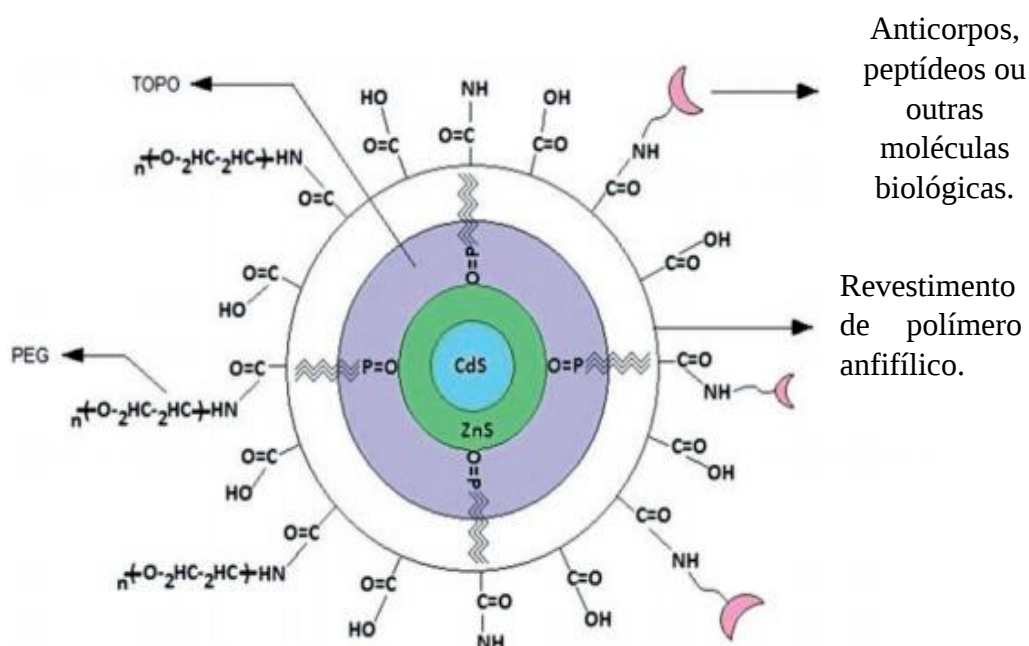


Fonte: MACEDO e ABRAHAM (2009)

2.10 QUANTUM DOTS

Os pontos quânticos (Quantum dots) são nanopartículas, que apresentam propriedades químicas e físicas (em primeiro lugar ópticas), que têm apresentado como uma estratégia promissora em biologia e na terapêutica. A síntese destes QDs pode ser realizada de diferentes formas, tanto apresentando forma de nano ilhas, que se formam nas superfícies, que podem ser usadas como emissores eletrônicos de fóton único em para armazenar informações ou na forma de QDs coloidais para fins diagnósticos e terapêuticos em sistemas vivos (figura 10) (PLESKOVA; MIKHEEVA & GORNOSTAEVA, 2018).

Figura 10. Representação esquemática de um ponto quântico: um núcleo no centro (azul), sobre ele uma casca (verde), por cima, um ponto quântico é funcionalizado por várias moléculas.



Fonte: Adaptado de PLESKOVA, MIKHEEVA & GORNOSTAEVA (2018).

Os QDs são nanocristais semicondutores fluorescentes que possuem propriedades únicas, como alta resistência à fotodegradação e superfície ativa para conjugação com moléculas, como proteínas e drogas. Consequentemente, a conjugação de QDs a drogas pode ser usada para avaliar o efeito dessas drogas em células bacterianas usando uma nanossonda (KUMAR et al., 2014).

Tem se tornado promissor os estudos que empregam QDs como sondas para avaliar o efeito da ação de diferentes antimicrobianos e peptídeos com ação antimicrobiana sobre diferentes micro-organismos, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *P. aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* (LUO et al., 2011; GALDIERO et al., 2016; SILVA JÚNIOR et al., 2020).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Detectar a ocorrência de genes de β -lactamases em isolados clínicos de *P. aeruginosa* MDR e XDR, analisar a capacidade de produção de biofilme e a presença de genes relacionados à formação do biofilme nestes isolado, além de avalia a resposta de isolados de CRPA frente a monoterapia e terapia combinada.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar a ocorrência de genes de β -lactamases (*bla_{SPM-1}*, *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}* e *bla_{KPC}*) em isolados clínicos de *P. aeruginosa* MDR e XDR;
- Analisar a capacidade de produção de biofilme e a presença de genes relacionados à formação do biofilme e QS em isolados clínicos de *P. aeruginosa* MDR e XDR;
- Avaliar a resposta de isolados de CRPA contra monoterapia com meropenem (MPM) ou polimixina B (POL B) e sua associação com azitromicina (AZT);
- Analisar o genoma de isolados produtores de genes de β -lactamases.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 IDENTIFICAÇÃO E TESTE DE SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA (TSA)

Os isolados analisados neste estudo foram identificadas e tiveram testes de sensibilidade antimicrobiana (TSA) avaliados pelo sistema automatizado BD Phoenix TM, e a tobramicina foi realizada por meio de microdiluição em caldo TSB (Tryptona Soja) (CLSI, 2016). Seis cepas de *P. aeruginosa* CRPA foram incluídas no estudo. Os isolados foram armazenados a -20 °C no Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular da Universidade Federal de Pernambuco. Os isolados congelados foram reativados em caldo BHI (infusão de coração e cérebro) e incubados por 24 h a 37 °C, sendo então semeados com ágar cetrimida para avaliação da pureza da cultura e incubados por 24 h a 37 °C. Esses microrganismos foram provenientes de amostras de secreção traqueal, sangue e urina.

4.2 ENSAIO DA PRODUÇÃO DE BIOFILME

Os seis isolados foram avaliados fenotipicamente para produção de biofilme utilizando a técnica descrita por Stepanovic et al., 2000, com modificações. Resumidamente, 50 g. L⁻¹ de sacarose foram adicionados ao caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) (Lima et al., 2018). A categorização da produção do biofilme foi realizada de acordo com a biomassa aderida ao fundo da placa de acordo com os valores das densidades ópticas lidas a 570 nm.

O caldo BHI foi utilizado como controle negativo (CN) e a cepa *P. aeruginosa* PA01 foi utilizada como controle positivo (CP), uma vez que esta cepa é recomendada como controle positivo para ensaios de biofilme. Os isolados de *P. aeruginosa* foram cultivados em caldo BHI por 24 horas a 37 °C. Em seguida, 200 µL das suspensões bacterianas foram aplicadas em placas de poliestireno contendo 96 poços de fundo plano para microtitulação, em triplicata. As placas foram então incubadas a 37 °C durante 24 horas (Lima et al., 2018).

Após esse período, as suspensões bacterianas foram removidas e cada poço foi lavado por três vezes com 250 µL de solução fisiológica (0,9% NaCl) estéril. Posteriormente, foi realizada a fixação com 200 µL de metanol P.A. por 15 minutos. O metanol foi removido, as placas foram deixadas em temperatura ambiente a 28°C ± 2°C para secar e foram coradas com 200 µL de solução de cristal violeta durante cinco minutos. A seguir, as placas foram lavadas com água corrente e secas em temperatura ambiente a 28°C ± 2°C. Após este processo, foi

realizada a leitura da absorbância em leitor de ELISA (BioRad, modelo 550), em comprimento de onda de 570 nm e as amostras foram classificadas segundo Stepanović e colaboradores (2000). O valor das densidades óticas para cada isolado (DO_i) foi obtido pela média dos três poços, sendo este valor comparado com a densidade ótica do controle negativo (DO_c). Os isolados foram classificados em quatro categorias de acordo com a média das DO s (densidades óticas) relacionada com os resultados obtidos para a DO_c . As categorias foram baseadas nos seguintes critérios: não aderente: $DO_i \leq DO_c$; fracamente aderente (+): $DO_c < DO_i \leq 2 \times DO_c$; moderadamente aderente (++): $2 \times DO_c < DO_i \leq 4 \times DO_c$ ou fortemente aderente (+++): $4 \times DO_c < DO_i$.

4.3 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA

Foi realizada a extração do DNA total dos seis isolados de CRPA. A extração foi feita utilizando o kit de extração de DNA Brazol (LGC Biotecnologia) de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante, e a dosagem do DNA foi realizada por espectrofotometria (Ultraspec 3000; Pharmacia Biotech) no comprimento de onda 260–280 nm.

4.4 DETECÇÃO DOS GENES DE MBL (*bla_{SPM-1}*, *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*) e o *bla_{KPC}*

Visando elucidar o mecanismo de resistência aos β -lactâmicos nas cepas pesquisadas, foi realizada a pesquisa dos genes das M β LS e o *bla_{KPC}* utilizando primers específicos, tabela 1 (YIGIT et al., 2001; GALES et al., 2003; DONG et al., 2008). Para cada reação de PCR, foi adicionado um controle negativo, consistindo de componentes da reação sem adição de DNA, e cepas de controle positivo para os genes: *bla_{SPM-1}* (*P. aeruginosa* 48-1997A), *bla_{IMP}* (*P. aeruginosa* PSA319) e *bla_{VIM}* (*P. aeruginosa* VIM-1) fornecidas pelo Laboratório Alerta da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) e o *bla_{KPC}* (*P. aeruginosa* P22A) oriunda da coleção de cultura do Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular, Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

4.5 DETECÇÃO DOS GENES DO QS

As PCRs foram realizadas para detectar a presença dos seguintes genes do QS: *lasI*, *lasR*, *rhII* e *rhIR* utilizando primers específicos, tabela 1 (ZHU et al., 2004; TINGPEJ et al., 2007). Os parâmetros para a amplificação foram 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min,

anelamento dos primers a 52 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 1,5 min. Os produtos de PCR foram corados com *blue-green* e submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%, sendo visualizados sob luz UV e foto documentados para análise das bandas.

Gene	Primer	Sequência (5' – 3')	TA(°C)	NC	Referências
<i>bla_{KPC}</i>	KPC-1a	TGTCACTGTATCGCCGTC	63.0	35	Yigit et al. (2001)
	KPC-1b	CTCAGTGCTCTACAGAAAACC			
<i>bla_{SPM-1}</i>	SPM-1F	CCTACAATCTAACGGCGACC	55.3	30	Gales et al. (2003)
	SPM-1 R	TCGCCGTGTCCAGGTATAAC			
<i>bla_{IMP}</i>	IMP-F	GGAATAGAGTGGCTTAATTCTC	50.6	30	Dong et al. (2008)
	IMP-R	GTGATGCGTCYCCAAYTTCACT			
<i>bla_{VIM}</i>	VIM-F	CAGATTGCCGATGGTGTGTTGG	56.8	30	Dong et al. (2008)
	VIM-R	AGGTGGGCCATTCAGCCAGA			
<i>lasR</i>	lasR-F	AAGTGGAATAATTGGAGTGGAG	52	30	Zhu et al. (2004); Tingpej et al. (2007)
	lasR-R	GTAGTTGCCGACGACGATGAAG			
<i>lasI</i>	lasI-F	CGTGCTCAAGTGTTC AAGG	52	30	Zhu et al. (2004); Tingpej et al. (2007)
	lasI-R	TACAGTCGGAATAAGCCCAG			
<i>rhlR</i>	rhlR-F	TGCATTTTATCGATCAGGGC	52	30	Zhu et al. (2004); Tingpej et al. (2007)
	rhlR-R	CACTTCCTTTTCCAGGACG			
<i>rhlI</i>	rhlI-F	TTCATCCTCCTTTAGTCTTCCC	52	30	Zhu et al. (2004); Tingpej et al. (2007)
	rhlI-R	TTCCAGCGATTCAGAGAGC			

Tabela 1. Primers usados na detecção dos genes das β -lactamases e do QS.
TA: Temperatura de anelamento; NC: Número de ciclos.

Fonte: A autoria (2021)

4.6 ERIC-PCR

As reações de ERIC-PCR foram preparadas em um volume total de 25 μ l por tubo, compreendendo: 100 ng de DNA genômico, 10 pmol dos iniciadores (ERIC-1 [5'- ATG TAAGCTCCTGGGGATTAC-3']; ERIC-2 [5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3']),

Tampão 1x, 200 μ M do desoxirribonucleotídeo trifosfato, 1,5 mM de $MgCl_2$ e 1,0 U da enzima *Taq* DNA polimerase. Os parâmetros de amplificação utilizados na ERIC-PCR foram: desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 92°C por 1 minuto, anelamento a 36 °C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 8 minutos. Após os 30 ciclos, foi realizada uma etapa de alongamento final de 16 minutos à 72°C. Os produtos de PCR foram corados com *blue-green* e submetidos à eletroforese a 1,5% em gel de agarose, visualizados sob luz UV e fotodocumentados para posterior análise de perfis clonais (DUAN et al., 2009).

4.7 SÍNTESE DE CDTE QDS E CONJUGAÇÃO DE QDS AO MEROPENEM

A síntese de QDs e a conjugação de QDs ao meropenem foram realizadas seguindo os protocolos previamente descritos por Cabral Filho et al., 2016, e Silva Júnior et al., 2020. Em seguida, foi selecionado aleatoriamente um isolado de CRPA *P. aeruginosa* (JX05) carreando o gene *bla_{KPC}* e produtor de biofilme para ser incubado com o conjugado QDs-MPM para avaliar, por microscopia de fluorescência, o efeito da associação com o AZT nas células bacterianas.

4.8 INÓCULO BACTERIANO E MARCAÇÃO COM O CONJUGADO QDS-MPM

Para confirmar a pureza do inóculo, o isolado clínico de *P. aeruginosa* JX05 foi cultivado em ágar Cetrimide, e colônias únicas foram inoculadas em 2 mL de caldo Luria Bertani (LB) e incubadas a 37 °C por 24 h. Para as experiências de marcação, o inóculo foi ajustado para escala 0,5 de McFarland. Antes dos experimentos de marcação bacteriana, os grupos carboxila ativados restantes dos conjugados QDs (500 μ L) foram bloqueados com 25 μ L de base Tris (15 mg.mL⁻¹), de acordo com (Cabral Filho et al., 2016; Silva Júnior et al. , 2020).

4.9 EFEITOS DOS CONJUGADOS DE QDS NO CRESCIMENTO BACTERIANO

Para avaliar a eficácia da marcação bacteriana por conjugados QDs-MPM, o inóculo (50 μ L) e a suspensão de conjugados QDs-MPM (50 μ L) foram adicionados em um microtubo de 0,5 mL. O microtubo foi mantido em agitação constante por 1 h a 25 °C, e após esse período, foram realizadas duas lavagens sucessivas por centrifugação do microtubo a $1.400 \times g$ por 5 min. Em seguida, o pellet foi ressuspenso em NaCl 0,9% (p / v - doravante

denominado como solução salina) e observado usando um microscópio de fluorescência invertido (DMI4000B) (Leica Microsystems, Alemanha) em 63 × objetiva com abertura numérica de 1,25. A fluorescência dos conjugados foi observada usando os filtros de excitação e passagem de banda de emissão (BP) 560/40 nm e 645/75 nm, respectivamente.

Um segundo procedimento foi realizado para aumentar a formação de agregados bacterianos na presença de excesso de MPM. O inóculo (50 µL) e a suspensão de conjugado QDs-MPM (50 µL) foram incubados juntos como no experimento anterior, mas um adicional de 50 µL de MPM (1 mg. mL⁻¹) foi adicionado ao microtubo (Silva Júnior et al., 2020). O microtubo foi mantido sob agitação constante por 1 h a 25 °C. Foram usados os mesmos procedimentos de lavagem e ressuspensão descritos acima. Como controle negativo, o inóculo bacteriano sem qualquer tratamento foi avaliado e usando apenas os QDs.

4.10 EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DOS CONJUGADOS QDS-MPM COM AZITROMICINA

Para avaliar os efeitos do rompimento do QS na agregação bacteriana, 50 µL de AZT (1 mg. mL⁻¹) foram adicionados ao inóculo previamente incubado por 1 h com o QDs-MPM e o excesso de MPM (segundo procedimento). Em seguida, o sistema foi incubado por mais 30 min a 25 °C. Após esse segundo período de incubação, foram seguidos os mesmos procedimentos de lavagens e ressuspensão, com solução salina, conforme descrito nos testes anteriores. Estas análises foram realizadas em triplicata.

4.11 ANÁLISE PROTEÔMICA POR MALDI-TOF MS

O efeito dos antibióticos na composição proteica do isolado clínico de *P. aeruginosa* JX05 foi determinado por MALDI-TOF MS. Para tanto, o inóculo foi preparado conforme descrito nos experimentos anteriores e, a seguir, tratado com MPM, POL B, AZT e sua associação, conforme tabela 2. Essas análises foram realizadas em triplicata.

Os inóculos foram tratados com MPM e / ou POL B e mantidos sob agitação constante por 1 h a 25 °C. Para os grupos que também receberam AZT, após esse primeiro período de incubação, esse antimicrobiano foi adicionado e as amostras foram incubadas por mais 30 min a 25 °C sob agitação constante. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 9.000 × g por 5 min, e o pellet foi lavado três vezes com 50 µL de água ultrapura. Um microlitro das amostras foi aplicado diretamente em duplicata em uma placa de aço polido (Bruker

Daltonics, MA, EUA). Em seguida, as amostras foram cobertas com solução de matriz de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) (75 mg. mL⁻¹ de matriz CHCA em etanol / água / acetonitrila [1: 1: 1] com ácido trifluoroacético 0,03%) e secas (CORDEIRO et al., 2017).

Os espectros de massa foram adquiridos usando um espectrômetro de massa MALDI-TOF MS Autoflex III (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) equipado com um laser Nd:YAG de 1.064 nm, no modo refletor positivo e frequência de laser de 100 Hz. Os espectros de MS foram adquiridos na faixa de 400-2000 m/z usando o software Flex Control (versão 3.3, Bruker). Os espectros foram processados no software Flex Analysis (versão 3.3, Bruker), conforme (BIEMANN et al., 1992). Além disso, os espectros obtidos nos diferentes tratamentos foram comparados entre eles por meio do software MMass versão 5.5, uma ferramenta Open Source Mass Spectrometry (STROHALM et al., 2010). Para comparar a lista de picos, os dados foram processados usando as seguintes ferramentas: coleta de pico, correção de linha de base e suavização, de acordo com (NIEDERMEYER & STROHALM, 2012).

Posteriormente, os íons parentais selecionados foram fragmentados usando o modo LIFT. As sequências foram comparadas com o banco de dados de proteínas do National Center for Biotechnology Information (NCBI, MD, EUA), BioPep (IWANIAK et al., 2016) e UniProt (BATEMAN, 2019).

Grupos	Tratamentos
1	50 µL do inóculo sem nenhum tratamento (controle negativo)
2	50 µL do inóculo + 50 µL de AZT
3	50 µL do inóculo + 50 µL de MPM
4	50 µL do inóculo + 50 µL de POL B
5	50 µL do inóculo + 50 µL de MPM e 50 µL de AZT
6	50 µL do inóculo + 50 µL de POL B e 50 µL de AZT
7	50 µL do inóculo + 50 µL de MPM, 50 µL de POL B e 50 µL de AZT

Tabela 2. Grupos experimentais usados para análises proteômicas. Os antibióticos foram dissolvidos a 1 mg. mL⁻¹.

Fonte: A autoria (2021)

4.12 SEQUENCIAMENTO GENÔMICO

O DNA genômico de dois isolados clínicos de CRPA portadores do gene *bla_{KPC}* selecionados aleatoriamente foram sequenciados usando a plataforma de sequenciamento Illumina MiSeq (Illumina Inc., EUA). O DNA foi extraído usando um kit Wizard1 Genomic DNA Purification (Promega, França) e a qualidade do DNA foi verificada por Qubit1. Uma biblioteca genômica foi construída por marcação de transposon do Nextera XT DNA Sample Prep Kit (Illumina Inc.) e foi sequenciada com o kit MiSeq Reagent v.2 de 500 ciclos, que produziu 1311304 e 1141794 leituras finais emparelhadas para a amostra JX03 e JX05, respectivamente. Os genomas completos dos dois isolados foram depositados no GenBank com os respectivos códigos de acesso: SUB6647998 (isolado JX03) e SUB6648309 (isolado JX05), BioProject ID: PRJNA593977.

4.13 MONTAGEM DO GENOMA

Para a montagem dos genomas, a qualidade das leituras brutas foi avaliada por Fastqc, que mostrou vestígios de adaptadores nextera, que foram removidos pelo programa cutadapt. Para filtrar as leituras, o Sickle foi usado com sinalizadores de corte: qualidade > 20 (valor phred) e comprimento 20 bp. Consequentemente, as leituras filtradas foram usadas para montagem no pipeline Unicycler e os resultados das montagens foram avaliados pela Quast, usando a cepa GCA_003204235.1 como referência.

4.14 ANÁLISE GENÔMICA

Os genomas foram montados usando o pipeline A5-miseq (COIL, JOSPIN & DARLING 2014), a predição e anotação dos genes foram realizadas usando RAPid Annotation usando System Technology (RAST) v.2.0 (<http://rast.nmpdr.org>) e curadoria manual usando Geneious (<https://www.geneious.com>) e BLASTN (ALTSCHUL et al., 1990).

4.15 PAN-GENOMA

A análise dos pan-genomas das cepas foi realizada com o Roary v3.13.0 (PAGE et al. 2015). Os arquivos .gff usados como entrada foram baixados do RefSeq / NCBI, e obtidos dos arquivos .gbk que foram então convertidos, para os genomas sequenciados para este estudo, foram usados os arquivos .gff produzidos pela PROKKA. Além disso, foi utilizado um ponto de corte de identidade de 95%. Os ortólogos resultantes foram classificados como genes

centrais, softcore, shell e nuvem de acordo com a configuração padrão do software. Os genes principais foram alinhados automaticamente com MAFFT v. 7.310 (KATO & STANDLEY, 2013) usando o parâmetro `-e --mafft` em Roary, criando um alinhamento multi-FASTA das sequências de nucleotídeos de todos os genes principais. Este arquivo foi usado como entrada para criar uma árvore filogenética pela inferência de máxima verossimilhança pelo software IQ-TREE (versão 2.0.4) (NGUYEN et al. 2015), em um computador local, usando a seleção automática do modelo de substituição de nucleotídeo em ModelFinder para selecionar o modelo de substituição de DNA mais adequado (KALYAANAMOORTHY et al. 2017). O suporte do nó foi avaliado com uma inicialização ultrarrápida (MINH et al. 2013) usando 100.000 réplicas. A árvore de máxima verossimilhança foi visualizada usando FigTree v1.4.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) (RAMBAUT, 2009). Além disso, a filogenia também foi realizada com base na matriz presença-ausência de genes usando o IQ-TREE com a mesma configuração de auto-inicialização. Os dados foram binarizados quanto aos critérios de presença e ausência, convertidos para o formato fasta e posteriormente utilizados como entrada no software iqtree, onde foram realizadas análises filogenéticas, foram utilizadas 10.000 repetições (bootstrap).

4.16 MULTILOCUS SEQUENCE TYPING (MLST)

A análise de MLST foi realizada analisando sete *housekeeping* genes (*acsA*, *aroE*, *guaA*, *mutL*, *nuoD*, *ppsA* e *trpE*) conforme descrito por Curran et al., (2004). Sequências alélicas e tipos de sequência (ST) foram identificados a partir do sequenciamento do genoma total usando a ferramenta MLST em <http://www.genomicepidemiology.org/> (LARSEN et al., 2012).

4.17 PREDIÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA

A previsão da ocorrência de genes de resistência antimicrobiana foi realizada usando ResFinder 2.1 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder>), software Prokka (<https://github.com/tseemann/prokka>) (16) e Patric 3.5.43 (<https://patricbrc.org>). Após a montagem e previsão dos dados, o gene *bla_{KPC}* não foi encontrado na amostra JX03. Para confirmar a presença ou ausência desta sequência em nossos dados, uma anotação (cut-off <e-05) usando blast com dados de sequenciamento bruto contra todos os genes *bla_{KPC}* depositados no NCBI foi realizada.

5 RESULTADOS

Os resultados da Tese foram apresentados em forma de três artigos já submetidos:

Artigo 1: Ocorrência do gene *bla_{KPC}* em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* procedente do Brasil.

Artigo 2: Análise da resposta da *Pseudomonas aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos frente a monoterapia e terapia combinada utilizando quantum dots e proteômica.

Artigo 3: Análise pangenômica de dois isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos portador do gene *bla_{KPC}*.

5.1 ARTIGO 1 - OCCURRENCE OF *BLA_{KPC}* GENE IN CLINICAL ISOLATES OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* PROCEEDING OF BRAZIL

Short title: *Pseudomonas aeruginosa* harbouring gene *bla_{KPC}* in Brazil

Artigo submetido à revista ABCS HEALTH SCIENCES
Qualis A3

Jailton Lobo da Costa Lima¹, Rafael Matos Ximenes¹, Maria Amélia Vieira Maciel¹

¹ Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brasil.

Autor correspondente: Jailton Lobo da Costa Lima

e-mail: jailtonlobo@hotmail.com

Instituição responsável: UFPE

Financiamento: Não houve

Título corrido: Ocorrência do gene *bla_{KPC}* em infecções por *P. aeruginosa*

RESUMO

Pseudomonas aeruginosa é um dos principais microrganismos causadores de infecções relacionadas à assistência à saúde. O crescente aparecimento de cepas de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos (CRPA), tem se tornado um grave problema de saúde pública. A disseminação da enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) é um dos mecanismos envolvidos nessa resistência, causando a degradação de antibióticos β -lactâmicos. Diante do exposto, o objetivo desta revisão foi avaliar a ocorrência do gene *bla_{KPC}* em isolados clínicos de *P. aeruginosa* no Brasil. Para isso, foram utilizadas as bases de dados online: Lilacs, SciELO e PubMed. A busca de artigos foi realizada de fevereiro a setembro de 2020, incluindo artigos publicados de 2012 a 2020, utilizando as seguintes palavras-chave: *bla_{KPC}* (KPC), *Pseudomonas aeruginosa* e Brasil (em português e em inglês). Inicialmente, foram identificadas 30 publicações elegíveis para inclusão nesta revisão. Após a primeira análise, dois artigos foram excluídos por duplicidade. Posteriormente, foram avaliados títulos e resumos, 15 artigos foram excluídos por não se enquadrarem na temática, 13 artigos que atendiam aos critérios de inclusão foram lidos na íntegra. Nesses estudos, a presença do gene *bla_{KPC}* foi investigada em 566 isolados clínicos de *P. aeruginosa* no Brasil, com 86 (15,2%) amostras positivas encontradas. Pernambuco foi o estado com maior número de artigos e amostras positivas, respectivamente, 38,5% (5/13), 65,1% (56/86). Este trabalho reforça a necessidade de investigar a ocorrência deste gene em todas as regiões do país no CRPA, visando entender como ocorre sua disseminação e criar estratégias de prevenção e terapêuticas.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*; resistente a carbapenem; Brasil.

INTRODUÇÃO

Pseudomonas aeruginosa está incluída no grupo de seis patógenos conhecidos como ESKAPE, o qual é formado por *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter* spp., *P. aeruginosa* e *Enterobacter* spp. *P. aeruginosa* é uma das principais causas das infecções relacionadas à assistência a saúde (IRAS) no mundo e, além disso, apresenta elevada capacidade de torna-se resistente aos antimicrobianos, o que coloca esta bactéria na lista de microrganismos prioritários para desenvolvimento de estratégias de controle e prevenção de infecções da organização mundial de saúde.⁽¹⁾ Os principais sítios de colonização desses bacilos são o trato respiratório superior e o urinário, incluindo os rins. Devido à colonização prévia destes locais, *P. aeruginosa* é comumente relatada em infecções cirúrgicas, de feridas, do trato urinário (ITU), pneumonias, dermatites, e em infecções sistêmicas respiratórias em pacientes com fibrose cística e bacteremia.⁽²⁾ Diversos fatores de virulência estão envolvidos na patogênese da infecção por *P. aeruginosa*, a qual é dividida em três fases: adesão e colonização bacteriana, invasão local e disseminação sistêmica da infecção. No entanto, esta infecção pode ser interrompida em qualquer uma dessas etapas.⁽³⁾

Este microrganismo está relacionado a diversos tipos de IRAS, como as pneumonias associadas à ventilação mecânica, infecção de cateter venoso central, infecções do trato urinário, infecções em pacientes transplantados e além de ser frequentemente relatado como agente etiológico importante em pacientes com fibrose cística.⁽⁴⁾ Este patógeno é prevalente nos ambientes hospitalares, devido a sua capacidade de sobreviver em superfícies bióticas e abióticas, como nos equipamentos médico-hospitalares, sendo transmitida de paciente a paciente.⁽⁵⁾

Este microrganismo tem elevada habilidade para tornar-se resistente aos antimicrobianos e têm sido crescentes os casos de infecções com ocorrência mundial por cepas de *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos (CRPA), principalmente em indivíduos

internados em unidades de terapia intensiva (UTIs) e portadores de comorbidades. Estes fatores levaram a Organização Mundial de Saúde (OMS) a considerar *P. aeruginosa* como um dos patógenos prioritários para pesquisas e desenvolvimento de novas drogas.⁽⁶⁾ Entre os fatores de risco para infecção ou colonização por CRPA descritos, pode-se destacar a exposição prévia a carbapenêmicos, o número de dias de tratamento com carbapenêmicos e a coinfeção com *Escherichia coli*.⁽⁷⁾ Pneumonias e infecções de corrente sanguínea estão entre as principais infecções por *P. aeruginosa*, estando às pneumonias mais associadas ao surgimento de CRPA.⁽⁸⁾

O surgimento de cepas de CRPA está relacionado a diferentes mecanismos, dentre os quais se destacam a ocorrência de mutações que afetem a permeabilidade destes microrganismos aos carbapenêmicos, além da hiperexpressão de sistemas de efluxo a múltiplos fármacos que podem conferir resistência a uma ampla variedade de antimicrobianos.⁽⁹⁾ (Pang et al., 2019). Além destes mecanismos, deve-se destacar a produção de enzimas β -lactamases, incluindo as metalo- β -lactamases, destacando-se no Brasil a SPM-1, cuja ocorrência é endêmica, com todos os casos fora do Brasil estando relacionados a internamentos prévios no país. Outras enzimas importantes são as carbapenamases, destacando-se a *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), que possui ampla atividade hidrolítica contra cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos.⁽¹⁰⁾ A enzima KPC apresenta elevada disseminação global, sendo amplamente detectada em membros da ordem Enterobacteriales, sendo menos frequente entre os bacilos Gram-negativos não fermentadores (BGNF), embora haja vários relatos da ocorrência desta enzima em *P. aeruginosa* no mundo. A descrição do primeiro relato dessa enzima neste microrganismo ocorreu em 2007 na Colômbia.⁽¹¹⁾ Até o momento a sua ocorrência em *P. aeruginosa* foi relatada nos seguintes países: nas Américas: Brasil,⁽¹²⁾ Argentina,⁽¹³⁾ México,⁽¹⁴⁾ Porto Rico,⁽¹⁵⁾ Trinidad e

Tobago,⁽¹⁶⁾ Estados Unidos da América (EUA)⁽¹⁷⁾ e Canadá;⁽¹⁸⁾ na Europa: Alemanha,⁽¹⁹⁾ e Espanha;⁽²⁰⁾ na Ásia: China,⁽²¹⁾ Índia⁽²²⁾ e Irã.⁽²³⁾

Até o momento, 22 variantes do gene *bla_{KPC}* responsável por codificar a enzima KPC (KPC-2 a -23) foram descritas, sendo a KPC-2 a relatada mais frequentemente. A disseminação deste gene está relacionada principalmente ao transposon Tn4401, o qual é transportado por plasmídeos de aproximadamente 100 kb. No Brasil, todos os casos detectados desta enzima em *P. aeruginosa* estão relacionados à enzima KPC-2. Ainda não está totalmente elucidado como este gene chegou aos BGNF, mas sugere-se que este fenômeno ocorreu através da transferência genética com as Enterobacterales.⁽²⁴⁾

A grande preocupação relacionada com a produção da enzima KPC em cepas de *P. aeruginosa* se dá pela habilidade que este microrganismo tem para adquirir mecanismos de resistência, além de possuir resistência intrínseca a alguns antimicrobianos, propiciando a redução de opções terapêuticas para o tratamento de infecções por esta bactéria.⁽²⁵⁾

São escassos os estudos em que se avaliam combinações de fármacos contra cepas de CRPA, incluindo o uso de carbapenêmicos, o que dificulta determinar quais as melhores opções terapêuticas para infecções por este microrganismo.⁽²⁶⁾ Segundo Fritzenwanker et al.,⁽²⁷⁾ para o tratamento de infecções por CRPA produtoras das enzimas KPC ou GES sensíveis a ceftazidima/avibactam (CAZ-AVI) a terapia antimicrobiana deveria ser a combinação CAZ-AVI com colistina (polimixina E), enquanto que para cepas resistentes à CAZ-AVI, deve-se utilizar a associação de colistina com meropenem. Segundo Karaikos et al.,⁽²⁸⁾ em estudo de revisão, os fármacos com maior eficácia para o tratamento de infecções por *P. aeruginosa* na Europa, foram a colistina e a CAZ-AVI respectivamente. Além disso, também é demonstrado, que os estudos têm sido falhos em apontar qual a melhor terapia para o tratamento de infecções por CRPA, demonstrando que há uma pequena vantagem da monoterapia com colistina em comparação com a terapia combinada de colistina com outra

droga anti-*Pseudomonas*. Outro ponto importante demonstrado é que a implantação do ceftolozano-tazobactam como terapia de escolha para o tratamento de CRPA é uma excelente opção podendo ser associados com colistina, fosfomicina e plazomicina.

Diante do exposto, o objetivo desta revisão foi avaliar a ocorrência do gene *bla_{KPC}* em isolados clínicos de *P. aeruginosa* no Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

A revisão sistemática da literatura foi realizada no período de fevereiro e junho de 2020 utilizando as bases de dados on-line: Biblioteca Virtual em Saúde - BVS, Scientific Eletronic Library Online (SciELO) e U.S. National Library of Medicine and the National Institutes Health (PubMed). Foram utilizados os seguintes descritores, em português: *bla_{KPC}*, KPC, *Pseudomonas aeruginosa* e Brasil; e em inglês: *bla_{KPC}*, KPC, *Pseudomonas aeruginosa* e Brazil. Foram utilizados os intercessores “E” e “AND”.

Para a pesquisa dos artigos foi utilizado como critérios de inclusão: artigos que relacionassem o tema detecção do gene *bla_{KPC}* em *P. aeruginosa* no Brasil, artigos que tivessem sido publicados a partir do ano de 2012, ano do primeiro relato do gene *bla_{KPC}* neste microrganismo no Brasil e artigos publicados apenas em inglês, português ou espanhol. Através deste procedimento de busca, foram identificadas, inicialmente, 30 publicações potencialmente elegíveis para inclusão nesta revisão.

RESULTADOS

No total foram encontrados 30 artigos resultantes da busca, conforme os descritores utilizados, nas bases de dados pesquisadas. Após a análise inicial, que avaliou a possível duplicidade de artigos nas diferentes bases de dados, dois artigos foram excluídos.

Posteriormente foram avaliados os títulos e os resumos, 15 artigos foram excluídos por não se adequarem à temática. Após esta etapa, 13 estudos preenchiam os critérios de inclusão e passaram para a próxima etapa onde os artigos foram lidos na íntegra, como pode ser observada no fluxograma, figura 1. A tabela 1 apresenta os principais resultados encontrados nestes estudos.

Após a leitura dos 13 artigos na íntegra foi visto que nos estudos foi investigada a presença do gene *bla_{KPC}* em 566 isolados clínicos de *P. aeruginosa* no Brasil, sendo encontradas 86 (15,2%) amostras positivas. Pernambuco foi o estado com maior número de artigos e amostras positivas respectivamente, 38,5% (5/13), 65,1% (56/86) gráfico 1.

DISCUSSÃO

Nordmann & Poirel⁽⁴⁰⁾ avaliaram em um estudo de revisão relacionado à epidemiologia e o diagnóstico da resistência aos carbapenêmicos em bactérias Gram-negativas e observaram a prevalência de 64,6% de cepas de CRPA na América Latina, sendo as amostras mais prevalentes provenientes de culturas de secreção traqueal e de ITUs.

Estudos descritivos realizados no período de 2012 a 2020 no Brasil avaliaram *P. aeruginosa* como agente etiológico de IRAS em diversos estados brasileiros, descrevendo vários sítios de infecção com padrões diversos de susceptibilidade aos carbapenêmicos. Jacomé et al.,⁽³⁵⁾ analisaram dados de pacientes oncológicos de um hospital público de Recife, Pernambuco, descreveram uma maior frequência dos isolados em secreção traqueal 41%, sangue 22% e 10% em urina e ponta de cateter e com uma frequência de 53% de resistência aos carbapenêmicos.

O estudo de Campana et al.,⁽⁴¹⁾ realizado no Estado de São Paulo apontou 100% e 80% de resistência ao imipenem e meropenem, respectivamente, entre 25 isolados de CRPA. Destas, 56% (14/25) eram amostras do trato respiratório. Dados similares foram obtidos no estudo de Ribeiro et al.,⁽⁴²⁾ em que foi observado 100 % (42/42) de resistência aos carbapenêmicos no estado do Maranhão. Cabe ressaltar que em nenhum destes dois estudos foi detectada a ocorrência do gene *bla_{KPC}* entre os isolados de *P. aeruginosa* analisados. Federico & Furtado⁽⁴³⁾ avaliaram tendências e o impacto imediato e tardio do consumo de antimicrobianos em *Acinetobacter* spp. resistentes aos carbapenêmicos (CRAs), *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos (CRPA) e *Klebsiella* spp. resistentes aos carbapenêmicos (CRKs), através de um estudo ecológico em um hospital de ensino de São Paulo, no período de 2007 a 2016. Foi constatado que os carbapenêmicos eram os antimicrobianos mais prescritos e consequentemente induziram o aumento da resistência entre estes microrganismos. Entre amostras de CRPA, as mais prevalentes foram oriundas de sangue, 60,3%, e secreção traqueal, 48,6%.

Santos et al.,⁽¹⁰⁾ avaliaram as tendências epidemiológicas e de resistência aos antimicrobianos em isolados clínicos de *P. aeruginosa* do Rio de Janeiro ao longo dos anos 1995-2015, detectando um aumento significativo da resistência aos carbapenêmicos, que variou de 4,5% a 94,1%. No período de janeiro de 2013 a dezembro de 2015, De Paula & Costa⁽⁴⁴⁾ analisaram 3.255 isolados bacterianos provenientes de espécimes clínicos (líquido abdominal, osso, ponta de cateter, pele, secreção de ferida operatória, sangue, secreção traqueal e urina) obtidos de pacientes internalizados no Hospital das Clínicas de Goiânia, Goiás. Destes isolados, 283 correspondiam a bacilos Gram-negativos produtores de carbapenemases, sendo 21,6% (63/283), os isolados de *P. aeruginosa*, nos quais foi observada maior positividade bacteriana nas amostras de secreção traqueal, embora não tenha sido avaliada a presença de genes relacionados à resistência aos carbapenêmicos nestes isolados.

Enquanto isso, Lima et al.,⁽²⁹⁾ avaliaram a ocorrência de elevada produção de enzimas carbapenemases em estudo realizado em Recife, Pernambuco, realizado com 65 isolados de *P. aeruginosa*, provenientes de dois hospitais públicos, descrevendo uma frequência de 63,1% (41/65) portando o gene *bla_{KPC}*, em amostras de pacientes com diversas infecções provenientes de secreção traqueal 36%, 17% urina e 11% líquido cefalorraquidiano, por outro lado, Furtado et al.,⁽⁴⁵⁾ analisaram em Belém, Pará, no período 2012 a 2016 19 isolados de *P. aeruginosa* provenientes de amostras de hemocultura, e todos apresentam perfil de sensibilidade aos carbapenêmicos.

A maioria dos estudos que compuseram esta revisão se limitaram a detectar a ocorrência do gene *bla_{KPC}*.^(12,29,30,34,35,39) Embora seja importante detectar a ocorrência do gene, é fundamental compreender como ocorre sua disseminação, o tipo de clone envolvido, bem como o tipo de plasmídeo vetor.

Cavalcanti et al.,⁽³⁸⁾ descreveram a disseminação do gene *bla_{KPC}* em dois isolados pertencentes ao clone ST235 e um isolado do clone ST244. Dados similares foram relatados por Petroli et al.,⁽³³⁾ que relataram a ocorrência do gene *bla_{KPC}* em um isolado do clone ST235. Interessantemente, esta cepa foi isolada de ITU em 2008, muito antes da publicação do primeiro relato deste gene em *P. aeruginosa* no Brasil, que ocorreu em 2012. O clone ST235 foi primeiramente detectado em isolados na Colômbia e está relacionado com cepas com elevado índice de resistência aos antimicrobianos. Diferindo desses achados, Santos et al.,⁽¹⁰⁾ relataram a disseminação do gene *bla_{KPC}* em três isolados pertencentes ao clone ST1560 e dois isolados pertencendo ao clone ST1944.

Carrara-Marroni et al.,⁽³⁷⁾ descreveram a localização do gene *bla_{KPC}* em quatro isolados de CRPA, estando o gene localizado no cromossomo de três isolados e nos plasmídeos no quarto isolado. Porém, eles não caracterizaram o tipo de plasmídeo no qual o gene estava inserido. Galetti et al.,⁽³⁶⁾ caracterizou um novo pequeno plasmídeo carreando o gene *bla_{KPC}*,

denominado pBH6, em uma cepa de CRPA pertencente ao clone ST244. Santos et al.;⁽³²⁾ analisaram o genoma de uma CRPA pertencente a diferente clone ST2584, o qual havia sido recentemente descrito. Além disso, eles detectaram que o gene *bla_{KPC}* estava inserido em um plasmídeo do tipo IncQ1. Em outro estudo Galetti et al.,⁽³⁰⁾ caracterizaram um novo plasmídeo carreando o gene *bla_{KPC}*, onde descreveram a presença do plasmídeo pBH6 previamente descrito associado com vários genes de bacteriófagos em uma cepa de CRPA pertencente ao clone ST381.

O aumento do número de casos de IRAS ocasionadas por cepas de CRPA no Brasil e no mundo é um grave problema de saúde pública, sendo necessário avaliar o mecanismo de resistência envolvido no desenvolvimento desta resistência, além de haver a necessidade do uso racional dos antimicrobianos visando o menor tempo de internamento dos pacientes e consequentemente a menor ocorrência de desenvolvimento de cepas CRPA.

CONCLUSÃO

Diante dos dados sobre a disseminação do gene *bla_{KPC}* no Brasil e o impacto ocasionado por infecções por CRPA portadoras deste gene, fica clara a necessidade de se investigar em todas as regiões do país a ocorrência destes genes neste microrganismo, bem como avaliar o ambiente genético em que ele está inserido para compreender a sua dinâmica de disseminação e desta forma interromper a sua cadeia de transmissão. Além disso, é fundamental a adoção de medidas de prevenção de IRAS, o uso racional dos antimicrobianos com objetivo de reduzir o tempo de internamento dos pacientes, principalmente nas UTIs para evitar a ocorrência e disseminação de cepas de CRPA no ambiente hospitalar.

REFERENCES

1. Lupo A, Haenni M, Madec J-Y. Antimicrobial Resistance in *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas* spp. *Antimicrob Resist Bact from Livest Companion Anim.* 2018;(May):377–93.
<http://10.1128 / microbiolspec.ARBA-0007-2017>
2. Khan HA, Ahmad A, Mehboob R. Nosocomial infections and their control strategies *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. J Trop Biomed.* 2015;5(7)(June):505–9.
<http:// 10.1016/j.apjtb.2015.05.001>
3. Da Costa Lima JL, Alves LR, Da Paz JNP, Rabelo MA, Maciel MAV, De Moraes MMC. Analysis of biofilm production by clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with ventilator-Associated pneumonia. *Rev Bras Ter Intensiva.* 2017;29(3):310–6.
<http://10.5935/0103-507x.20170039>
4. Trubiano JA, Padiglione AA. Nosocomial infections in the intensive care unit. *Anaesth Intensive Care Med [Internet].* 2015;1–5.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.mpaic.2015.09.010>
5. Russotto V, Cortegiani A, Raineri SM, Giarratano A. Bacterial contamination of inanimate surfaces and equipment in the intensive care unit. *J Intensive Care [Internet].* 2016;(2015):1–8.
<http://dx.doi.org/10.1186/s40560-015-0120-5>
6. Brink AJ. Epidemiology of carbapenem-resistant Gram-negative infections globally. *Curr Opin Infect Dis.* 2019; 609–16. <http://10.1097 / QCO.0000000000000608>

7. Zhang D, Cui K, Wang T, Shan Y, Dong H, Feng W, et al. Risk factors for carbapenem-resistant pseudomonas aeruginosa infection or colonization in a chinese teaching hospital. *J Infect Dev Ctries*. 2018; 12(8):642–8.
<https://doi.org/10.3855/jidc.10150>
8. Mccann E, Srinivasan A, Deryke CA, Ye G, Depestel DD, Murray J, et al. Carbapenem-Nonsusceptible Gram-Negative Pathogens in ICU and Non-ICU Settings in US Hospitals in 2017 : A Multicenter Study. *Open Forum Infect Dis* 2018; 5 (10): 241
<https://10.1093 / ofid / ofy241>
9. Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin TJ, Cheng Z. Antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol Adv* [Internet]. 2019; 37(1):177–92. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.013>
10. de Oliveira Santos IC, Pereira de Andrade NF, da Conceição Neto OC, da Costa BS, de Andrade Marques E, Rocha-de-Souza CM, et al. Epidemiology and antibiotic resistance trends in clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa from Rio de janeiro - Brazil: Importance of mutational mechanisms over the years (1995–2015). *Infect Genet Evol* [Internet]. 2019; 73(April):411–5. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.05.015>
11. Villegas MV, Lolans K, Correa A, Kattan JN, Lopez JA, Quinn JP, et al. First Identification of Pseudomonas aeruginosa Isolates Producing a KPC-Type Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase . *Antimicrob Agents Chemother*. 2007; 51(4):1553–5. <https://10.1128/AAC.01405-06>
12. De Araújo Jácome PRL, Rodrigues Alves L, Borges Cabral A, Lopes ACS, Vieira Maciel MA. First report of KPC-producing Pseudomonas aeruginosa in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(9):4990. <https://10.1128 / AAC.00699-12>

13. Ramírez DG, Nicola F, Zarate S, Relloso S, Smayevsky J, Arduino S. Emergence of *Pseudomonas aeruginosa* with KPC-type carbapenemase in a teaching hospital : an 8-year study Printed in Great Britain. *J Med Microbiol* 2013; 62(10): 1565–70.
<https://10.1099 / jmm.0.059923-0>

14. Morales-Espinosa R, Delgado G, Espinosa LF, Isselo D, Oliver A. Fingerprint Analysis and Identification of Strains ST309 as a Potential High Risk Clone in a *Pseudomonas aeruginosa* Population Isolated from Children with Bacteremia in Mexico City. *Microbial Frontal.* 2017;8(March):1–12.
<https://10.3389/fmicb.2017.00313>

15. Wolter DJ, Khalaf N, Robledo IE, Vázquez JG, Santé IM, Aquino EE, et al. Surveillance of carbapenem-resistant *pseudomonas aeruginosa* isolates from Puerto Rican Medical Center Hospitals: Dissemination of KPC and IMP-18 β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(4):1660–4.
<https://10.1128 / AAC.01172-08>

16. Akpaka PE, Swanston WH, Ihemere HN, Correa A, Torres JA, Tafur JD, et al. Emergence of KPC-Producing *Pseudomonas aeruginosa* in Trinidad and Tobago. *J of Clinical Microbiol.* 2009;47(8):2670–1.
<https://10.1128 / JCM.00362-09>

17. Poirel L, Nordmann P, Lagrutta E, Cleary T, Munoz-Price L. Emergence of KPC-Producing *Pseudomonas aeruginosa* in the United States. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(7):33136.
<https://10.1128 / AAC.00513-10>

18. Walkty A, Alexander DC, Karlowsky JA, Nichol K, Embil J. Report of a KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolate in Canada. *J Antimicrob Chemother.* 2019;

- 74 (6): 1748-1749.[https://10.1093 / jac / dkz064](https://doi.org/10.1093/jac/dkz064)
19. Hagemann J, Pfennigwerth N, Gatermann G, Baum H Von, Essig A. KPC-2 carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* reaching Germany. *J Antimicrob Chemother.* 2018; 73 (7)(March):1812–4.
<https://doi.org/10.1093/jac/dky105>
 20. Pérez-vázquez M, Sola-campoy PJ, María Á, Ávila A, Gómez-bertomeu F, Solís S, et al. International Journal of Antimicrobial Agents Carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Spain : interregional dissemination of the high-risk clones ST175 and ST244. *Inter J of Antimicrob Agents.* 2020;56:1–7.
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.106026>
 21. Ge C, Wei Z, Jiang Y, Shen P, Yu Y, Li L. Identification of KPC-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in China. *J Antimicrob Chemother.* 2011; 66(5):1184–6. [https://10.1093 / jac / dkr060](https://doi.org/10.1093/jac/dkr060)
 22. Paul D, Chanda DD, Maurya AP, Mishra S, Chakravarty A, Gd S. Co-Carriage of bla KPC-2 and bla NDM-1 in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* Associated with Hospital Infections from India. *PLoS One* . 2015; 10 (12):1–7.
[https://10.1371/journal.pone.0145823](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145823)
 23. Lari A, Azimi L, Rahbar M, Alaghebandan R, Sattarzadeh-Tabrizi M. First report of *Klebsiella pneumonia* carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients in Iran : phenotypic and genotypic methods. *GMS Hyg Infect Control.* 2014; 9(1):5–9.
[https://10.3205 / dgkh000226](https://doi.org/10.3205/dgkh000226)
 24. Halat DH, Moubareck C. The Current Burden of Carbapenemases : Review of Significant Properties and Dissemination among. *ANTIBIO.* 2020;9:186.

<https://10.3390/antibiotics9040186>

25. Telling K, Laht M, Brauer A, Remm M, Kisand V, Maimets M, et al. Multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Estonian hospitals. *BMC Infect Dis.* 2018; 18 (53):1–10.
<https://doi.org/10.1186/s12879-018-3421-1>
26. Bassetti M, Peghin M, Vena A, Giacobbe DR. Treatment of Infections Due to MDR Gram-Negative Bacteria. *Front Med.* 2019; 6 (74) (April):1–10. [https://10.3389 / fmed.2019.00074](https://10.3389/fmed.2019.00074)
27. Fritzenwanker M, Imirzalioglu C, Herold S, Wagenlehner FM, Zimmer KP, Chakraborty T. Treatment Options for Carbapenem-Resistant Gram-Negative Infections. *Dtsch Arztebl Int.* 2018;115(20–21):345–52.<https://10.3238/arztebl.2018.0345>
28. Karaikos I, Lagou S, Pontikis K, Rapti V, Poulakou G. The “Old” and the “New” antibiotics for MDR Gram-negative pathogens: For whom, when, and how. *Front Public Heal.* 2019; 7(JUN):1–25. <https://10.3389 / fpubh.2019.00151>
29. Araújo Lima AV, da Silva SM, do Nascimento Júnior JAA, Correia MTDS, Luz AC, Leal-Balbino TC, et al. Occurrence and Diversity of Intra- and Interhospital Drug-Resistant and Biofilm-Forming *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Drug Resist.* 2020; 26(7):802–14. <https://10.1089 / mdr.2019.0214>
30. Galetti R, Andrade LN, Varani AM, Darini ALC. A phage-like plasmid carrying blaKPC-2Gene in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol.* 2019;10(MAR):2–6.
<https://10.3389 / fmicb.2019.00572>

31. Scavuzzi AML, Beltrão EMB, Firmo EF, de Oliveira ÉM, Beserra FG, Lopes AC de S. Emergence of blaVIM-2, blaNDM-1, blaIMP-7 and blaGES-1 in blaKPC-2-harboursing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Brazil. *J Glob Antimicrob Resist*. 2019;19(19):181–2. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.09.009>
32. de Oliveira Santos IC, Albano RM, Asensi MD, D'Alincourt Carvalho-Assef AP. Draft genome sequence of KPC-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* recovered from a bloodstream infection sample in Brazil. *J Glob Antimicrob Resist* [Internet]. 2018; 15:99–100.
<https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.08.021>
33. de Paula-Petroli SB, Campana EH, Bocchi M, Bordinhão T, Picão RC, Yamada-Ogatta SF, et al. Early detection of a hypervirulent KPC-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* ST235 in Brazil. *J Glob Antimicrob Resist*. 2018;12(18):153–4. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.01.014>
34. Chaves L, Tomich LM, Salomão M, Leite GC, Ramos J, Martins RR, et al. High mortality of bloodstream infection outbreak caused by carbapenem-resistant *P. aeruginosa* producing SPM-1 in a bone marrow transplant unit. *J Med Microbiol*. 2017;66(12):1722–9. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000631>
35. De Araújo Jácome PRL, Alves LR, Jácome-Júnior AT, Da Silva MJB, Da Costa Lima JL, Araújo PSR, et al. Detection of blaSPM-1, blaKPC, blaTEM and blaCTX-M genes in isolates of *pseudomonas aeruginosa*, *acinetobacter* spp. And *klebsiella* spp. from cancer patients with healthcare-associated infections. *J Med Microbiol*. 2016;65(7):658–65. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000280>
36. Galetti R, Andrade LN, Chandler M, De Mello Varani A, Darini ALC. New small plasmid harboring blaKPC-2 in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents*

- Chemother. 2016;60(5):3211–4.
<https://10.1128 / AAC.00247-16>
37. Carrara-Marroni FE, Cayô R, Streling AP, Da Silva ACR, Palermo RL, Romanin P, et al. Emergence and spread of KPC-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a Brazilian teaching hospital. *J Glob Antimicrob Resist*. 2015; 3(4):304–6.
<https://10.1016 / j.jgar.2015.07.002>
38. De Sá Cavalcanti FL, Mirones CR, Paucar ER, Montes LÁ, Leal-Balbino TC, de Moraes MMC, et al. Mutational and acquired carbapenem resistance mechanisms in multidrug resistant *pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Recife, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015;110(8):1003–9.
<https://doi.org/10.1590/0074-02760150233>
39. Rizek C, Fu L, dos Santos LC, Leite G, Ramos J, Rossi F, et al. Characterization of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates, carrying multiple genes coding for this antibiotic resistance. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2014;13(1):1–5. <https://10.1186 / s12941-014-0043-3>
40. Nordmann P, Poirel L. Epidemiology and Diagnostics of Carbapenem Resistance in Gram-negative Bacteria. *Clin Infect Dis*. 2019;69(Suppl 7):S521–8.
<https://doi.org/10.1093/cid/ciz824>
41. Campana EH, Xavier DE, Petrolini FVB, Cordeiro-Moura JR, Araujo MRE de, Gales AC. Carbapenem-resistant and cephalosporin-susceptible: a worrisome phenotype among *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Brazil. *Brazilian J Infect Dis* [Internet]. 2017;21(1):57–62. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2016.10.008>
42. Ribeiro PCS, Monteiro AS, Marques SG, Monteiro SG, Monteiro-Neto V, Coqueiro

- MMM, et al. Phenotypic and molecular detection of the bla KPC gene in clinical isolates from inpatients at hospitals in São Luis, MA, Brazil. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2016;16(1):1–16.
- <http://dx.doi.org/10.1186/s12879-016-2072-3>
43. Federico MP, Furtado GH. Immediate and later impacts of antimicrobial consumption on carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, and *Klebsiella* spp. in a teaching hospital in Brazil: a 10-year trend study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2018;37(11):2153–8.
- <http://10.1007 / s10096-018-3352-1>
44. Paula NMC, Costa TL da. Prevalência de infecções causada por bactérias gram-negativas produtoras de carbapenemase em um hospital terciário de Goiânia - Goiás. *EVS - Estud Vida e Saúde*. 2018;45:107–14.
- <http://10.18224/evs.v45i1.5494>
45. Furtado DMF, Silveira VS da, Carneiro IC do RS, Furtado DMF, Kilishek MP. Consumo de antimicrobianos e o impacto na resistência bacteriana em um hospital público do estado do Pará, Brasil, de 2012 a 2016. *Rev Pan-Amazônica Saúde*. 2019;10(0):1–8.
- <http://dx.doi.org/10.5123/s2176-6223201900041>

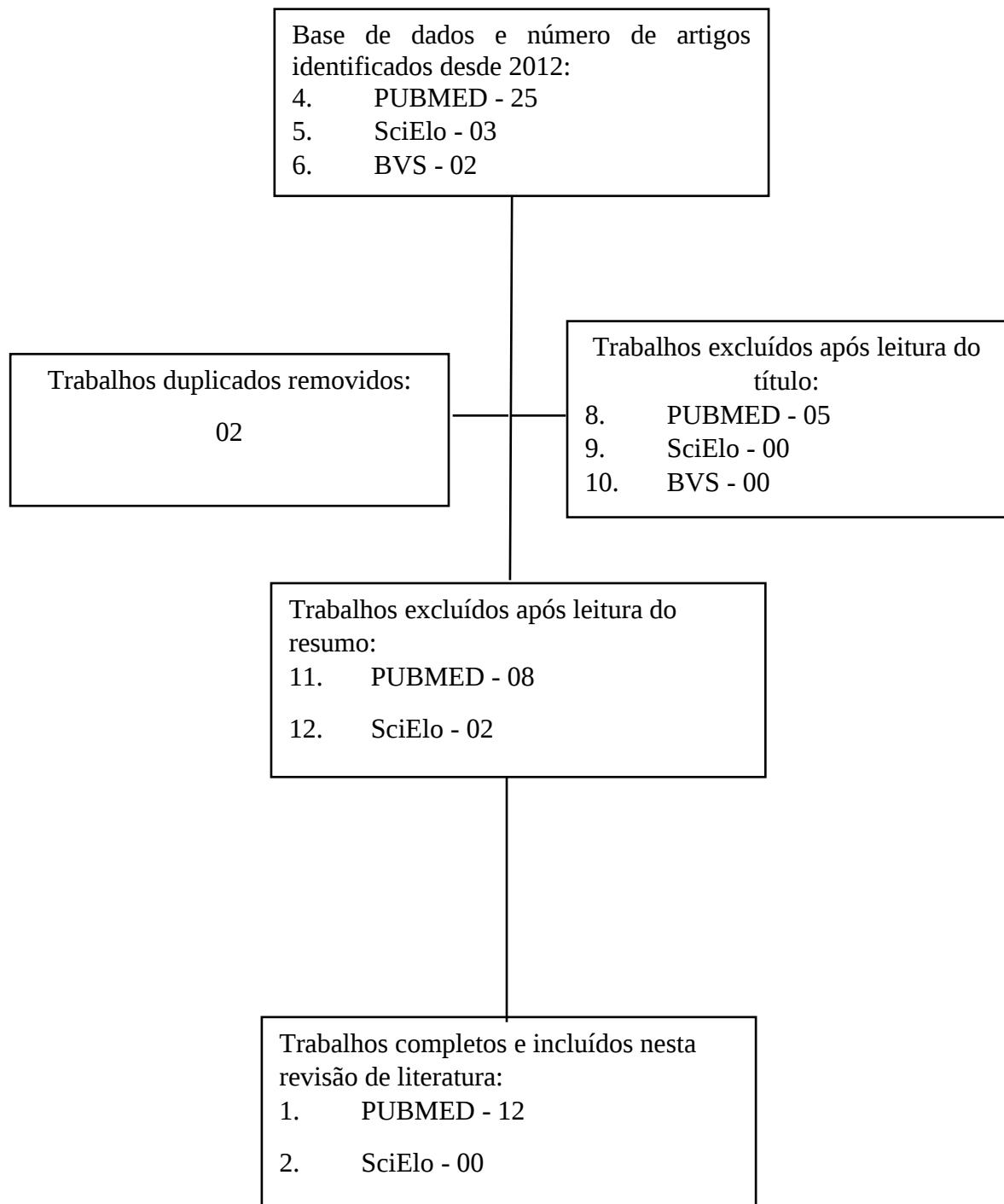


Figura 1. Fluxograma da seleção dos artigos para inclusão na revisão sistemática.

Tabela 1: Síntese dos artigos selecionados para a revisão

Autor	Ano de publicação	Estado	Objetivos	Nº de amostras (<i>P. aeruginosa</i>)	Resultados
Lima et al., ⁽²⁹⁾	2020	Pernambuco	Avaliar a dinâmica de resistência aos antibióticos e a produção de biofilme por <i>A. baumannii</i> e <i>P. aeruginosa</i> de dois hospitais públicos no nordeste do Brasil	65	41 isolados positivos para o gene <i>bla_{KPC}</i>
Santos et al., ⁽¹⁰⁾	2019	Rio de Janeiro	Determinar as variações nos padrões de resistência e diversidade clonal de <i>P. aeruginosa</i> coletadas no Rio de Janeiro há mais de 21 anos.	88	Cinco isolados positivos para o gene <i>bla_{KPC}</i>
Galetti et al., ⁽³⁰⁾	2019	Minas Gerais	Caracterizar o contexto genético do <i>bla_{KPC-2}</i> na cepa BH9 de <i>P. aeruginosa</i> resistente aos carbapenêmicos.	1	Um isolado positivo para o gene <i>bla_{KPC}</i>
Scavuzzi et al., ⁽³¹⁾	2019	Pernambuco	Investigar os genes <i>bla_{KPC}</i> , <i>bla_{NDM}</i> , <i>bla_{VIM}</i> , <i>bla_{IMP}</i> , <i>bla_{SPM-1}</i> e <i>bla_{GES}</i> em <i>P. aeruginosa</i> resistentes aos carbapenêmicos	14	Dois isolados positivos para o gene <i>bla_{KPC}</i>

Santos al., ⁽³²⁾	et	2018	Minas Gerais	Relatar um esboço da sequência do genoma de uma cepa de <i>P. aeruginosa</i> produtora de KPC recuperada de uma amostra de infecção da corrente sanguínea no Brasil.	1	Um isolado positivo para o gene <i>bla_{KPC}</i>
Petroli al., ⁽³³⁾	et	2018	Londrina	Descrever a produção da enzima KPC-2 pelo clone <i>P. aeruginosa</i> ST235 causando infecção em um hospital brasileiro	1	Um isolado positivo para o gene <i>bla_{KPC}</i>
Chaves al., ⁽³⁴⁾	et	2017	São Paulo	Descrever um surto de infecção da corrente sanguínea por <i>P. aeruginosa</i> resistente a carbapenêmicos em uma Unidade de Transplante de Medula Óssea (TMO)	29	Sete isolados positivos para o gene <i>bla_{KPC}</i>
Jacomé al., ⁽³⁵⁾	et	2016	Pernambuco	Investigar o perfil microbiológico e os dados relacionados a pacientes e infecções e buscar genes da β -lactamase em isolados bacterianos de pacientes com câncer hospitalizados em um hospital de Recife	58	Oito isolados positivos para o gene <i>bla_{KPC}</i>

Galetti et al., ⁽³⁶⁾	2016	Minas Gerais	Caracterizar o contexto genético de <i>bla_{KPC-2}</i> na sequência de <i>P. aeruginosa</i> tipo 244 do Brasil	1	Um isolado positivo para o gene <i>bla_{KPC}</i>
Carrara-Marroni et al., ⁽³⁷⁾	2015	Londrina	Relatar a detecção e disseminação do gene <i>bla_{KPC-2}</i> em <i>P. aeruginosa</i> multirresistente isolado de um hospital de ensino superior	170	Quatro isolados positivos para o gene <i>bla_{KPC}</i>
Cavalcanti et al., ⁽³⁸⁾	2015	Pernambuco	Investigar os mecanismos genéticos responsáveis pela resistência a múltiplas drogas em nove isolados de <i>P. aeruginosa</i> resistentes a carbapenêmicos de diferentes hospitais de Recife	9	Três isolados positivos para o gene <i>bla_{KPC}</i>
Rizek et al., ⁽³⁹⁾	2014	São Paulo	Avaliar a presença de genes de carbapenemases e a clonalidade de isolados de <i>P. aeruginosa</i> obtidos de um hospital por um período de 12 anos.	127	10 isolados positivos para o gene <i>bla_{KPC}</i>
Jacomé et al., ⁽¹²⁾	2012	Pernambuco	Pesquisar os genes <i>bla_{KPC}</i> , <i>bla_{SPM-1}</i> e	2	Dois isolados

bla_{IMP} em *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos positivos para o gene *bla_{KPC}*

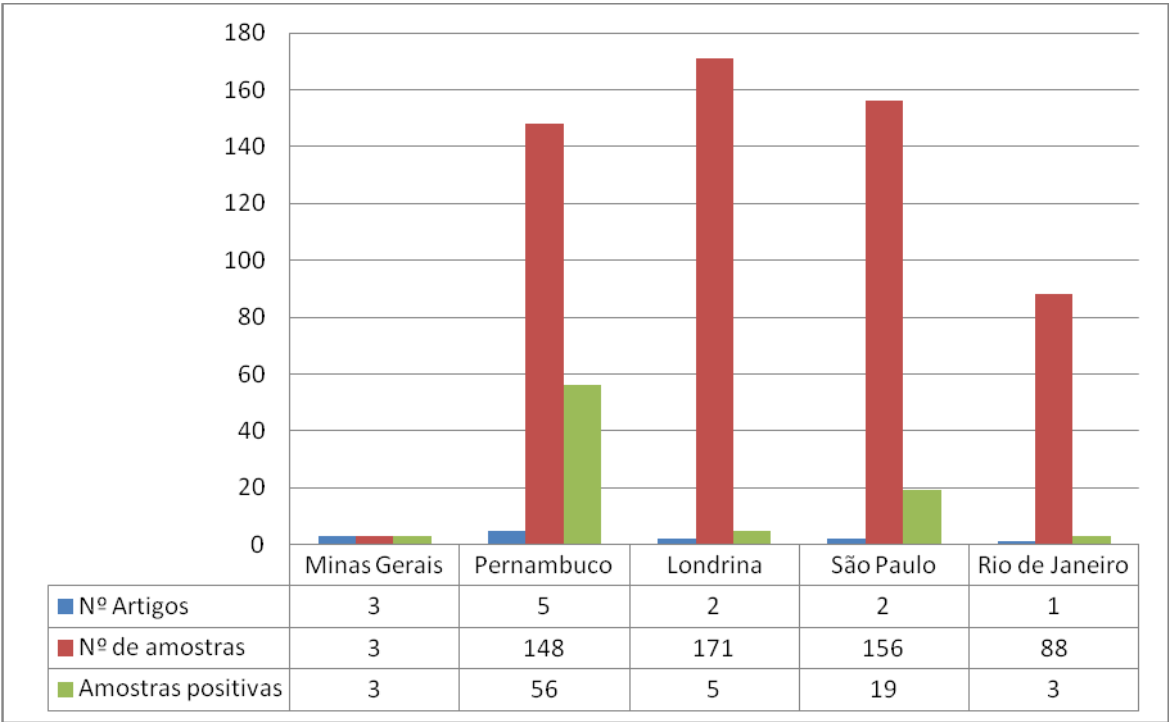


Gráfico 1. Dados sobre o número de publicações sobre ocorrência do gene *bla_{KPC}* em isolados clínicos de *P. aeruginosa*, o total de amostras analisadas e o número de amostras positivas.

5.2 ARTIGO 2 - ANALYSES OF THE RESPONSE OF CARBAPENEM-RESISTANT PSEUDOMONAS AERUGINOSA AGAINST MONOTHERAPY AND COMBINED THERAPY USING QUANTUM DOTS AND PROTEOMICS

Artigo submetido à revista: Anais da Academia Brasileira de Ciências

Qualis A2

Jailton Lobo da Costa Lima^{1*}, Jussyêgles Niedja da Paz Pereira¹, Bruno Luis Raposo², Adriana Fontes², Paulo Euzébio Cabral Filho², Reginaldo Gonçalves de Lima Neto¹, Rafael Matos Ximenes³, Maria Amelia Vieira Maciel¹

¹ Coordenação de Área Medicina Tropical, Centro de Ciências Médicas, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brasil.

² Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brasil.

³ Departamento de Antibióticos, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brasil.

*Corresponding author: Jailton Lobo da Costa Lima, Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE - CEP: 50670-901, e-mail: jailtonlobo@hotmail.com

Jailton Lobo da Costa Lima - orcid.org/0000-0002-5500-1129

Jussyêgles Niedja da Paz Pereira - orcid.org/0000-0002-6494-0128

Bruno Luis Raposo - orcid.org/0000-0003-2107-9697

Adriana Fontes - orcid.org/0000-0003-4675-2163

Paulo Euzébio Cabral Filho - orcid.org/0000-0002-1628-7769

Reginaldo Gonçalves de Lima Neto - orcid.org/0000-0002-8846-877X

Rafael Matos Ximenes - orcid.org/0000-0002-2011-2865

Maria Amelia Vieira Maciel - orcid.org/0000-0002-4220-6889

RESUMO

Cepas de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos (CRPA) têm se tornado um sério problema de saúde pública, limitando as opções terapêuticas a formação de biofilme agrava esse problema. Nesse contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a ocorrência de β -lactamases e genes de quorum sensing (QS) em isolados de CRPA, analisar a produção de biofilme, pesquisar a resposta do CRPA frente à monoterapia com meropenem (MPM) ou polimixina B (POL B) e sua associação com azitromicina (AZT) usando pontos quânticos (QDs) e análise proteômica. Seis isolados de CRPA foram analisados neste estudo. A busca dos genes das β -lactamases (*bla_{KPC}*, *bla_{SPM-1}*, *bla_{IMP}* e *bla_{VIM}*) e QS (*lasI*, *lasR*, *rhlI* e *rhlR*) foi realizada por meio de PCRs específicas e testados para produção de biofilme por técnica quantitativa. Um isolado de CRPA, contendo o gene *bla_{KPC}* e produtor de biofilme, foi selecionado para avaliar sua resposta à terapia usando QDs conjugados a MPM como sonda e o MS pela técnica de dessorção a laser assistida por matriz / tempo de voo de ionização (MALDI-TOF) para avaliar a expressão de proteínas. O único gene de β -lactamase detectado nos isolados foi o *bla_{KPC}* em 66,7% dos isolados. Todos os isolados foram produtores de biofilme e portadores dos genes QS. Os conjugados QDs-MPM desencadearam a formação de biofilme pelo isolado e a associação com AZT inibiu esse efeito. A análise proteômica mostrou que os tratamentos com MPM ou POL B suprimiram a expressão da proteína transglicosilase, enquanto a terapia combinada com AZT resultou na expressão da proteína RpoN. Assim, este estudo mostra que o uso da fluorescência combinada com a análise proteômica foi promissor para entender como uma cepa de CRPA reage ao tratamento antimicrobiano.

Palavras-chaves: biofilme, resistência a drogas, fluorescência, RpoN, transglicosilase.

Pontos chaves

Compreender os mecanismos de tolerância bacteriana aos antibióticos

Impacto da virulência na resistência bacteriana

Associação de ferramentas para estudar virulência e resistência bacteriana

1. INTRODUÇÃO

Pseudomonas aeruginosa é um microrganismo ubíquo, capaz de se adaptar a diversos ambientes e adquirir diversos mecanismos de resistência, causando diversos tipos de infecções, principalmente em pacientes imunossuprimidos ou com comorbidades. Além disso, o uso indiscriminado de antimicrobianos para o tratamento de infecções por esse microrganismo selecionou e disseminou clones de *P. aeruginosa* de alto risco multirresistente (MDR) ou extensivamente resistente (XDR). Esses são problemas críticos de saúde pública devido à limitação de tratamentos eficazes e seguros, sendo a combinação de polimixina B (POL B) com outro antimicrobiano uma das poucas opções terapêuticas possíveis (Doi, 2019; Horcajada et al., 2019; Montero et al., 2019).

Além disso, os antibióticos carbapenêmicos são uma classe de antimicrobianos β -lactâmicos amplamente utilizados para tratar infecções por bactérias gram-negativas, atuando na inibição da síntese da parede celular bacteriana, por meio da ligação às proteínas de ligação à penicilina (PBPs), sendo meropenem (MPM) mais eficaz do que imipenem contra cepas de *P. aeruginosa*. Outra vantagem desses antimicrobianos é a estabilidade contra um amplo espectro de enzimas β -lactamase (ESBL), embora sejam hidrolisadas pela enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), que possui maior poder hidrolítico. Devido ao surgimento de cepas de *P. aeruginosa* resistente a carbapenem (CRPA), tem havido uma limitação das opções terapêuticas, sugerindo o uso de combinações de antimicrobianos contra essas cepas, que podem incluir o uso de β -lactamâmicos com inibidores de β -lactamase, polimixinas, aminoglicosídeos e até mesmo o uso de meropenem (Horcajada et al., 2019; Montero et al., 2019; Patrier & Timsit 2019).

Além disso, a capacidade dos microrganismos de desenvolver resistência aos antimicrobianos, sua capacidade de formar biofilmes permite o desenvolvimento de infecções

graves com alta morbimortalidade. Biofilmes são comunidades estruturadas de microrganismos circundadas por uma matriz extracelular (EM) aderida a superfícies abióticas ou biológicas, que favorecem a sobrevivência dos microrganismos, principalmente em ambientes hostis. Além disso, o biofilme protege as células bacterianas do sistema imunológico do hospedeiro. Aumenta a tolerância à terapia antimicrobiana, pois impede a penetração da maioria dos antimicrobianos no ME, o que requer doses maiores que são praticamente impossíveis de atingir in vivo devido à sua toxicidade inerente (Kamali et al., 2020; Lima et al., 2018; Maurice et al., 2018; Wu et al., 2015). O tratamento de biofilmes requer um melhor entendimento dos mecanismos de ação de cada antimicrobiano, principalmente sua capacidade de atravessar o EM. Os β -lactâmicos são os medicamentos de escolha para tratar infecções causadas por isolados MDR de *P. aeruginosa*, enquanto as polimixinas são a última opção terapêutica para isolados XDR. Porém, ambos não são eficazes para atravessar a EM, portanto não sendo opções ideais para infecções associadas ao biofilme. A terapia combinada com azitromicina (AZT) pode contornar esse problema, uma vez que essa droga desregula o *quorum sensing* de bacteriano (QS) e reduz a formação de biofilme. Esses efeitos aumentam a penetração de β -lactâmicos e polimixinas na EM, tornando-os mais eficazes contra os microrganismos (Brackman et al., 2011; Wu et al., 2015; Xu et al., 2015).

Para entender como essas bactérias respondem aos antimicrobianos, ferramentas nanotecnológicas, como pontos quânticos (QDs), têm sido utilizadas (Li et al., 2020; Luo et al., 2011). Os QDs são nanocristais semicondutores fluorescentes que possuem propriedades únicas, como alta resistência à fotodegradação e superfície ativa para conjugação com moléculas, como proteínas e drogas. Consequentemente, a conjugação de QDs a drogas pode ser usada para avaliar o efeito dessas drogas em células bacterianas usando uma única nanossonda (Kumar et al., 2014).

Outra ferramenta promissora para avaliar as alterações proteicas de microrganismos em resposta a antimicrobianos é a espectrometria de massa por tempo de voo de dessorção / ionização a laser assistido por matriz (MALDI-TOF MS). O uso de MALDI-TOF MS tornou-se uma excelente ferramenta para identificar microbianos. Além disso, tem um alto potencial para conduzir uma investigação rápida de resistência antimicrobiana. Essa ferramenta gera espectros, nos quais proteínas ribossomais aparecem com massa molecular variando de 2 a 20 kDa, o que pode ser uma vantagem, pois podem ser utilizadas como biomarcadores. A identificação de microrganismos, bem como a análise de resistência antimicrobiana pela técnica de MALDI-TOF MS, ocorre por meio da comparação dos espectros adquiridos com espectros de referência incluídos no banco de dados de microrganismos de coleções de culturas de todo o mundo (Roberto et al. ., 2020).

Portanto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a ocorrência de β -lactamases e genes quorum sensing (QS) em isolados de CRPA, analisar a produção fenotípica de biofilme. Além disso, avaliamos a resposta de uma cepa clínica de CRPA portadora do gene *bla_{KPC}* e produtora de biofilme contra monoterapia com MPM ou POL B e sua associação com AZT usando QDs e a análise MALDI-TOF MS.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Identificação e teste de sensibilidade antimicrobiana (TSA)

Os isolados analisados neste estudo foram identificadas e tiveram testes de sensibilidade antimicrobiana (TSA) avaliados pelo sistema automatizado BD Phoenix TM, e a tobramicina foi realizada por meio de microdiluição em caldo TSB (Tryptona Soja) (CLSI, 2016). Seis cepas de *P. aeruginosa* CRPA foram incluídas no estudo. Os isolados foram armazenados a -20 °C no Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular da Universidade Federal de Pernambuco. Os isolados congelados foram reativados em caldo BHI (infusão de coração e cérebro) e incubados por 24 h a 37 °C, sendo então semeados com ágar cetrimida

para avaliação da pureza da cultura e incubados por 24 h a 37 °C. Esses microrganismos foram provenientes de amostras de secreção traqueal, sangue e urina.

2.2 Ensaio da Produção de Biofilme

Os seis isolados foram avaliados fenotipicamente para produção de biofilme utilizando a técnica descrita por Stepanovic et al., 2000, com modificações. Resumidamente, 50 g. L⁻¹ de sacarose foram adicionados ao caldo de infusão de cérebro e coração (BHI) (Lima et al., 2018). A categorização da produção do biofilme foi realizada de acordo com a biomassa aderida ao fundo da placa de acordo com os valores das densidades ópticas lidas a 570 nm. O caldo BHI foi utilizado como controle negativo (CN) e a cepa *P. aeruginosa* PA01 foi utilizada como controle positivo (CP), uma vez que esta cepa é recomendada como controle positivo para ensaios de biofilme. Os isolados de *P. aeruginosa* foram cultivados em caldo BHI por 24 horas a 37 °C. Em seguida, 200 µL das suspensões bacterianas foram aplicadas em placas de poliestireno contendo 96 poços de fundo plano para microtitulação, em triplicata. As placas foram então incubadas a 37 °C durante 24 horas. Após esse período, as suspensões bacterianas foram removidas e cada poço foi lavado por três vezes com 250 µL de solução fisiológica (0,9% NaCl) estéril. Posteriormente, foi realizada a fixação com 200 µL de metanol P.A. por 15 minutos. O metanol foi removido, as placas foram deixadas em temperatura ambiente a 28°C ± 2°C para secar e foram coradas com 200 µL de solução de cristal violeta durante cinco minutos. A seguir, as placas foram lavadas com água corrente e secas em temperatura ambiente a 28°C ± 2°C. Após este processo, foi realizada a leitura da absorbância em leitor de ELISA (BioRad, modelo 550), em comprimento de onda de 570 nm e as amostras foram classificadas segundo Stepanović e colaboradores (2000). O valor das densidades óticas para cada isolado (DO_i) foi obtido pela média dos três poços, sendo este valor comparado com a densidade ótica do controle negativo (DO_c). Os isolados foram classificados em quatro categorias de acordo com a média das DOs (densidades óticas) relacionada com os resultados obtidos para a DO_c. As categorias foram baseadas nos seguintes critérios: não aderente: DO_i ≤ DO_c; fracamente aderente (+): DO_c < DO_i ≤ 2 x DO_c; moderadamente aderente (++) : 2 x DO_c < DO_i ≤ 4 x DO_c ou fortemente aderente (+++): 4x DO_c < DO_i.

2.3 Extração e quantificação de DNA

Foi realizada a extração do DNA total dos seis isolados de CRPA. A extração foi feita utilizando o kit de extração de DNA Brazol (LGC Biotecnologia) de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante, e a dosagem do DNA foi realizada por espectrofotometria (Ultraspec 3000; Pharmacia Biotech) no comprimento de onda 260–280 nm.

2.4 Detecção dos genes de MβL (*bla_{SPM-1}*, *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*) e o *bla_{KPC}*

Visando elucidar o mecanismo de resistência aos β-lactâmicos nas cepas pesquisadas, foi realizada a pesquisa dos genes das MβLs e o *bla_{KPC}* utilizando primers específicos, tabela 1 (YIGIT et al., 2001; GALES et al., 2003; DONG et al., 2008). Para cada reação de PCR, foi adicionado um controle negativo, consistindo de componentes da reação sem adição de DNA, e cepas de controle positivo para os genes: *bla_{SPM-1}* (*P. aeruginosa* 48- 1997A), *bla_{IMP}* (*P. aeruginosa* PSA319) e *bla_{VIM}* (*P. aeruginosa* VIM-1) fornecidas pelo Laboratório Alerta da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) e o *bla_{KPC}* (*P. aeruginosa* P22A) oriunda da coleção de cultura do Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular, Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Gene	Primer	Sequence (5' – 3')	Annealing temperature (°C)	Number of cycles	References
<i>bla_{KPC}</i>	KPC-1 ^a	TGTCACTGTATCGCCGTC	63.0	35	Yigit et al. (2001)
	KPC-1b	CTCAGTGCTCTACAGAAAACC			
<i>bla_{SPM-1}</i>	SPM-1F	CCTACAATCTAACGGCGACC	55.3	30	Gales et al. (2003)
	SPM-1 R	TCGCCGTGTCCAGGTATAAC			
<i>bla_{IMP}</i>	IMP-F	GGAATAGAGTGGCTTAATTCTC	50.6	30	Dong et al. (2008)
	IMP-R	GTGATGCGTCYCCAAYTTCACT			
<i>bla_{VIM}</i>	VIM-F	CAGATTGCCGATGGTGTGTTGG	56.8	30	Dong et al. (2008)
	VIM-R	AGGTGGGCCATTCAGCCAGA			
<i>lasR</i>	lasR-F	AAGTGGAATAATTGGAGTGGAG	52	30	Zhu et al. (2004);
	lasR-R	GTAGTTGCCGACGACGATGAAG			Tingpej et al. (2007)
<i>lasI</i>	lasI-F	CGTGCTCAAGTGTTCAAGG	52	30	Zhu et al. (2004);
	lasI-R	TACAGTCGGAAAAGCCCAG			Tingpej et al. (2007)
<i>rhlR</i>	rhlR-F	TGCATTTTATCGATCAGGGC	52	30	Zhu et al. (2004);
	rhlR-R	CACTTCCTTTTCCAGGACG			Tingpej et al. (2007)
<i>rhlI</i>	rhlI-F	TTCATCCTCCTTTAGTCTTCCC	52	30	Zhu et al. (2004);
	rhlI-R	TTCCAGCGATTCAGAGAGC			Tingpej et al. (2007)

Tabela 1. Primers usados na detecção dos genes de β -lactamases e do QS genes.

2.5 Síntese de CdTe QDs e Conjugação de QDs ao meropenem

A síntese de QDs e a conjugação de QDs ao meropenem foram realizadas seguindo os protocolos previamente descritos por Cabral Filho et al., 2016, e Silva Júnior et al., 2020. Em seguida, foi selecionado aleatoriamente um isolado de CRPA *P. aeruginosa* (JX05) carreando o gene *bla_{KPC}* e produtor de biofilme para ser incubado com o conjugado QDs-MPM para avaliar, por microscopia de fluorescência, o efeito da associação com o AZT nas células bacterianas.

2.6 Inóculo bacteriano e marcação com o conjugado QDs-MPM

Para confirmar a pureza do inóculo, o isolado clínico de *P. aeruginosa* JX05 foi cultivado em ágar Cetrimide, e colônias únicas foram inoculadas em 2 mL de caldo Luria Bertani (LB) e incubadas a 37 °C por 24 h. Para as experiências de marcação, o inóculo foi ajustado para escala 0,5 de McFarland. Antes dos experimentos de marcação bacteriana, os grupos carboxila ativados restantes dos conjugados QDs (500 µL) foram bloqueados com 25 µL de base Tris (15 mg.mL⁻¹), de acordo com (Cabral Filho et al., 2016; Silva Júnior et al., 2020).

2.7 Efeitos dos conjugados de QDs no crescimento bacteriano

Para avaliar a eficácia da marcação bacteriana por conjugados QDs-MPM, o inóculo (50 µL) e a suspensão de conjugados QDs-MPM (50 µL) foram adicionados em um microtubo de 0,5 mL. O microtubo foi mantido em agitação constante por 1 h a 25 °C, e após esse período, foram realizadas duas lavagens sucessivas por centrifugação do microtubo a 1.400 × g por 5 min. Em seguida, o pellet foi ressuspenso em NaCl 0,9% (p / v - doravante denominado como solução salina) e observado usando um microscópio de fluorescência invertido (DMI4000B) (Leica Microsystems, Alemanha) em 63 × objetiva com abertura numérica de 1,25. A fluorescência dos conjugados foi observada usando os filtros de excitação e passagem de banda de emissão (BP) 560/40 nm e 645/75 nm, respectivamente.

Um segundo procedimento foi realizado para aumentar a formação de agregados bacterianos na presença de excesso de MPM. O inóculo (50 µL) e a suspensão de conjugado QDs-MPM (50 µL) foram incubados juntos como no experimento anterior, mas um adicional de 50 µL de MPM (1 mg. mL⁻¹) foi adicionado ao microtubo (Silva Júnior et al., 2020). O

microtubo foi mantido sob agitação constante por 1 h a 25 °C. Foram usados os mesmos procedimentos de lavagem e ressuspensão descritos acima. Como controle negativo, o inóculo bacteriano sem qualquer tratamento foi avaliado e também usando apenas os QDs.

2.8 Efeito da associação dos conjugados QDs-MPM com azitromicina

Para avaliar os efeitos do rompimento do QS na agregação bacteriana, 50 µL de AZT (1 mg. mL⁻¹) foram adicionados ao inóculo previamente incubado por 1 h com o QDs-MPM e o excesso de MPM (segundo procedimento). Em seguida, o sistema foi incubado por mais 30 min a 25 °C. Após esse segundo período de incubação, foram seguidos os mesmos procedimentos de lavagens e ressuspensão, com solução salina, conforme descrito nos testes anteriores. Estas análises foram realizadas em triplicata.

2.9 Análise proteômica por MALDI-TOF MS

O efeito dos antibióticos na composição proteica do isolado clínico de *P. aeruginosa* JX05 foi determinado por MALDI-TOF MS. Para tanto, o inóculo foi preparado conforme descrito nos experimentos anteriores e, a seguir, tratado com MPM, POL B, AZT e sua associação, conforme tabela 2. Essas análises foram realizadas em triplicata.

Os inóculos foram tratados com MPM e / ou POL B e mantidos sob agitação constante por 1 h a 25 °C. Para os grupos que também receberam AZT, após esse primeiro período de incubação, esse antimicrobiano foi adicionado e as amostras foram incubadas por mais 30 min a 25 °C sob agitação constante. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 9.000 × g por 5 min, e o pellet foi lavado três vezes com 50 µl de água ultrapura. Um microlitro das amostras foi aplicado diretamente em duplicata em uma placa de aço polido (Bruker Daltonics, MA, EUA). Em seguida, as amostras foram cobertas com solução de matriz de ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico (CHCA) (75 mg . mL⁻¹ de matriz CHCA em etanol / água / acetonitrila [1: 1: 1] com ácido trifluoroacético 0,03%) e secas (CORDEIRO et al., 2017).

Os espectros de massa foram adquiridos usando um espectrômetro de massa MALDI-TOF MS Autoflex III (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) equipado com um laser Nd: YAG de 1.064 nm, no modo refletor positivo e frequência de laser de 100 Hz. Os espectros de MS foram adquiridos na faixa de 400-2000 m/z usando o software Flex Control (versão 3.3, Bruker). Os espectros foram processados no software Flex Analysis (versão 3.3, Bruker),

conforme (BIEMANN et al., 1992). Além disso, os espectros obtidos nos diferentes tratamentos foram comparados entre eles por meio do software MMass versão 5.5, uma ferramenta Open Source Mass Spectrometry (STROHALM et al., 2010). Para comparar a lista de picos, os dados foram processados usando as seguintes ferramentas: coleta de pico, correção de linha de base e suavização, de acordo com (NIEDERMEYER & STROHALM, 2012).

Posteriormente, os íons parentais selecionados foram fragmentados usando o modo LIFT. As sequências foram comparadas com o banco de dados de proteínas do National Center for Biotechnology Information (NCBI, MD, EUA), BioPep (IWANIAK et al., 2016) e UniProt (BATEMAN, 2019).

Tabela 2. Grupos experimentais usados para análises proteômicas. Os antibióticos foram dissolvidos a 1 mg. mL⁻¹.

Grupos	Tratamentos
1	50 µL of the inoculum without any treatment (negative control)
2	50 µL of the inoculum + 50 µL of AZT
3	50 µL of the inoculum + 50 µL of MPM
4	50 µL of the inoculum + 50 µL of POL B
5	50 µL of the inoculum + 50 µL of MPM and 50 µL of AZT
6	50 µL of the inoculum + 50 µL of POL B and 50 µL of AZT
7	50 µL of the inoculum + 50 µL of MPM, 50 µL of POL B, and 50 µL of AZT

3. RESULTADOS

3.1 Origem dos isolados

Foram avaliados os seis isolados de CRPA de amostras de secreção traqueal, sangue e urina, sendo a amostra mais frequente a secreção traqueal com 66,7% (4/6), conforme pode ser observado na Tabela 3.

3.2 Detecção de biofilme

Os seis isolados estudados foram produtores de biofilme, além disso, todos foram classificados como fortemente aderentes conforme demonstrado na tabela 3.

3.3 Detecção de genes do QS MβL (*bla_{SPM-1}*, *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*) e *bla_{KPC}*

Todos os seis isolados de CRPA exibiram os quatro genes do QS estudados (*lasI*, *lasR*, *rhlI*, *rhlR*). Dos seis isolados de CRPA analisados neste estudo, nenhum apresentou genes relacionados a MβL, entretanto, 66,7% (4/6) foram positivos para a presença do gene *bla_{KPC}*, tabela 3.

3.4 Avaliação da formação de biofilme por conjugados QDs-MPM

As bactérias não tratadas não mostraram qualquer fluorescência quando excitadas usando o filtro 560/40 nm (Fig. 1A). Após incubar o isolado clínico de *P. aeruginosa* JX05 com os conjugados QDs-MPM, raras células isoladas e pequenos agregados bacterianos (microcolônias) marcados pelo conjugado foram observados (Fig. 1B), o que prova a viabilidade do uso desta ferramenta. Em seguida, foi realizado um segundo experimento, no qual o isolado clínico JX05 foi incubado com os conjugados QDs-MPM suplementados com excesso de MPM livre. O MPM extra induziu a formação de grandes agregados bacterianos, sugerindo que a formação de biofilme é a primeira resposta deste isolado clínico JX05 ao estresse causado pelo MPM (Fig. 1C). Então, quando o tratamento com AZT foi combinado, interrompeu a formação de biofilme, e apenas bactérias livres (células planctônicas) foram vistas, demonstrando que a associação de AZT com MPM é capaz de prejudicar a formação de biofilme neste isolado clínico de CRPA (Fig. 1D).

Isolado	Perfil de susceptibilidade	Amostra	Perfil de adesão do biofilme	<i>LasR</i>	<i>lasI</i>	<i>rhlR</i>	<i>rhlI</i>	<i>KPC</i>	<i>SPM-1</i>	<i>VIM</i>	<i>IMP</i>
JM01	MDR	Secreção traqueal	Fortemente aderente	+	+	+	+	-	-	-	-
JM02	MDR	Secreção traqueal	Fortemente aderente	+	+	+	+	-	-	-	-
JX03	XDR	Secreção traqueal	Fortemente aderente	+	+	+	+	+	-	-	-
JX04	XDR	Sangue	Fortemente aderente	+	+	+	+	+	-	-	-
JX05	XDR	Secreção traqueal	Fortemente aderente	+	+	+	+	+	-	-	-
JX06	XDR	Urina	Fortemente aderente	+	+	+	+	+	-	-	-

Tabela 3. Caracterização fenotípica e genética da produção de biofilme por isolados de CRPA.

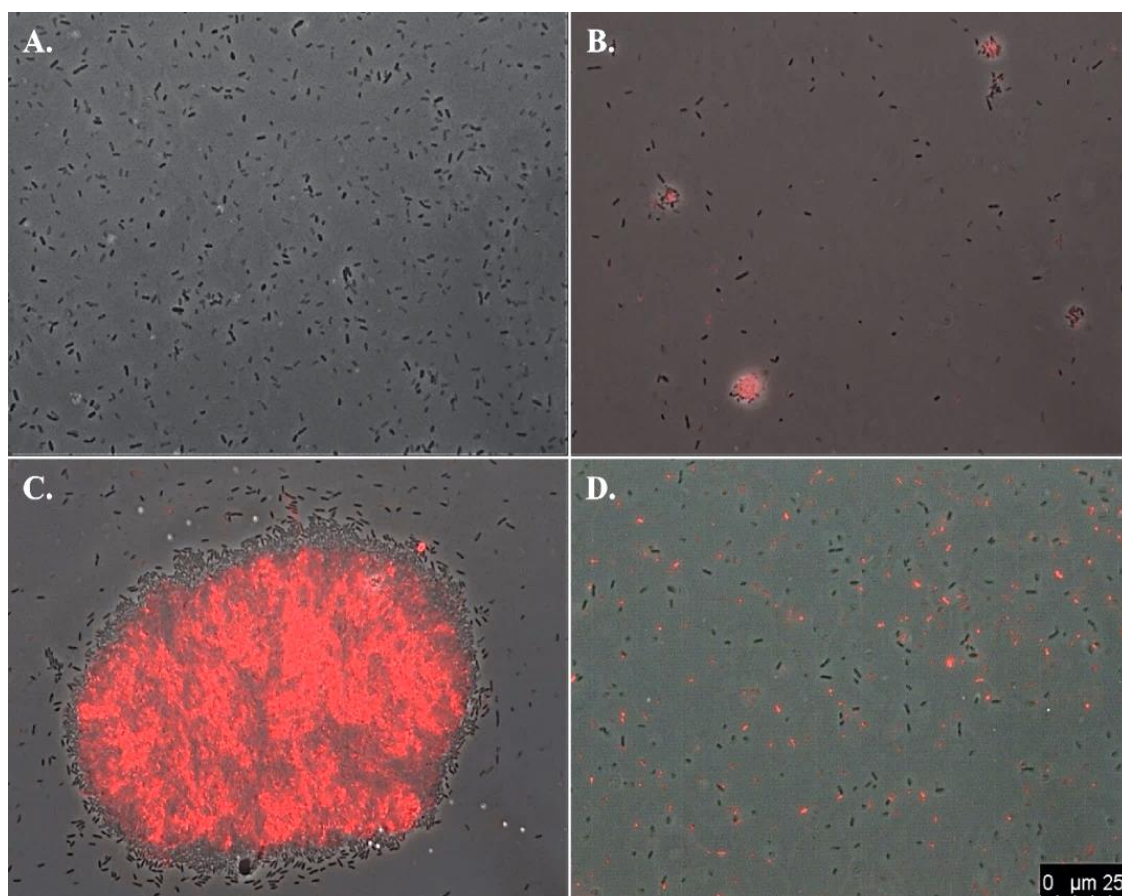


Figura 1. Imagens representativas de microscopia de fluorescência do isolado clínico JX05. (A) Bactéria não tratada; (B) Bactérias tratadas com conjugados QDs-MPM; (C) Conjugados QDs-MPM tratados com bactérias e um excesso de MPM livre, e (D) Bactérias tratadas com conjugado QDs-MPM e um excesso de MPM livre, combinado com AZT. Micrografias mostram a sobreposição de imagens de fluorescência (BP 645/75 nm) e de contraste de fase. Barra de escala: 25 μm .

3.5 Análise proteômica por MALDI-TOF MS

A análise do MS do isolado clínico JX05 de *P. aeruginosa* não tratado (controle negativo) mostrou vários picos com m/z entre 400.000 e 1.264.420 Da, conforme mostrado na Figura 2A. O tratamento com AZT (tratamento 2) não alterou o padrão do espectro de massa (Figura 2B). No entanto, a análise comparativa dos espectros de massa adquiridos para as bactérias tratadas com MPM (tratamento 3 - Figura 2C), POL B (tratamento 4), MPM + AZT (tratamento 5), POL B + AZT (tratamento 6) e MPM + POL B + AZT (tratamento 7)

revelou a supressão de dois picos a 1.151,450 e 1.264,420 Da. A análise de MS / MS do pico de 1.264,420 Da revelou a seguinte sequência de aminoácidos: ácido glutâmico-lisina-treonina-prolina-glicina-prolina-valina-tirosina-glicina, que mostrou 100% de similaridade com a proteína transglicosilase, conforme indicado por *P. aeruginosa* taxonomia id: 287 database (*P. aeruginosa* ATCC 10145), número de acesso: EVT86745.1, tabela 4.

O espectro de massa do isolado clínico JX05 tratado com a associação de MPM + AZT (tratamento 5), POL B + AZT (tratamento 6) e MPM + POL B + AZT (tratamento 7), um pico diferente apareceu em 972,389 Da. A análise de MS / MS revelou a seguinte sequência de aminoácidos: glicina-metionina-arginina-ácido glutâmico-metionina-lisina-glutamina, que mostrou 100% de similaridade com a proteína RpoN ($\sigma 54$), conforme indicado pela taxonomia de *P. aeruginosa* id: 287 banco de dados (*P. aeruginosa* ATCC 10145), Sequência de Referência NCBI ID WP_047150239.1, tabela 4.

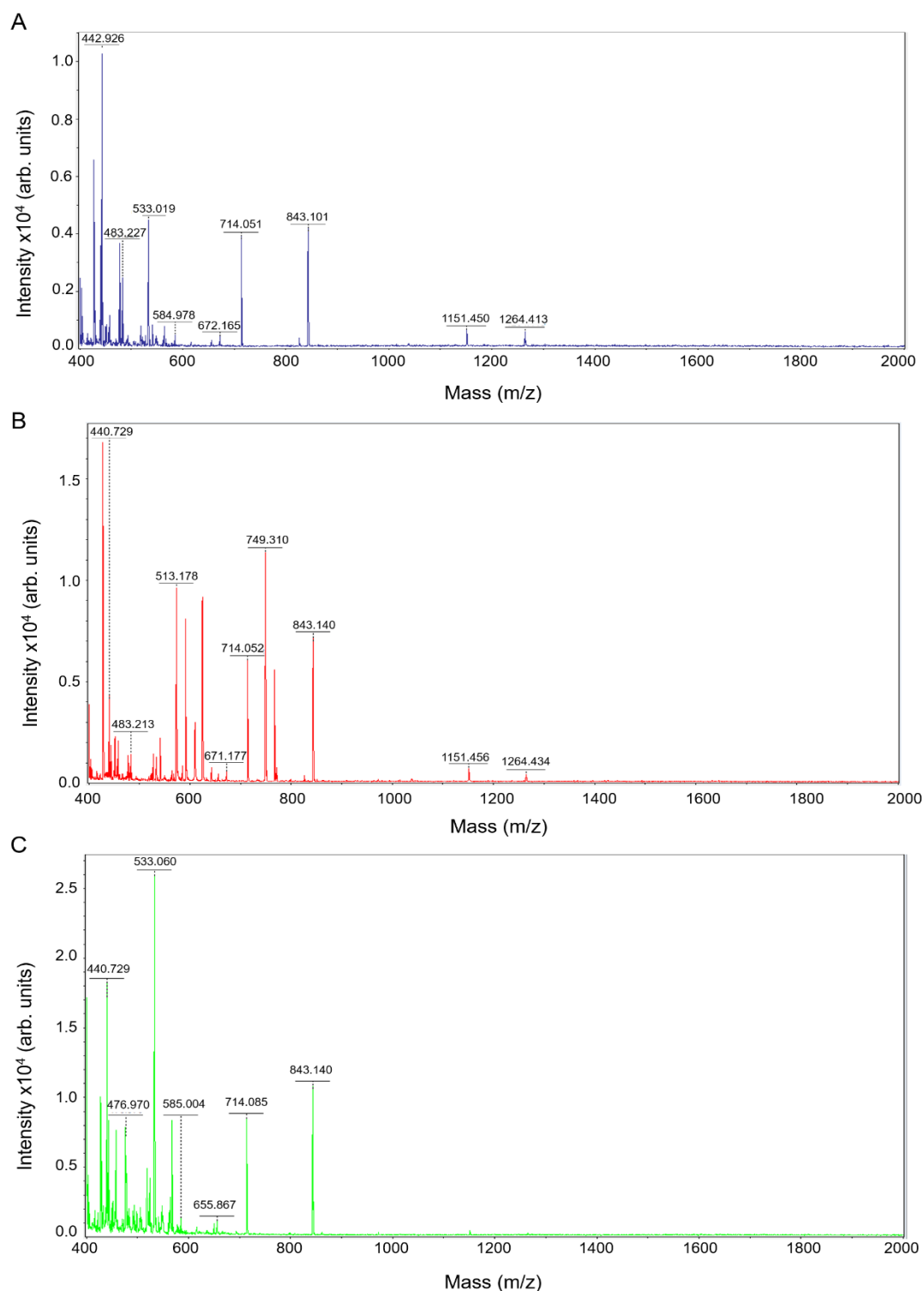


Figura 2. Efeito de antibióticos na composição proteica do isolado de *P. aeruginosa* JX05 obtido por espectrometria de massa MALDI TOF. Em (A) apenas a cepa bacteriana *P. aeruginosa* JX05; (B) *P. aeruginosa* após tratamento com AZT e (C) *P. aeruginosa* após tratamento com MPM. arb. unidades são unidades arbitrárias.

Tabela 4. Análise de expressão (+) e supressão (-) de proteínas transglicosilase e RpoN contra diferentes tratamentos antimicrobianos em isolado de *P. aeruginosa* JX05 por MALDI-TOF MS.

Traatamentos	1	2	3	4	5	6	7
Proteínas							
Transglicosilase	+	+	-	-	-	-	-
RpoN	-	-	-	-	+	+	+

4. DISCUSSÃO

A maioria dos isolados de CRPA analisados neste estudo foram obtidos de amostras de secreção traqueal, dados que corroboram os achados descritos na literatura que traz esta *P. aeruginosa* como um dos principais microrganismos relacionados às infecções do trato respiratório inferior (Goncalvez et al., 2017; Lima et al., 2018).

Neste estudo, o teste fenotípico utilizado para analisar a formação de biofilme por isolados de CRPA demonstrou a produção de biofilme por todos os isolados, que foram classificados como fortes produtores. Corroborando outros estudos que utilizaram a mesma técnica para analisar a produção de biofilme por este mesmo microrganismo, obtendo alta produção de biofilme entre os isolados analisados (Perez, Machado, Barth 2013; Kırmusaoğlu, Yurdugül 2017; Lima et al., 2017; Lima et al., 2018).

A formação do biofilme é um processo multifatorial e é regulado por diferentes genes relacionados ao QS (Lima et al., 2018). A presença de genes QS associados à detecção da formação de biofilme pelos isolados pode auxiliar na avaliação da regulação da expressão desses genes. Neste estudo, foi encontrada a presença de genes QS em todos os isolados de CRPA analisados, corroborando os dados obtidos em outros estudos que detectaram alta ocorrência dos mesmos (Perez et al., 2013; Lima et al., 2017; Lima et al., 2018).

Diferentes enzimas podem estar relacionadas ao desenvolvimento de resistência entre isolados de CRPA, neste estudo foi encontrada alta ocorrência do gene *bla_{KPC}* entre os isolados analisados, dados que corroboram os resultados obtidos em outros estudos (Jacomé et al., 2016; Scavuzzi et al., 2019).

O aumento de bactérias resistentes ao MPM é um sério problema de saúde pública, mesmo que altas doses de MPM ainda sejam eficazes contra bactérias planctônicas. Porém, a formação do biofilme dificulta a ação desse antimicrobiano no microrganismo (Song et al., 2019). Neste estudo, o isolado clínico de *P. aeruginosa* JX05KPC-positivo respondeu ao estresse causado pela maior concentração de MPM produzindo biofilme. Além disso, Perez et al., (2012) demonstraram que isolados de *P. aeruginosa* produtores de metalo- β -lactamase apresentaram maior capacidade de induzir a formação de biofilme, principalmente aqueles portadores dos genes QS, sendo também observado nos isolados de CRPA neste estudo que abrigam os genes QS e *bla_{KPC}*.

A matriz extracelular do biofilme (EM) impede a maioria dos antibióticos de atingir as células bacterianas, tornando as doses terapêuticas ineficazes (Olivares et al., 2020). Consequentemente, a liberação da enzima β -lactamase KPC pelo isolado clínico de *P. aeruginosa* JX05 no EM do biofilme em formação auxilia na tolerância desse isolado ao MPM, que induziu a formação de grandes agregados bacterianos. Este resultado demonstra o papel que diferentes fatores de resistência e virulência desempenham na resistência bacteriana (Bowler et al., 2012; Olivares et al., 2020).

Neste estudo, os QDs foram utilizados como sondas conjugadas ao MPM para avaliar a resposta de um isolado de CRPA produtor de biofilme a diferentes terapias, o que se mostrou uma ferramenta promissora. Corroborando os resultados obtidos por Luo et al., (2011), no qual, eles utilizaram QDs como sondas para avaliar o efeito do antimicrobiano rocefim contra *Escherichia coli* e obtiveram bons resultados. Dados semelhantes foram

observados no estudo de Galdiero et al., (2016) em que a atividade do peptídeo antimicrobiano indolicidina (Ind) foi avaliada usando QDs contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *P. aeruginosa* (ATCC 1025), *E. coli* (ATCC 11229) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031). Embora os estudos aqui citados mostrem os efeitos das drogas quando conjugadas com QDs, é fundamental reforçar que todas essas combinações foram testadas contra microrganismos com alta suscetibilidade aos antimicrobianos. Diferente deste estudo, em que é o primeiro a utilizar QDs conjugados com MPM e terapia combinada com AZT para cepa de *P. aeruginosa* portador do gene *bla_{KPC}* e alto poder de degradação de agentes antimicrobianos. A tolerância ao MPM desse isolado clínico pode estar associada à liberação da enzima β -lactamases (KPC) na matriz extracelular do biofilme formado, o que corrobora os dados obtidos por Bowler et al., (2012).

O QD-MPM já foi utilizado anteriormente por nosso grupo para desencadear a formação de biofilme e também revelou o papel de um inibidor da bomba de efluxo, o CCCP (carbonyl cyanide-3-chlorophenylhydrazone), em uma cepa MDR de *P. aeruginosa* Silva Júnior et al., (2020) analisaram um isolado clínico de *P. aeruginosa* (P118) carregando o gene *bla_{GES-1}* (uma β -lactamase de espectro estendido clinicamente relevante (ESBL), que hidrolisa penicilinas e cefalosporinas de amplo espectro, mas poupa monobactâmicos e carbapenêmicos) usando os conjugados QDs-MPM. Seus resultados demonstraram que essa sonda foi eficiente para marcar esse microrganismo, possibilitando visualizar a formação de agregados bacterianos em resposta ao tratamento com MPM. Os autores também verificaram por meio de QDs-MPM o efeito do CCCP em uma cepa de *P. aeruginosa* (MDR), que foi capaz de inibir a bomba de efluxo desse microrganismo, aumentando a suscetibilidade desse isolado (Silva Júnior et al., 2020).

Aqui, também confirmamos a eficácia dos conjugados QDs-MPM na tolerância bacteriana aos antimicrobianos e o efeito da associação de drogas na cepa *XDR P. aeruginosa*

(Figura 1 B-D). Até onde sabemos, este é o primeiro estudo que usou QDs-MPM em uma cepa XDR *P. aeruginosa* (JX05) carregando o gene *bla_{KPC}*, que confere resistência a todos os β -lactâmicos, incluindo carbapenêmicos, e explorou a terapia de combinação usando AZT e QDs -MPM.

Neste contexto, o AZT tem se mostrado uma alternativa eficaz para prejudicar a adesão e a formação de biofilme de *P. aeruginosa* em superfícies abióticas (Xu et al., 2015). Nesse sentido, com nossos resultados, nos quais o AZT foi associado aos conjugados QD-MPM, foi comprovada a eficácia do AZT na inibição do QS, evitando a formação de agregados bacterianos (Figura 1D).

O exame de perfis de proteínas por análise proteômica tornou-se uma ferramenta importante para o estudo da resistência bacteriana e a compreensão da biologia da resposta proteômica de patógenos é geralmente específica para cada antibiótico (Pérez-Llarena & Bou, 2016), nossos dados relacionados a a análise proteômica empregando MS mostrou que os tratamentos com MPM ou POL B suprimiram a expressão da proteína transglicosilase lítica, enquanto os tratamentos com MPM + AZT (tratamento 5), POL B + AZT (tratamento 6) e MPM + POL B + AZT (tratamento 7) resultaram na expressão da proteína RpoN (σ 54).

RpoN é exigido por vários genes envolvidos em muitas funções, como; a produção de elementos extracelulares, diferentes mecanismos de resistência e fatores de virulência, que são necessários para se ajustar a uma variedade de condições ambientais (Yamano et al., 1998). Além disso, a proteína RpoN regula genes relacionados ao QS em *P. aeruginosa*, reduzindo o metabolismo celular e desencadeando a tolerância desse microrganismo ao MPM (Viducic et al., 2016). Outro estudo do mesmo grupo de pesquisa mostrou que a proteína RpoN promoveu a sobrevivência de *P. aeruginosa* quando tratada com tobramicina, favorecendo a tolerância terapêutica (Viducic et al., 2017). Por outro lado, a inibição da proteína RpoN em isolados

clínicos de *P. aeruginosa* reduz a virulência e a resistência dessas bactérias (M. G. Lloyd et al., 2019; Megan G. Lloyd et al., 2017).

Além disso, de acordo com a MS, as transglicosilases líticas (LTs) foram inibidas após a incubação de células bacterianas com MPM ou POL B. Essas LTs são responsáveis por catalisar a clivagem não hidrolítica das estruturas de peptidoglicano da parede celular bacteriana. Além disso, os LTs desempenham papéis importantes em diferentes vias, incluindo (i) síntese, remodelação e degradação da parede celular; (ii) detecção de antibióticos que atuam na parede celular; e (iii) expressão de mecanismos de resistência a antibióticos que atuam na parede celular por certas bactérias Gram-negativas (Dik et al., 2017).

Cavallari et al., (2013) demonstraram que as cepas mutantes de *P. aeruginosa* para genes relacionados à enzima transglicosilase causam o maior nível de resistência a esses patógenos, e a perda de transglicosilase específica em *P. aeruginosa* aumentou a sensibilidade β -lactâmica, (Lamers et al., 2015) sugerindo que a enzima transglicosilase pode ser um alvo para adjuvantes antimicrobianos.

A supressão da mutação em genes que codificam LTs em *P. aeruginosa* aumenta a produção de biofilme, mecanismo capaz de compensar a ausência dessa proteína (Lamers et al., 2015). Isso explica a formação de grandes agregados bacterianos quando o isolado clínico CRPA (JX05) foi tratado com MPM conjugado com QDs conforme observado pelas imagens fluorescentes (Figura 1B e 1C). Observamos também a ausência de LTs neste mesmo sistema (tratamento 3) quando analisado pelo MS.

Da Silva Carvalho & Rodrigues Perez, (2019) demonstraram que a formação de biofilme impacta a resistência da *P. aeruginosa* a POL B por interferir na penetração desse fármaco. Neste estudo, verificou-se que a associação entre POL B + AZT (tratamento 6) e MPM + POL B + AZT (tratamento 7) resultou na expressão da proteína RpoN (σ 54), proteína que está envolvida na ativação de diferentes mecanismos de virulência e resistência neste

microrganismo, também atuando na formação de biofilme e também regula a suscetibilidade de alguns antimicrobianos incluindo carbapenêmicos em *P. aeruginosa* (Viducic et al., 2007; Viducic et al., 2016; Viducic et al., 2017).

Além disso, até onde sabemos, este é o primeiro estudo que utiliza MS para análise proteômica de um isolado de CRPA, com o objetivo de compreender a tolerância deste microrganismo através da expressão e/ou supressão de proteínas. Essa plataforma de análise tem se tornado cada vez mais relevante na prática clínica, permitindo a caracterização fenotípica e uma análise dinâmica do comportamento dos microrganismos frente à terapia antimicrobiana (Greco et al., 2018).

Portanto, por meio de técnicas de fluorescência e MS, foi possível observar a indução da formação de biofilme a partir de um CRPA portadora da enzima KPC e a expressão de proteínas importantes para os mecanismos de virulência e resistência. Além disso, a associação dessas duas técnicas foi capaz de elucidar o mecanismo de tolerância dessa cepa de CRPA aos antimicrobianos.

5. CONCLUSÃO

O isolado clínico de CRPA JX05 portador dos genes QS e do *bla_{KPC}* produziu biofilme quando tratado com excesso de MPM, e a associação com AZT inibiu esse mecanismo de resistência. Além disso, o tratamento com MPM ou POL B inibiu a produção da enzima LT. Em contraste, a associação de POL B ou MPM com AZT, ou ambos, induziu a síntese da proteína RpoN. Esses dados mostram que é necessário levar em consideração o impacto da virulência bacteriana na escolha da melhor terapia para o tratamento das infecções, para evitar falhas terapêuticas e o aumento da resistência bacteriana. QDs e MALDI-TOF MS duas técnicas contrastantes foram aplicadas para avaliar a ação dos antimicrobianos em uma cepa de CPRA produtora de biofilme, acreditamos que novas pesquisas serão capazes de abordar

essas técnicas com potencial aplicação para avaliar o efeito de drogas na inibição da formação de biofilme de microrganismos com perspectivas de aplicabilidade na terapia contra biofilme de bactérias resistentes e virulentas.

DECLARAÇÃO DE CONTRIBUIÇÃO DO AUTOR

JLCL concebeu e projetou pesquisas, conduziu experimentos, analisou dados e redigiu o manuscrito. JNPP e BLR contribuíram com novos reagentes ou ferramentas analíticas. AF, PECF e RGLN contribuíram com novos reagentes ou ferramentas analíticas, analisaram os dados e redigiram o manuscrito. RMX analisou os dados e escreveu o manuscrito. MAVM concebeu e desenhou a pesquisa, analisou os dados e redigiu o manuscrito.

DIVULGAÇÃO

Os autores confirmam que não há conflito de interesses neste trabalho.

FINANCIAMENTO

O trabalho contou com o apoio de órgãos brasileiros: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação para a Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE). Este trabalho também está vinculado ao Instituto Nacional de Fotônica (INCT-INFo) e ao LARnano / UFPE.

Conflito de interesses: Todos os autores declaram não ter conflitos de interesse

“Este artigo não contém nenhum estudo com participantes humanos ou animais realizados por qualquer um dos autores.”

REFERÊNCIAS

Bateman, A. (2019). UniProt: A worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res*,

- 47(D1), D506–D515. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1049>
- Bowler, L. L., Zhanel, G. G., Ball, T. B., & Saward, L. L. (2012). Mature *Pseudomonas aeruginosa* biofilms prevail compared to young biofilms in the presence of ceftazidime. *Antimicrob. Agents Chemother*, 56(9), 4976–4979. <https://doi.org/10.1128/AAC.00650-12>
- Brackman, G., Cos, P., Maes, L., Nelis, H. J., & Coenye, T. (2011). Quorum sensing inhibitors increase the susceptibility of bacterial biofilms to antibiotics in vitro and in vivo. *Antimicrob. Agents Chemother*, 55(6), 2655–2661. <https://doi.org/10.1128/AAC.00045-11>
- Cabral Filho, P. E., Cardoso, A. L. C., Pereira, M. I. A., Ramos, A. P. M., Hallwas, F., Castro, M. M. C. A., Geraldes, C. F. G. C., Santos, B. S., Pedroso De Lima, M. C., Pereira, G. A. L., & Fontes, A. (2016). CdTe quantum dots as fluorescent probes to study transferrin receptors in glioblastoma cells. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 1860(1), 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.09.021>
- Cavallari, J. F., Lamers, R. P., Scheurwater, E. M., Matos, A. L., & Burrows, L. L. (2013). Changes to its peptidoglycan-remodeling enzyme repertoire modulate β -lactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother*, 57(7), 3078–3084. <https://doi.org/10.1128/AAC.00268-13>
- Cordeiro, R. de A., Serpa, R., Mendes, P. B. L., Evangelista, A. J. de J., Andrade, A. R. C., Franco, J. da S., Pereira, V. dos S., Alencar, L. P. de, Oliveira, J. S. de, Camargo, Z. P. de, Lima Neto, R. G. de, Castelo-Branco, D. de S. C. M., Brilhante, R. S. N., Rocha, M. F. G., & Sidrim, J. J. C. (2017). The HIV aspartyl protease inhibitor ritonavir impairs planktonic growth, biofilm formation and proteolytic activity in *Trichosporon* spp. *Biofouling*, 33(8), 640–650. <https://doi.org/10.1080/08927014.2017.1350947>
- Da Silva Carvalho, T., & Rodrigues Perez, L. R. (2019). Impact of biofilm production on polymyxin B susceptibility among *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 40(6), 739–740. <https://doi.org/10.1017/ice.2019.85>
- Dik, D. A., Marous, D. R., Fisher, J. F., & Mobashery, S. (2017). Lytic transglycosylases: concinnity in concision of the bacterial cell wall. *Crit. Rev. Biochem. Mol.*, 52(5), 503–542. <https://doi.org/10.1080/10409238.2017.1337705>
- Doi, Y. (2019). Treatment Options for Carbapenem-resistant Gram-negative Bacterial

- Infections. Clin. Infect. Dis., 69(Suppl 7), S565–S575. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz830>
- Galdiero, E., Siciliano, A., Maselli, V., Gesuele, R., Guida, M., Fulgione, D., Galdiero, S., Lombardi, L., & Falanga, A. (2016). An integrated study on antimicrobial activity and ecotoxicity of quantum dots and quantum dots coated with the antimicrobial peptide indolicidin. *Int J Nanomedicine* 11, 4199–4211. <https://doi.org/10.2147/IJN.S107752>
- Greco, V., Piras, C., Pieroni, L., Ronci, M., Putignani, L., Roncada, P., & Urbani, A. (2018). Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical proteomics. *Expert Rev Proteomics*, 15(8), 683–696. <https://doi.org/10.1080/14789450.2018.1505510>
- Horcajada, J. P., Montero, M., Oliver, A., Sorlí, L., Luque, S., Gómez-Zorrilla, S., Benito, N., & Grau, S. (2019). Epidemiology and treatment of multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Clin Microbiol Rev.* 32(4), 1–52. <https://doi.org/10.1128/CMR.00031-19>
- Iwaniak, A., Minkiewicz, P., Darewicz, M., Sieniawski, K., & Starowicz, P. (2016). BIOPEP database of sensory peptides and amino acids. *Food Res. Int.* 85, 155–161. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.04.031>
- Jacomé PRLA, Alves LR, Jacomé-Júnior AT, Silva MJB, Lima JLC, Araújo PSR, Lopes ACS, Maciel MAV. (2016). Detection of *bla_{SPM-1}*, *bla_{KPC}*, *bla_{TEM}* and *bla_{CTX-M}* genes in isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. and *Klebsiella* spp. from cancer patients with healthcare-associated infections. *J. Medic. Microbiol.* 5(7):658-665. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.000280>.
- Kamali, E., Jamali, A., Ardebili, A., Ezadi, F., & Mohebbi, A. (2020). Evaluation of antimicrobial resistance, biofilm forming potential, and the presence of biofilm-related genes among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Res. Notes* 13(1), 4–9. <https://doi.org/10.1186/s13104-020-4890-z>
- Kirmusaoğlu S, Yurdugül S. (2017). The effect of urinary catheters on microbial biofilms and catheter associated urinary tract infections. *Miscellaneous.* 14(02):3033. Kumar, P., Sharma, S. C., & Deep, A. (2014). Bioconjugation of anti estrogen alpha antibody with CdSSe/ZnS quantum dots for molecular sensing of a breast cancer antigen. *Sensor Actuat B-Chem* 202, 404–409. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.05.110>
- Lamers, R. P., Nguyen, U. T., Nguyen, Y., Buensuceso, R. N. C., & Burrows, L. L. (2015). Loss of membrane-bound lytic transglycosylases increases outer membrane permeability

- and β -lactam sensitivity in *Pseudomonas aeruginosa*. *MicrobiologyOpen*, 4(6), 879–895.
<https://doi.org/10.1002/mbo3.286>
- Li, P., Liu, S., Cao, W., Zhang, G., Yang, X., Gong, X., & Xing, X. (2020). Low-toxicity carbon quantum dots derived from gentamicin sulfate to combat antibiotic resistance and eradicate mature biofilms. *Chem. Commun.* 56(15), 2316–2319.
<https://doi.org/10.1039/c9cc09223d>
- Lima JLC, Alves LR, Paz JNP, Rabelo MA, Maciel MAV, Morais MMC. (2017) Analysis of biofilm production by clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with ventilator-Associated pneumonia. *Rev Bras Ter Intensiva*. 29(3):310–316.
<https://doi.org/10.5935/0103-507X.20170039>
- Lima, J. L. da C., Alves, L. R., Jacomé, P. R. L. de A., Bezerra Neto, J. P., Maciel, M. A. V., & Morais, M. M. C. de. (2018). Biofilm production by clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and structural changes in LasR protein of isolates non biofilm-producing. *Braz. J. Infect. Dis.* 22(2), 129–136. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2018.03.003>
- Lloyd, M. G., Vossler, J. L., Nomura, C. T., & Moffat, J. F. (2019). Blocking RpoN reduces virulence of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients and increases antibiotic sensitivity in a laboratory strain. *Sci. Rep.* 9(1), 1–10.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-43060-6>
- Lloyd, Megan G., Lundgren, B. R., Hall, C. W., Gagnon, L. B. P., Mah, T. F., Moffat, J. F., & Nomura, C. T. (2017). Targeting the alternative sigma factor RpoN to combat virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci. Rep.* 7(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12667-y>
- Luo, Z., Wu, Q., Zhang, M., Li, P., & Ding, Y. (2011). Cooperative antimicrobial activity of CdTe quantum dots with rocephin and fluorescence monitoring for *Escherichia coli*. *J. Colloid Interface Sci.* 362(1), 100–106. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.06.039>
- Maurice, N. M., Bedi, B., & Sadikot, R. T. (2018). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: Host response and clinical implications in lung infections. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 58(4), 428–439. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2017-0321TR>
- Montero, M. M., Domene Ochoa, S., López-Causapé, C., VanScoy, B., Luque, S., Sorlí, L., Campillo, N., Padilla, E., Prim, N., Segura, C., Pomar, V., Rivera, A., Grau, S., Ambrose, P. G., Oliver, A., & Horcajada, J. P. (2019). Colistin plus meropenem

- combination is synergistic in vitro against extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, including high-risk clones. J Glob Antimicrob Resist .18, 37–44.
<https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.04.012>
- Niedermeyer, T. H. J., & Strohm, M. (2012). mMass as a Software Tool for the Annotation of Cyclic Peptide Tandem Mass Spectra. PLoS ONE, 7(9).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044913>
- Olivares, E., Badel-Berchoux, S., Provot, C., Prévost, G., Bernardi, T., & Jehl, F. (2020). Clinical Impact of Antibiotics for the Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Infections. Front. Microbiol. 10(January), 1–12.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02894>
- Pérez-Llarena, F. J., & Bou, G. (2016). Proteomics as a tool for studying bacterial virulence and antimicrobial resistance. Front. Microbiol. 7(MAR), 1–21.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00410>
- Perez LRR, Machado ABMP, Barth AL. The Presence of Quorum-Sensing Genes in *Pseudomonas* isolates Infecting Cystic Fibrosis and Non-cystic Fibrosis Patients. Curr Microbiol. 2013;66(4):418–420. <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0290-5>
- Roberto, A. E. M., Xavier, D. E., Vidal, E. E., Vidal, C. F. de L., Neves, R. P., & de Lima-Neto, R. G. (2020). Rapid detection of echinocandins resistance by MALDI-TOF MS in *Candida parapsilosis* complex. Microorganisms, 8(1), 1–13.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8010109>
- Scavuzzi AML, Beltrão EMB, Firmo EF, Oliveira ÉM, Beserra FG, Lopes ACS. (2019). Emergence of *bla*_{VIM-2}, *bla*_{NDM-1}, *bla*_{IMP-7} and *bla*_{GES-1} in *bla*_{KPC-2} harbouring *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Brazil. J Glob Antimicrob Resist 19, p.181-182, dez. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jgar.2019.09.009>.
- Silva Júnior, V. V., Raposo, B. L., Lopes, A. C. S., Araújo, P. S. R., Fontes, A., Cabral Filho, P. E., & Maciel, M. A. V. (2020). Activity of carbonyl cyanide-3-chlorophenylhydrazone on biofilm formation and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* using quantum dots-meropenem conjugates as nanotools. Methods Appl. Fluoresc. 0–6. <https://doi.org/10.1088/2050-6120/aba7a2>
- Song, X., Wu, Y., Cao, L., Yao, D., & Long, M. (2019). Is Meropenem as a Monotherapy Truly Incompetent for Meropenem-Nonsusceptible Bacterial Strains? A

- Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Modeling With Monte Carlo Simulation. *Front. Microbiol.* 10(November), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02777>
- Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J J Microbiol Methods.* 115(8):891–899. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00122-6](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00122-6)
- Strohalm, M., Kavan, D., Novák, P., Volný, M., & Havlíček, V. (2010). MMass 3: A cross-platform software environment for precise analysis of mass spectrometric data. *Anal. Chem.* 82(11), 4648–4651. <https://doi.org/10.1021/ac100818g>
- Viducic D, Ono T, Murakami K, Katakami M, Susilowati H, Miyake Y. (2007). RpoN gene of *Pseudomonas aeruginosa* alters its susceptibility to quinolones and carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother* 51:1455–1462. <https://doi.org/10.1128/AAC.00348-06>
- Viducic, D., Murakami, K., Amoh, T., Ono, T., & Miyake, Y. (2016). RpoN modulates carbapenem tolerance in *Pseudomonas aeruginosa* through *Pseudomonas* quinolone signal and PqsE. *Antimicrob Agents Chemother* 60(10), 5752–5764. <https://doi.org/10.1128/AAC.00260-16>
- Viducic, D., Murakami, K., Amoh, T., Ono, T., & Miyake, Y. (2017). RpoN promotes *Pseudomonas aeruginosa* survival in the presence of tobramycin. *Front. Microbiol.* 8(MAY), 839. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00839>
- Wu, H., Moser, C., Wang, H. Z., Høiby, N., & Song, Z. J. (2015). Strategies for combating bacterial biofilm infections. *Int. J. Oral Sci.* 7(July 2014), 1–7. <https://doi.org/10.1038/ijos.2014.65>
- Xu, Z. G., Gao, Y., He, J. G., Xu, W. F., Jiang, M., & Jin, H. S. (2015). Effects of azithromycin on *Pseudomonas aeruginosa* isolates from catheter-associated urinary tract infection. *Exp. Ther. Med.* 9(2), 569–572. <https://doi.org/10.3892/etm.2014.2120>
- Yamano, Y., Nishikawa, T., & Komatsu, Y. (1998). Involvement of the RpoN protein in the transcription of the oprE gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* 162(1), 31–37. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(98\)00098-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(98)00098-6)

5.3 ARTIGO 3 - PANGENOMA ANALYSIS OF TWO CLINICAL ISOLATES OF CARBAPENEM-RESISTANT PSEUDOMONAS AERUGINOSA HARBORING THE *BLA_{KPC}* GENE

Artigo submetido à revista MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Qualis A2

Jailton Lobo da Costa Lima¹; Ana Vitória Araújo Lima¹; Maria Betânia Melo de Oliveira¹;
João Pacifico Bezerra-Neto¹; Wilson José da Silva Junior¹; Melise Chaves Silveira²; Ana
Paula D’Alincourt Carvalho-Assef²; Rafael Matos Ximenes¹; Maria Amélia Vieira Maciel¹

1 - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

2 - Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar, Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Corresponding author: Jailton Lobo da Costa Lima

Email address: jailtonlobo@hotmail.com

Address: Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE - CEP: 50670-901

RESUMO

A ocorrência de *Pseudomonas aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos (CRPA) tornou-se um sério problema de saúde pública em todo o mundo, pois reduz as opções terapêuticas contra esse microrganismo. O sequenciamento genômico dos isolados foi realizado usando a plataforma Illumina MiSeq. A montagem foi realizada usando o pipeline A5-miseq, e a predição do gene foi determinada usando os pipelines RAST e Prokka. A análise de MLST foi conduzida usando a ferramenta do site <http://www.genomicpidemiology.org/>. A análise genômica mostrou a presença de um genoma maior no isolado JX03, apresentando 6.136.978 bp, enquanto o isolado JX05 teve um genoma com 5.607.393 bp. O resistoma revelou que os isolados abrigavam o gene *bla_{KPC}* em um pequeno contig associado com ISKpn6, e ambos tinham genes relacionados à bomba de efluxo, mutações no gene *gyrA*, genes de porina e enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AMEs). A análise de MLST revelou que o isolado JX03 pertence ao tipo clonal ST244, enquanto o JX05 pertence ao ST277, clone epidêmico brasileiro. Aqui nós descrevemos o primeiro relato de um isolado pertencente ao clone ST277 portador do gene *bla_{KPC}* sem apresentar o gene *bla_{SPM-1}*. Esses achados demonstram o surgimento do gene *bla_{KPC}* no país como um dos principais mecanismos de resistência aos carbapenêmicos.

Palavras-chave: *P. aeruginosa* ST277; *P. aeruginosa* ST244; Clone; Sequenciamento

1. Introdução

A ocorrência de *Pseudomonas aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos (CRPA) tornou-se um grave problema de saúde, principalmente em pacientes imunocomprometidos e / ou com doenças de base, o que é agravado pela redução das opções terapêuticas frente a essa resistência. Por essa razão, estudos fenotípicos e moleculares para avaliação dos mecanismos presentes nas cepas de CRPA tornam necessária a escolha de uma terapia adequada e racional (1, 2).

Entre os principais mecanismos associados a falhas no tratamento de cepas de CRPA, está a produção das enzimas β -lactamases, das quais podemos destacar a produção da enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), uma serina carbapenemase, classe molecular A de Ambler. Esta enzima é codificada pelo gene *bla_{KPC}*, sendo o mesmo mobilizado através do transposon Tn4401, pertencente à família Tn3 (Cuzon 2011), há vários relatos de KPC-2 em *P. aeruginosa* no mundo (3-9), com o primeiro relato dessa enzima neste microrganismo ocorrendo em 2006 na Colômbia (2), enquanto no Brasil a primeira descrição ocorreu em 2010 (6).

A disseminação do gene *bla_{KPC}* ocorre a partir de plasmídeos, o que indica que houve transferência genética entre enterobacteriales e bacilos não fermentadores, embora esse mecanismo não seja totalmente compreendido (2). Uma enzima KPC tem alto poder de degradação dos antibióticos β -lactâmicos, incluindo os carbapenêmicos, o que reduz as opções terapêuticas frente a esse microrganismo (3).

No Brasil, as enzimas mais prevalentes no CRPA são as metalo- β -lactamases (M β LS), sendo a metalo- β -lactamase de São Paulo (SPM-1) a mais prevalente neste microrganismo, cuja disseminação está relacionada ao clone endêmico de *P. aeruginosa* ST277, embora também haja relatos da ocorrência de outros M β LS, IMP (imipenemase), VIM (Verona

metalo- β -lactamase) e NDM (Nova Delhi metalo- β -lactamase) (10). Existem poucos relatos sobre a disseminação da enzima SPM-1 fora do Brasil, mas em todos os casos o paciente adquiriu infecção no país (1,4). Halat et al 2020 apontam para um comportamento esporádico da enzima SPM-1 no país, o que favorece a disseminação de outros mecanismos de resistência (10).

Em termos genômicos, *P. aeruginosa* apresenta variação de tamanho em seu genoma entre 5,5 e 7 Mbp, principalmente devido à presença de um grande genoma acessório, que pode ocupar até 20% do tamanho total do genoma (8). Este genoma acessório pode incluir elementos transferidos horizontalmente, transposons, ilhas genômicas, inserção de sequência e plasmídeos (9). É importante por conter genes de virulência ou que conferem resistência a antibióticos, com transferência lateral desses genes entre cepas, sendo responsáveis pela emergência de cepas MDR, bem como por processos mutacionais (11). Assim, revelar o conteúdo genético de *P. aeruginosa* auxilia no entendimento de modificações gênicas que levam a cepas mais patogênicas e resistentes, obtidas a partir de comparações genômicas entre diferentes cepas obtidas em infecções (10,11).

O objetivo deste estudo foi comparar geneticamente cepas de *P. aeruginosa* de isolados clínicos de CRPA produtores do gene *bla_{KPC}* a partir do sequenciamento de seu genoma completo, a fim de analisar o tipo de clone desses isolados, relações evolutivas e identificação de fatores de virulência e patogenicidade avaliando sua resistoma.

2. Material e Métodos

2.1 Coleta e processamento de amostra

Apresentamos aqui o sequenciamento do genoma de dois isolados clínicos de *P. aeruginosa* produtores de KPC-2, *P. aeruginosa* (JX03 e JX05), ambos isolados de pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) em agosto e setembro de 2016, respectivamente. Os isolados foram obtidos de amostras de secreção traqueal com contagens

de colônias acima de 1.000.000 UFC / mL. As cepas de pacientes internados em um hospital terciário de Pernambuco, Nordeste do Brasil, foram depositadas na Coleção de Culturas do Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular da Universidade Federal de Pernambuco. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil (CEP: 1.480.085).

2.2 Identificação e teste de sensibilidade antimicrobiana (TSA)

Os isolados analisados neste estudo foram identificadas e tiveram testes de sensibilidade antimicrobiana (TSA) avaliados pelo sistema automatizado BD Phoenix TM, e a tobramicina foi realizada por meio de microdiluição em caldo TSB (CLSI, 2016). Seis cepas de *P. aeruginosa* CRPA foram incluídas no estudo. Os isolados foram armazenados a -20 °C no Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular da Universidade Federal de Pernambuco. Os isolados congelados foram reativados em caldo BHI (infusão de coração e cérebro) e incubados por 24 h a 37 °C, sendo então semeados com ágar cetrimida para avaliação da pureza da cultura e incubados por 24 h a 37 °C. Esses microrganismos foram provenientes de amostras de secreção traqueal, sangue e urina.

2.3 Extração e quantificação de DNA

Foi realizada a extração do DNA total dos seis isolados de CRPA. A extração foi feita utilizando o kit de extração de DNA Brazol (LGC Biotecnologia) de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante, e a dosagem do DNA foi realizada por espectrofotometria (Ultraspec 3000; Pharmacia Biotech) no comprimento de onda 260–280 nm.

2.4 Detecção dos genes de MβL (*bla*_{SPM-1}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}) e o *bla*_{KPC}

Visando elucidar o mecanismo de resistência aos β-lactâmicos nas cepas pesquisadas, foi realizada a pesquisa dos genes das MβLs e o *bla*_{KPC} utilizando primers específicos, tabela 1 (YIGIT et al., 2001; GALES et al., 2003; DONG et al., 2008). Para cada reação de PCR, foi adicionado um controle negativo, consistindo de componentes da reação sem adição de DNA, e cepas de controle positivo para os genes: *bla*_{SPM-1} (*P. aeruginosa* 48- 1997A), *bla*_{IMP} (*P. aeruginosa* PSA319) e *bla*_{VIM} (*P. aeruginosa* VIM-1) fornecidas pelo Laboratório Alerta da

Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) e o *bla_{KPC}* (*P. aeruginosa* P22A) oriunda da coleção de cultura do Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular, Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco.

2.4 Sequenciamento genômico

O DNA genômico de dois isolados clínicos de CRPA portadores do gene *bla_{KPC}* selecionados aleatoriamente foram sequenciados usando a plataforma de sequenciamento Illumina MiSeq (Illumina Inc., EUA). O DNA foi extraído usando um kit Wizard1 Genomic DNA Purification (Promega, França) e a qualidade do DNA foi verificada por Qubit1. Uma biblioteca genômica foi construída por marcação de transposon do Nextera XT DNA Sample Prep Kit (Illumina Inc.) e foi sequenciada com o kit MiSeq Reagent v.2 de 500 ciclos, que produziu 1311304 e 1141794 leituras finais emparelhadas para a amostra JX03 e JX05, respectivamente. Os genomas completos dos dois isolados foram depositados no GenBank com os respectivos códigos de acesso: SUB6647998 (isolado JX03) e SUB6648309 (isolado JX05), BioProject ID: PRJNA593977.

2.5 Montagem do genoma

Para a montagem dos genomas, a qualidade das leituras brutas foi avaliada por Fastqc, que mostrou vestígios de adaptadores nextera, que foram removidos pelo programa cutadapt. Para filtrar as leituras, o Sickle foi usado com sinalizadores de corte: qualidade > 20 (valor phred) e comprimento 20 bp. Consequentemente, as leituras filtradas foram usadas para montagem no pipeline Unicycler e os resultados das montagens foram avaliados pela Quast, usando a cepa GCA_003204235.1 como referência.

2.6 Análise genômica

Os genomas foram montados usando o pipeline A5-miseq (COIL, JOSPIN & DARLING 2014), a predição e anotação dos genes foram realizadas usando RAPid Annotation usando System Technology (RAST) v.2.0 (<http://rast.nmpdr.org>) e curadoria manual usando Geneious (<https://www.geneious.com>) e BLASTN (ALTSCHUL et al., 1990).

2.7 Pan-genoma

A análise dos pan-genomas das cepas foi realizada com o Roary v3.13.0 (PAGE et al. 2015). Os arquivos .gff usados como entrada foram baixados do RefSeq / NCBI, e obtidos dos arquivos .gbk que foram então convertidos, para os genomas sequenciados para este estudo, foram usados os arquivos .gff produzidos pela PROKKA. Além disso, foi utilizado um ponto de corte de identidade de 95%. Os ortólogos resultantes foram classificados como genes centrais, softcore, shell e nuvem de acordo com a configuração padrão do software. Os genes principais foram alinhados automaticamente com MAFFT v. 7.310 (KATO & STANDLEY, 2013) usando o parâmetro `-e --mafft` em Roary, criando um alinhamento multi-FASTA das sequências de nucleotídeos de todos os genes principais. Este arquivo foi usado como entrada para criar uma árvore filogenética pela inferência de máxima verossimilhança pelo software IQ-TREE (versão 2.0.4) (NGUYEN et al. 2015), em um computador local, usando a seleção automática do modelo de substituição de nucleotídeo em ModelFinder para selecionar o modelo de substituição de DNA mais adequado (KALYANAMOORTHY et al. 2017). O suporte do nó foi avaliado com uma inicialização ultrarrápida (MINH et al. 2013) usando 100.000 réplicas. A árvore de máxima verossimilhança foi visualizada usando FigTree v1.4.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) (RAMBAUT, 2009). Além disso, a filogenia também foi realizada com base na matriz presença-ausência de genes usando o IQ-TREE com a mesma configuração de auto-inicialização. Os dados foram binarizados quanto aos critérios de presença e ausência, convertidos para o formato fasta e posteriormente utilizados como entrada no software iqtree, onde foram realizadas análises filogenéticas, foram utilizadas 10.000 repetições (bootstrap).

2.8 Multilocus sequence typing (MLST)

A análise de MLST foi realizada analisando sete *housekeeping* genes (*acsA*, *aroE*, *guaA*, *mutL*, *nuoD*, *ppsA* e *trpE*) conforme descrito por Curran et al., (2004). Sequências alélicas e tipos de sequência (ST) foram identificados a partir do sequenciamento do genoma total usando a ferramenta MLST em <http://www.genomicepidemiology.org/> (LARSEN et al., 2012).

2.9 Predição de genes de resistência

A previsão da ocorrência de genes de resistência antimicrobiana foi realizada usando ResFinder 2.1 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder>), software Prokka (<https://github.com/tseemann/prokka>) (16) e Patric 3.5.43 (<https://patricbrc.org>). Após a montagem e previsão dos dados, o gene *bla_{KPC}* não foi encontrado na amostra JX03. Para confirmar a presença ou ausência desta sequência em nossos dados, uma anotação (cut-off <e-05) usando blast com dados de sequenciamento bruto contra todos os genes *bla_{KPC}* depositados no NCBI foi realizada.

3. Resultados

3.1 Teste de susceptibilidade antimicrobiana (TSA)

O TSA demonstrou que os dois isolados clínicos de *P. aeruginosa* apresentaram alta resistência antimicrobiana, sendo suscetíveis apenas à polimixina B, portanto, foram classificados como XDR, conforme tabela 1.

Tabela 1: Descrição do perfil de susceptibilidade antimicrobiana de *P. aeruginosa*

Antimicrobianos / isolados	JX03	JX05
Perfil de Suscetibilidade	XDR	XDR
Amicacina	>32 – R	<=8 – S
Gentamicina	>8 – R	>8 – R
Tobramicina	8 – R	16 – R
Cefepime	8 – S	>16 – R
Ceftazidima	16 – I	>16 – R
Imipenem	>8 – R	>8 – R
Meropenem	>8 – R	>8 – R
Piperacilina-Tazobactam	32/4 - I	64/4 – R
Ciprofloxacino	>2 – R	>2 – R
Levofloxacino	>4 – R	>4 – R
Aztreonam	16 – I	>16 – R
Polimixina B	0,75 – S	0,75 – S

R - Resistente, I – Intermediário, S – Sensível

3.2 Detecção dos genes de MβL (*bla_{SPM-1}*, *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*) e *bla_{KPC}*

Os isolados não albergavam os genes MβL pesquisados, mas ambos foram positivos para a presença do gene *bla_{KPC}* o que pode explicar a alta resistência aos antibióticos β-lactâmicos.

3.3 Montagem Genômica

A montagem do genoma apresentou fragmentação, resultando em um elevado número de contigs, porém a quantidade de genes conservados encontrados pelo BUSCO de 90% é um fator importante para a qualidade da montagem. 6.884 e 6.543 foram previstos pelo GeneMark, implementado na rotina Quast, para as cepas JX03 e JX05, respectivamente, tabela 2.

Tabela 2. Montagem Genômica

	Montagem	JX03	JX05
	# Contigs	1589	1697
	Maior contig	40995	38746
	Comprimento total	6136978	5607393
	Comprimento de referência	6758099	6758099
	GC (%)	65.77	65.39
	Referência GC (%)	66.15	66.15
	N50	5307	4209
	Fração do genoma (%)	78.650	78.933
	# N's por 100 kbp	0.00	0.00
	Busco completo (%)	90.54	87.16
	Busco parcial (%)	4.05	4.05
	# GENES PREVISTOS (ÚNICOS)	6884	6543

3.4 Multilocus *in silico* sequence typing (MLST)

A análise de MLST revelou que o isolado JX03 pertence ao tipo clonal ST244, enquanto o JX05 pertence ao ST277, clone epidêmico brasileiro.

3.5. Pangenoma As análises do genoma central e do pangenoma foram realizadas para 40 isolados clínicos de *P. aeruginosa* ST277, disponíveis no BLAST, para avaliar a proximidade genômica entre estes isolados e as cepas deste estudo, principalmente *p. aeruginosa* JX05 que pertence ao mesmo clone.

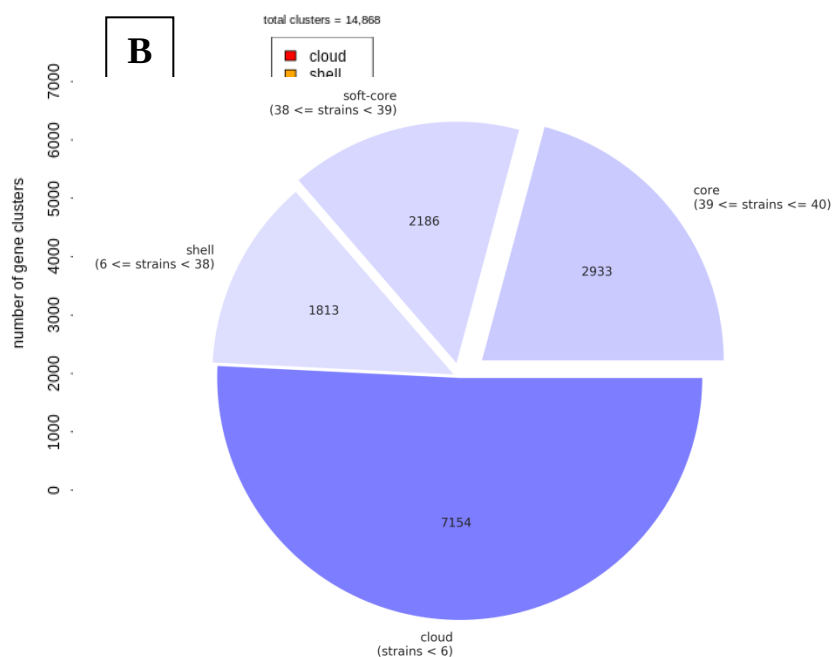
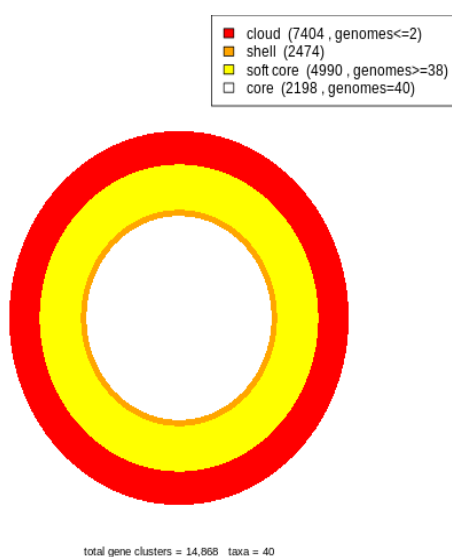


Figura 1. Partição da matriz pangenômica em compartimentos de concha, nuvem, núcleo macio e núcleo (A, B e C).

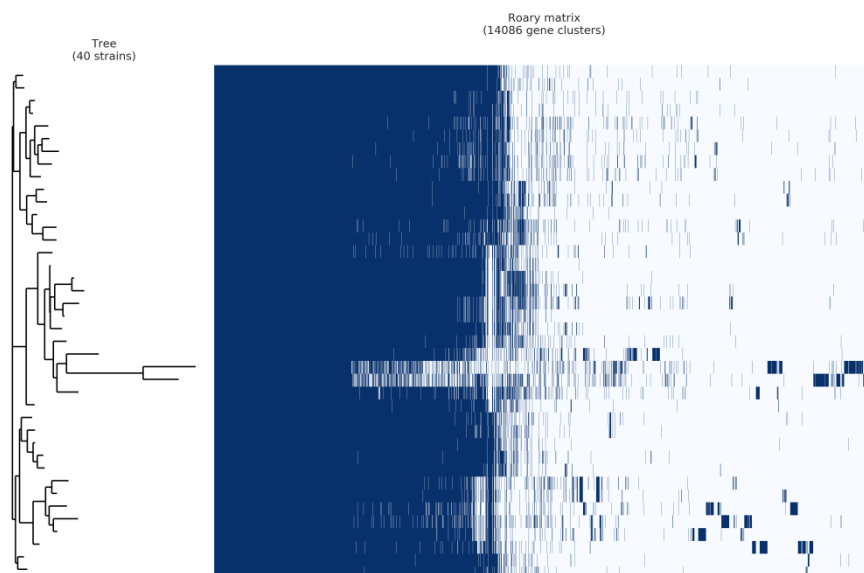


Figura 2. O mapa de calor descreve a combinação de genes acessórios individuais que são expressos pelos 40 isolados clínicos. O dendrograma é uma visualização da distância entre os isolados com base na composição do gene acessório.

3.6 Análise genômica e previsão de genes de resistência

A análise genômica RAST v.2.0 demonstrou a presença de um genoma maior no isolado JX03, apresentando 6.136.978 bp, enquanto o isolado JX05 teve um genoma com 5.607.393 bp. O resistoma revelou que ambos os isolados abrigavam os genes *bla*KPC em um pequeno contig associado ao ISKpn6, uma série de genes relacionados à bomba de efluxo, bem como mutações no gene *gyrA* relacionadas à resistência às quinolonas, genes da porina, especialmente OprD, que também está associado com resistência a carbapenêmicos e genes de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AMEs), como pode ser visto na Tabela 3. O gene *bla*KPC associado ao isolado JX03 não foi encontrado em nosso conjunto, mas foi isolado

na análise molecular. Após o alinhamento local usando leituras brutas deste isolado, encontramos 34 fastq relacionados ao gene *bla_{KPC}* (Tabela 1 complementar), apresentando 100 a 88% de similaridade. Essas leituras foram montadas em um contig (665 bp), apresentando alta similaridade (90%) com beta-lactamase KPC-2 (plasmídeo) de *Klebsiella pneumoniae* (QKT89956.1), reforçando a presença deste gene em nossos dados sequenciados.

Strains	Acession	Country	Year	Source	<i>bla</i> _{KPC}	<i>bla</i> _{SPM-1}	OXA-50	PDC-5	rmtD	AAC(6')-IIc	APH(3')-IIb	oprD	pmrA	gyrA
WH-SGI-V-07484	NZ_LLQP00000000	USA	2005	NA	-	Yes	Yes	yes	yes	-	yes	D378,379	L71R	T83I, D87N
WH-SGI-V-07635	NZ_LLRG00000000	USA	2005	NA	-	-	Yes	yes	yes	yes	yes	D378,379	L71R	T83I
WH-SGI-V-07643	NZ_LLRO00000000	USA	2005	NA	-	-	yes	yes	yes	yes	yes	D378,379	L71R	T83I
PA1088	CP015001.1	Brazil	1997	Urine	-	Yes	yes	yes	yes	-	yes	D378,379	L71R	T83I
PA11803	CP015003.1	Brazil	2011	bloodstream	-	Yes	yes	yes	yes	-	yes	D378,379	L71R	T83I
PA12117	NZ_LVXB00000000	Brazil	2012	bloodstream	-	Yes	yes	yes	yes	-	yes	D378,379	L71R	T83I
PA3448	NZ_LVWC00000000	Brazil	2003	bloodstream	-	Yes	yes	yes	-	-	yes	D378,379	L71R	T83I
PA7790	CP014999.1	Brazil	2006	tracheal aspirate	-	Yes	yes	yes	-	-	yes	D378,379	L71R	T83I
PA8281	CP015002.1	Brazil	2007	tracheal aspirate	-	Yes	yes	yes	-	-	yes	D378,379	L71R	T83I
AR_0064	NZ_MPBU00000000	NA	NA	NA	-	Yes	yes	yes	-	-	yes	D378,379	L71R	T83I
PA19	PHST01000000	Brazil	2010	River	-	Yes	yes	yes	-	yes	yes	D378,379	L71R	T83I
LIM4308	NZ_QJOX00000000	Brazil	2015	Bloodstream infection	-	Yes	yes	yes	yes	yes	yes	D378,379	L71R	T83I, D87N
LIM1166	NZ_QJOZ00000000	Brazil	2012	Bloodstream infection	-	Yes	yes	yes	-	yes	yes	D378,379	L71R	T83I
LIM1136	NZ_QJPA00000000	Brazil	2012	Bloodstream infection	-	yes	yes	yes	yes	yes	yes	D378,379	L71R	T83I, D87N
LIM4519	NZ_QJPC00000000	Brazil	2016	Bloodstream infection	-	yes	yes	yes	yes	yes	yes	D378,379	L71R	T83I, D87N
LIM1256	NZ_QJPD00000000	Brazil	2012	Bloodstream infection	-	yes	yes	yes	-	yes	yes	D378,379	L71R	T83I
LIM1595	NZ_QJPF00000000	Brazil	2012	Bloodstream infection	-	yes	yes	yes	yes	yes	yes	D378,379	L71R	T83I, D87N
LIM1209	NZ_QJPG00000000	Brazil	2012	Bloodstream infection	-	-	yes	yes	-	yes	yes	D378,379	L71R	T83I, D87N
NCTC13921	NZ_UAUD00000000	United Kingdom	2013	Throat	-	-	yes	yes	yes	-	yes	D378,379	L71R	T83I
PA151	NZ_PHSS00000000	Brazil	2011	river	-	yes	yes	yes	yes	yes	yes	D378,379	L71R	T83I
BWHPSA041	AZZM01000000	USA	2013	Bronchoalveolar lavage	-	-	yes	yes	-	-	yes	-	L71R	T83I
829	NZ_NIPE00000000	USA	2008	NA	-	-	yes	yes	-	-	yes	-	L71R	T83I
Pa1242	CP022002.1	Mexico	2014	Blood	-	-	yes	yes	-	-	yes	-	L71R	-
WCHPA075019	CP028584.1	China	2017	Human	-	-	yes	yes	-	-	yes	-	L71R	-
CCBH276*	SRPL00000000	Brazil	2004	Human	-	-	yes	yes	-	yes	yes	D378,379	L71R	T83I
CCBH3462*	SRPM00000000	Brazil	2007	Human	-	yes	yes	yes	-	yes	yes	D378,379	L71R	T83I
CCBH4850*	SEMF00000000	Brazil	2008	Urine	-	yes	yes	yes	yes	yes	yes	D378,379	L71R	T83I

CCBH5698*	SELC00000000	Brazil	2010	Secretion swab	-	yes	yes	yes	yes	yes	yes	D378,379	L71R	T83I
CCBH5939*	SEME00000000	Brazil	2010	Urine	-	-	yes	yes	yes	yes	yes	D378,379	L71R	T83I
CCBH18249*	SELB00000000	Brazil	2015	Urine	-	yes	yes	yes	yes	yes	yes	D378,379	L71R	T83I
21BR	NSNX01000009.1	Brazil	2003	NA	-	-	yes	yes	-	yes	yes	D378,379	L71R	T83I
205BR	NSNZ00000000.1	Brazil	2003	NA	-	yes	yes	yes	-	yes	yes	D378,379	L71R	T83I
36BR	NSNW00000000.1	Brazil	2003	NA	-	-	yes	yes	yes	yes	yes	D378,379	L71R	T83I
175BR	NSOB00000000.1	Brazil	2003	NA	-	-	yes	yes	yes	-	yes	D378,379	L71R	T83I
W15Dec4	RXCS00000000.1	Belgium	2001	NA	-	-	-	yes	-	-	yes	-	L71R	-
T3044	RXCD00000000.1	Thailand	2013	Nasal mucosa	-	-	-	yes	-	-	yes	-	L71R	-
PA298	CP040127.1	China	2018	Human gut	-	-	-	yes	-	-	yes	-	L71R	T83I
JX03		Brazil	2016	Tracheal aspirate	yes*	-	yes	yes	-	-	yes	NA	L71R	T83I
JX05		Brazil	2016	Tracheal aspirate	yes	-	yes	yes	-	yes	-	NA	L71R	T83I

NA: uninformed; - : Absent

Table 3. Resistome of *P. aeruginosa* JX03 and JX05. (*) Resistance gene found on raw data but not in assembly.

4. Discussão

Neste artigo, descrevemos o genoma total de dois isolados clínicos de *P. aeruginosa* pertencentes a ST244 e ST277. Ressalta-se que neste estudo foi possível detectar a perda do gene *bla_{SPM-1}* pelo clone endêmico brasileiro ST277, uma vez que em relatos de descrição desse clone no Brasil e no exterior ele é responsável pela disseminação do gene *bla_{SPM-1}*.

Em contrapartida, este é o primeiro estudo em que o clone ST277 apresenta a coprodução dos genes *bla_{KPC}*, *bla_{OXA-50}* e *bla_{OXA-56}*, todos associados à resistência a antibióticos β -lactâmicos, bem como genes de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AMEs) (*AAC (6') - Ib7*, *APH (3') - IIb* e *aadA7*) e mutações no gene *gyrA*, sem a presença do gene *bla_{SPM-1}*.

Em estudos realizados no Brasil e em outros países onde foi encontrado o clone ST277 de *P. aeruginosa*, o gene *bla_{SPM-1}* sempre foi detectado, diferindo deste trabalho, exceto Chaves et al., (21), em estudo no estado de São Paulo com pacientes que receberam transplante de medula óssea e desenvolveram infecção na corrente sanguínea detectaram três isolados pertencentes ao clone ST277, sendo que em duas dessas cepas foi detectada a presença do gene *bla_{SPM-1}* e uma delas não abrigava o gene, semelhante ao nosso estudo, embora em nosso estudo o isolado do clone ST277 não tivesse o gene *bla_{SPM-1}*, mas abrigasse o gene *bla_{KPC}*.

No estudo de Chaves et al., (21), também foi detectado um surto de isolados de CRPA portadores do gene *bla_{KPC}*, mas pertencentes a outro clone. Esses achados são semelhantes aos nossos dados, diferindo do nosso trabalho apenas porque a resistência aos carbapenêmicos em nosso estudo está associada à presença do gene *bla_{KPC}* enquanto no estudo de Chaves et al., (21), a resistência está associada a mutações nos genes da porina.

Galetti, et. al., (2), descreveram o resistoma de um isolado clínico de *P. aeruginosa* pertencente ao clone ST277 possuindo o gene *bla_{SPM-1}*, além das enzimas OXA-56 e OXA-50, AMEs entre outros genes de resistência, dados semelhantes a este estudo em que os isolados também apresentaram genes OXAs e AMEs, diferindo do nosso isolado pela ausência do gene *bla_{SPM-1}*. Turano, et. al., (22), descreveram a presença de *P. aeruginosa* pertencente ao clone ST277 portador do gene *bla_{SPM-1}* em amostras de rios urbanos de São Paulo, demonstrando a capacidade desses isolados de se espalharem no meio ambiente, daí a importância de inclusão linhagens ambientais do gênero *Pseudomonas* na árvore filogenética, uma vez que o ambiente pode ser a fonte da infecção. Nascimento, et. al., (23), demonstraram a detecção de *P. aeruginosa* pertencente ao clone ST277 portador do gene *bla_{SPM-1}* em seis isolados clínicos de São Paulo, diferindo assim dos achados deste estudo.

Cacci, et. al., (24), analisaram 472 ambientes de UTI e isolados clínicos em um hospital do Rio de Janeiro e detectaram a presença de apenas um isolado de *P. aeruginosa* pertencente ao clone ST277 contendo o gene *bla_{SPM-1}* em uma amostra do ambiente de UTI e encontraram alguns isolados de *P. aeruginosa* pertencente ao clone ST244 em isolados clínicos e de UTI com alto perfil de resistência, dados semelhantes ao encontrado neste estudo.

Diferentes estudos realizados na cidade de Recife-PE, Brasil, ao longo dos anos mostram que a circulação do gene *bla_{SPM-1}* diminuiu nesta região, variando a ocorrência de acordo com os diversos setores do hospital. Cavalcanti et al., (25), analisando isolados clínicos de CRPA de dois períodos distintos, constataram que em 2002/2003 houve prevalência de um clone disseminando o gene *bla_{SPM-1}*, enquanto isolados coletados entre 2008/2009 apresentaram redução nesta presença do gene, sugerindo a ocorrência de outro mecanismo de mediação da resistência ao carbapenem nesses isolados. Jacomé et al., (5), demonstraram a ocorrência do gene *bla_{SPM-1}* em 17,4% (6/29) de isolados de CRPA em um

hospital terciário de Recife-PE, enquanto em 2016, Jacomé et al., (3), analisando a presença de genes de resistência carbapenêmica em 31 isolados clínicos de CRPA de pacientes de um hospital oncológico de Recife-PE, detectou-se a presença do gene *bla_{SPM-1}* em 35,5% (11/31) e 25,8%. (8/31) isolados possuíam o gene *bla_{KPC}*, o que demonstra que esse mecanismo se espalhou entre os isolados de CRPA nesta região. Silva Júnior et al., (26), analisando 100 isolados de CRPA na mesma região, não detectaram a presença dos genes *bla_{SPM-1}* e *bla_{KPC}* em nenhum dos isolados analisados, sendo encontrados apenas dois isolados portadores do gene *bla_{GES}*. Scavuzzi et al., (7), analisando a presença de carbapenemases em 14 isolados clínicos de *P. aeruginosa*, o gene *bla_{SPM-1}* não foi detectado mas a ocorrência do *bla_{NDM}*, e *bla_{KPC}* foi de 14% (2/14), 36% (5/14) *bla_{VIM}*, 7% (1/14) *bla_{IMP-7}* e *bla_{GES}*. Esses resultados em cepas de CRPA nesta região do Brasil estão em desacordo com outros centros hospitalares no Sudeste do Brasil (2, 21) onde a ocorrência do gene *bla_{SPM-1}* é mais frequente.

O clone endêmico de *P. aeruginosa* ST277 está praticamente restrito ao Brasil, vários estudos demonstram a disseminação desse clone no país (2, 21, 22, 23). Em 2016, Hopkins et. al., (1), descreveu o caso de um paciente na Inglaterra infectado com *P. aeruginosa* pertencente ao clone ST277 contendo o gene *bla_{SPM-1}*. Ao analisar o histórico hospitalar dessa paciente, foi possível verificar a aquisição desse microrganismo em internações anteriores no Brasil.

Em relação ao clone ST244 de *P. aeruginosa* no Irã, Van Burgh et al., (27), demonstraram a disseminação de diferentes genes de resistência: *bla_{OXA-10}*, *tetA*, *fosA*, *AAC* (3'), *sul1*, *catB* entre outros, dados semelhantes a nosso. No estudo espanhol de del Barrio-Tofiño et al., (28), o clone ST244 de *P. aeruginosa* apresentou baixa prevalência de genes de resistência, o que difere deste estudo, pois nosso isolado possui uma grande variedade de genes de resistência, incluindo os genes *bla_{KPC}*, *bla_{OXA50}* e *APH* (3') - *Iib*. No Brasil, o estudo de Santos et. al., (29), detectaram a presença do clone ST244 de alto risco carregando vários

genes de resistência, mas como neste estudo não apresentou o gene *bla_{VIM-2}* corroborando com este trabalho, mas diferindo pela presença do gene *bla_{KPC}* em nosso isolado. Em relação à ausência do gene *bla_{KPC}* em nossa montagem, mas não em nossos dados de sequenciamento, sabemos que esse tipo de problema não é incomum. Por exemplo, o GenBank apresenta um grande número de genomas bacterianos em *draft*, com a maioria deles com sequências incompletas (30). Sequências montadas ainda podem apresentar desmontagens, induzindo às vezes a erros de viés nos estudos, resultando em genes incompletos ou incorretamente anotados, como anotações particionadas de ORFs, por exemplo (31, 32). Conforme demonstrado aqui, uma estratégia (mesmo que às vezes leve tempo) é avaliar leituras brutas para encontrar fragmentos semelhantes a sequências de genes importantes que não foram montadas porque são curtos após o corte ou não têm profundidade suficiente.

Para elucidar a ancestralidade das cepas deste estudo, a construção de uma árvore filogenética derivada da análise de genes individuais exibe uma análise robusta da filogenia do gênero (17) demonstrou que a análise concatenada é suficiente para a análise filogenética genética. Assim, em nossa filogenia fica evidente que o isolado JX05 está menos relacionado às demais cepas do grupo, mesmo algumas dessas cepas pertencentes ao mesmo clone, como é o caso das cepas CCBH4851, PA8281, PA7790, PA11803 e PA1088. Isso pode ser consequência da novidade dos achados neste isolado, como a coprodução dos genes *bla_{KPC}*, *bla_{OXA50}* e *bla_{OXA56}* (associados à resistência a β -lactâmicos) e ausência do gene *bla_{SPM-1}*. Enquanto o isolado JX03 está associado ao isolado de *P. aeruginosa* (MDR) VRFPA04 (CP008739), obtido de um paciente com ceratite, que também foi considerado resistente a penicilinas, cefalosporinas, incluindo carbapenêmicos. Embora este isolado não possua, conforme descrito anteriormente, metalo- β -lactamase, ele está agrupado com a cepa F9670, isolada de um paciente nos EUA (CP008873) que possui esses genes, indicando proximidade filogenética entre as cepas. Os valores de bootstrap de cada ramo complexo do indivíduo

apresentam três ou quatro dos genes concatenados analisados, demonstrando a robustez da análise.

Dai et al., (33), demonstraram estrutura semelhante à encontrada neste estudo associada ao ambiente genético do gene *bla_{KPC}*, estruturas responsáveis por facilitar a disseminação desse gene entre outros microrganismos.

Diante destes achados fica evidente a grande diversidade do genoma de *P. aeruginosa* e sua capacidade de adaptar diferentes mecanismos de resistência para sobreviver aos diferentes antimicrobianos empregados nas terapias, demonstrando assim a necessidade de estudos genômicos para rastrear os mecanismos envolvidos nas resistências das cepas de CRPA espalhadas mundialmente, visando terapias mais eficazes contra estes microrganismos.

5. Conclusão

A análise dos resistomes desses isolados de CRPA mostrou a presença do gene *bla_{KPC}* em dois clones de alto risco, o clone endêmico ST277 no Brasil e o clone ST244 que é amplamente difundido em todo o mundo. Esses achados diferem dos descritos na literatura pela ausência dos genes das metalo- β -lactamases nesses clones e pelo surgimento do gene *bla_{KPC}* no país como um dos principais mecanismos de resistência carbapenêmica entre os isolados de CRPA. Por esse motivo, mais estudos com maior número de isolados precisam ser realizados na região para elucidar os mecanismos de resistência aos carbapenem presentes nos isolados de CRPA, além de avaliar os clones que se disseminam nessa região.

Referências

1. Hopkins KL, Meunier D, Findlay J, Mustafa N, Parsons H, Pike R, Wright L, Woodford N, Wright L 1, Woodford N. 2016. SPM-1 metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* ST277 in the UK. **Journal Of Medical**

- Microbiology.** v. 65, n. 7, p.696-697. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.000269>.
2. Galetti R, Andrade LN, Varini AM, Darini ALC. 2019. SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* ST277 carries a chromosomal pack of acquired resistance genes: An example of high-risk clone associated with ‘intrinsic resistome’. **Journal Of Global Antimicrobial Resistance.** v. 16, p.183-186. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jgar.2018.12.009>.
 3. Jacomé PRLA, Alves LR, Jacomé-Júnior AT, Silva MJB, Lima JLC, Araújo PSR, Lopes ACS, Maciel MAV. 2016. Detection of *bla*_{SPM-1}, *bla*_{KPC}, *bla*_{TEM} and *bla*_{CTX-M} genes in isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. and *Klebsiella* spp. from cancer patients with healthcare-associated infections. **Journal Of Medical Microbiology.** v. 65, n. 7, p.658-665. Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.000280>.
 4. Salabi A, Toleman MA, Weeks J. 2009. First Report of the Metallo-Lactamase SPM-1 in Europe. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [s.l.], v. 54, n. 1, p.582-582. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.00719-09>.
 5. Jacomé PRLA, Alves LR, Cabral AB, Lopes ACS, Maciel MAV. 2012. First Report of KPC-Producing *Pseudomonas aeruginosa* in Brazil. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy.** v. 56, n. 9, p.4990-4990, 2 jul. 2012. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.00699-12>.
 6. Carrara-Marroni FE, Cayo R, Streling AP, Silva AC, Palermo RL, Romanin P, Venâncio E, Perugini MR, Pelisson M, Gales AC. 2015. Emergence and spread of KPC-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a Brazilian teaching hospital. **Journal Of Global Antimicrobial Resistance.** v. 3, n. 4, p.304-306. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jgar.2015.07.002>.
 7. Scavuzzi AML, Beltrão EMB, Firmo EF, Oliveira ÉM, Beserra FG, Lopes ACS. 2019. Emergence of *bla*_{VIM-2}, *bla*_{NDM-1}, *bla*_{IMP-7} and *bla*_{GES-1} in *bla*_{KPC-2} harbouring *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Brazil. **Journal Of Global Antimicrobial Resistance.** v. 19, p.181-182, dez. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jgar.2019.09.009>.
 8. Klockgether J, Cramer N, Wiehlmann G, Davenport CF, Tümmler B. *Pseudomonas aeruginosa* Genomic Structure and Diversity. 2011. **Frontiers In Microbiology.** v. 2, 150. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2011.00150>.
 9. Kung VL, Ozer EA, Hauser AR. 2010. The Accessory Genome of *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, [s.l.], v. 74, n. 4, p.621-641. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/mmb.00027-10>.
 10. Jeukens J, Kukavica-Ibrulj I, Emond-Rheault JG, Freschi L, Levesque RC. 2017. Comparative genomics of a drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* panel and the challenges of antimicrobial resistance prediction from genomes. **Fems Microbiology Letters.** v. 364, n. 18. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/femsle/fnx161>.
 11. Freschi L, Vincent AT, Jeukens J, Emond-Rheault JG, Kukavica-Ibrulj I, Dupont MJ, Charette SJ, Boyle B, Levesque LC. 2018. The *Pseudomonas aeruginosa* Pan-Genome Provides New Insights on Its Population Structure, Horizontal Gene Transfer, and Pathogenicity. **Genome Biology And Evolution**, [s.l.], v. 11, n. 1, p.109-120. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/gbe/evy259>.

12. Coil D, Jospin G, Darling AE. 2014. A5-miseq: an updated pipeline to assemble microbial genomes from Illumina data. **Bioinformatics**. v. 31, n. 4, p.587-589, 22 out. 2014. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btu661>.
13. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. **Journal Of Molecular Biology**. v. 215, n. 3, p.403-410. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0022-2836\(05\)80360-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0022-2836(05)80360-2).
14. Curran B, Jonas D, Grundmann H, Pitt T, Dowson CG. 2004. Development of a Multilocus Sequence Typing Scheme for the Opportunistic Pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal Of Clinical Microbiology**, [s.l.], v. 42, n. 12, p.5644-5649. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.42.12.5644-5649.2004>.
15. Larsen MV, Cosentino S, Rasmussen S, Friis C, Hasman H, Marvig RL, Jelsbak L, Sicheritz-Pontén T, Ussery DW, Aarestrup FM, Lund O. 2012. Multilocus Sequence Typing of Total-Genome-Sequenced Bacteria. **Journal Of Clinical Microbiology**, [s.l.], v. 50, n. 4, p.1355-1361. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.06094-11>.
16. Seemann T. 2014. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. **Bioinformatics**, [s.l.], v. 30, n. 14, p.2068-2069. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>.
17. Mulet M, Gomila M, Scotta C, Sánchez D, Lalucat J, García-Valdés E. 2012. Concordance between whole-cell matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and multilocus sequence analysis approaches in species discrimination within the genus *Pseudomonas*. **Systematic And Applied Microbiology**. v. 35, n. 7, p.455-464. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2012.08.007>.
18. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 22, n. 22, p.4673-4680. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>.
19. Trifinopoulos J, Nguyen LT, von Haeseler A, Minh BQ. 2016. W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. **Nucleic Acids Research**, [s.l.], v. 44, n. 1, p.232-235. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkw256>.
20. Huson DH, Richter DC, Rausch C, DeZulian T, Franz M, Rupp R. 2007. Dendroscope: An interactive viewer for large phylogenetic trees. **Bmc Bioinformatics**. v. 8, n. 1. Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2105-8-460>.
21. Chaves L, Tomich LM, Salomão M, Leite GC, Ramos J, Martins RR, Rizek C, Neves P, Batista MV, Amigo L, Guimarães T, Levin AS, Costa SF. 2017. High mortality of bloodstream infection outbreak caused by carbapenem-resistant *P. aeruginosa* producing SPM-1 in a bone marrow transplant unit. **Journal Of Medical Microbiology**. v. 66, n. 12, p.1722-1729, Microbiology Society. <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.000631>.
22. Turano H, Gomes F, Medeiros M, Oliveira S, Fontes LC, Sato MI, Lincopan N. 2016. Presence of high-risk clones of OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* (ST79)

- and SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* (ST277) in environmental water samples in Brazil. **Diagnostic Microbiology And Infectious Disease**. v. 86, n. 1, p.80-82. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.06.005>.
23. Nascimento AP, Ortiz MF, Martins WM, Morais GL, Fehlberg LC, Almeida LG, Ciapina LP, Gales AC, Vasconcelos AT. 2016. Intracloal Genome Stability of the Metallo- β -lactamase SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* ST277, an Endemic Clone Disseminated in Brazilian Hospitals. **Frontiers In Microbiology**. v. 7, 5. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.01946>.
 24. Cacci LC, Chuster SG, Martins N, Carmo PR, Girão VB, Nouér SA, Freitas WV, Matos JA, Magalhães AC, Ferreira AL, Picão RC, Moreira BM. 2016. Mechanisms of carbapenem resistance in endemic *Pseudomonas aeruginosa* isolates after an SPM-1 metallo- β -lactamase producing strain subsided in an intensive care unit of a teaching hospital in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 111, n. 9, p.551-558. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0074-02760160116>.
 25. Cavalcanti FL, Almeida AC, Vilela MA, Morais MM, Morais Junior MA. 2012. Changing the epidemiology of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian teaching hospital: the replacement of São Paulo metallo- β -lactamase-producing isolates. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [s.l.], v. 107, n. 3, p.420-423. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0074-02762012000300019>.
 26. Silva Júnior VV, Ferreira LD, Alves LR, Cabral AB, Jácome PRLA, Araújo PSR, Lopes ACS, Maciel MAV. 2017. Detection of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* harboring bla_{GES-1} and bla_{GES-11} in Recife, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 50, n. 6, p.764-768. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0532-2016>.
 27. van Burgh S, Maghdid DM, Ganjo AR, Mansoor IY, Kok DJ, Fatah MH, Alnakshabandi AA, Asad D, Hammerum AM, Ng K, Klaassen C, Goessens WHF. PME and Other ESBL-Positive Multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Hospitalized Patients in the Region of Kurdistan, Iraq. **Microbial Drug Resistance**, [s.l.], v. 25, n. 1, p.32-38, jan. 2019. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/mdr.2018.0036>.
 28. Del Barrio-Tofiño E, López-Causapé C, Cabot G, Rivera A, Benito N, Segura C, Montero MM, Sorlí L, Tubau F, Gómez-Zorrilla S, Tormo N, Durá-Navarro R, Viedma E, Resino- Foz E, Fernández-Martínez M, González-Rico C, Alejo-Cancho I, Martínez JA, Labayru-Echverria C, Dueñas C, Ayestarán I, Zamorano L, Martinez-Martinez L, Horcajada JP, Oliver A. 2017. Genomics and Susceptibility Profiles of Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Spain. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**. v. 61, n. 11,. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.01589-17>.
 29. Oliveira Santos IC, Pereira de Andrade NF, Conceição Neto OC, Costa BS, Andrade Marques E, Rocha- de -Souza CM, Asensi MD, D'Alincourt Carvalho-Assef AP. 2019. Epidemiology and antibiotic resistance trends in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Rio de janeiro - Brazil: Importance of mutational mechanisms over the years (1995–2015). **Infection, Genetics And Evolution**. v. 73, p.411-415. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2019.05.015>.

30. Sousa TJ, Parise D, Profeta R, Parise MTD, Gomide ACP, Kato RB, Pereira FL, Figueiredo HCP, Ramos R, Brenig B, Silva ALC, Ghosh P, Barh D, Góes-Neto A, Azevedo V. 2019. Re-sequencing and optical mapping reveals misassemblies and real inversions on *Corynebacterium pseudotuberculosis* genomes. **Scientific Report**. V. 9, p.16387. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52695-4>.
31. Loman NJ, Constantinidou C, Chan JZM, Halachev M, Sergeant M, Penn CW, Robinson ER, Pallen MJ. 2012. High-throughput bacterial genome sequencing: an embarrassment of choice, a world of opportunity. **Nature Reviews Microbiology**. v. 10, p. 599–606. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2850>.
32. Acuña-Amador L, Primot A, Cadieu E, Roulet A, Barloy-Hubler F. 2019. Genomic repeats, misassembly and reannotation: a case study with long-read resequencing of *Porphyromonas gingivalis* reference strains. **BMC Genomics**. v. 19, p.54. <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-017-4429-4>.
33. Dai X, Zhou D, Xiong W, Feng J, Luo W, Luo G, Wang H, Sun F, Zhou X. 2016. The IncP-6 Plasmid p10265-KPC from *Pseudomonas aeruginosa* Carries a Novel Δ ISEc33-Associated bla_{KPC-2} Gene Cluster. **Frontiers In Microbiology**. v. 7, p.22-33. 2016. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.00310>.

6 CONCLUSÕES

O único gene de β -lactamase detectado entre os isolados analisados foi o *bla_{KPC}* em 66,7% (4/6) dos isolados;

Todos os isolados avaliados no estudo apresentam os genes do QS e todos foram capazes de produzir biofilme;

O tratamento de isolado de CRPA portador dos genes QS e *bla_{KPC}* com excesso de MPM induziu a formação de biofilme por este isolado;

A associação de MPM com AZT inibiu esse mecanismo de virulência/resistência;

O tratamento com MPM ou POL B inibiu a produção da enzima transglicosilase, enquanto a terapia combinada com AZT resultou na expressão da proteína RpoN;

Os QDs e MALDI-TOF MS mostraram-se promissoras para avaliar o efeito de drogas na inibição da formação de biofilme de microrganismos com perspectivas de aplicabilidade na terapia com biofilme de bactérias resistentes e virulentas;

A análise de MLST revelou que o isolado JX03 pertence ao tipo clonal ST244, enquanto o JX05 pertence ao ST277, clone epidêmico brasileiro, o qual apresenta neste isolado um grande diferencial em relação aos demais membros do clone ST277, presença do gene *bla_{KPC}* sem apresentar o gene *bla_{SPM-1}*.

Concluimos, portanto que é necessário avaliar o impacto das terapias antimicrobianas em isolados multiresistentes, uma vez que a terapia pode potencializar a virulência do microrganismo, o que pode impactar ainda mais na resistência.

REFERÊNCIAS

- BACHARIER, L. B.; GEHA, R. S. Molecular mechanisms of IgE regulation. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 105, n. 2 Pt 2, p. S547-558, fev. 2000.
- BARRINGTON R, ZHANG M, FISCHER M, CARROLL MC. The role of complement in inflammation and adaptive immunity. **Immunol Rev.** 2001;180:5-15.
- BARTH, NULL; PITT, NULL. Microbial Pathogens Associated With Cystic Fibrosis: Special Focus on *Pseudomonas aeruginosa*. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases: An Official Publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p. 43–61, abr. 1998.
- BUSSCHER, H. J. et al. Biomaterial-associated infection: locating the finish line in the race for the surface. **Science Translational Medicine**, v. 4, n. 153, p. 153rv10, 26 set. 2012.
- CHUN CK, OZER EA, WELSH MJ, ZABNER J, GREENBERG EP. Inactivation of a *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal by human airway epithelia. **Proc Natl Acad Sci.** 2004; 101: 3587-3590.
- CIRIONI, O. et al. Effect of the combination of clarithromycin and amikacin on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm in an animal model of ureteral stent infection. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 6, p. 1318–1323, jun. 2011.
- CLATWORTHY, A. E.; PIERSON, E.; HUNG, D. T. Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. **Nature Chemical Biology**, v. 3, n. 9, p. 541–548, set. 2007.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI M100-S26 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing - Twenty-Sixth Informational Supplement. CLSI document M100-S26. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2016.
- CRESPO, J. M. C. Nueva formulación de antibióticos nanoencapsulados para la eliminación de biofilmes en clínica. **REDUCA**, v. 6, n. 1, 2014.
- DEVRIES CA, OHMAN DE. Mucoid-to-Nonmucoid Conversion in Alginate-Producing *Pseudomonas aeruginosa* Often Results from Spontaneous Mutations in algT, Encoding a Putative Alternate Sigma Factor, and Shows Evidence for Autoregulation. **Journal of Bacteriology**. 1994; 176: 6677-6687.
- DONG, V. M.; MCDERMOTT, D. H.; ABDI, R. Chemokines and diseases. **European Journal of Dermatology**, v. 13, n. 3, p. 224–230, 1 maio 2003.
- FEUILLET, V. et al. Involvement of Toll-like receptor 5 in the recognition of flagellated bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 33, p. 12487–12492, 15 ago. 2006.
- FIGUEIREDO, D. Q. DE et al. Detection of metallo-beta-lactamases in hospital strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 45, n. 3, p. 177–184, jun. 2009.

FLANNAGAN, R. S.; COSÍO, G.; GRINSTEIN, S. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 7, n. 5, p. 355–366, maio 2009.

GIAMARELLOU, H. Prescribing guidelines for severe *Pseudomonas* infections. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, n. 2, p. 229–233, fev. 2002.

GIRARD, G.; BLOEMBERG, G. V. Central role of quorum sensing in regulating the production of pathogenicity factors in *Pseudomonas aeruginosa*. **Future Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 97–106, fev. 2008.

HARMSSEN, M. et al. An update on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, tolerance, and dispersal. **FEMS immunology and medical microbiology**, v. 59, n. 3, p. 253–268, ago. 2010.

HAÜSSLER, S.; BECKER, T. The *Pseudomonas* Quinolone Signal (PQS) balances life and death in *Pseudomonas aeruginosa* populations. **PLOS Pathogens Journal Information**, v. 4, n. 9, p. 1-8, 2008.

JUHAS, M.; EBERL, L.; TÜMMLER, B. Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. **Environmental Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 459–471, abr. 2005.

KADURUGAMUWA, J. L. et al. Rapid direct method for monitoring antibiotics in a mouse model of bacterial biofilm infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 10, p. 3130–3137, out. 2003.

KANJ SS, SEXTON DJ (2012) Epidemiology and pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections. Acesso em 1 de janeiro de 2017, disponível em UpToDate®: <http://www.uptodate.com/contents/epidemiologyand-pathogenesis-of-pseudomonas-aeruginosa-infection>

KASNOWSKI, M. C. et al. Formação de biofilme na indústria de alimentos e métodos de validação de superfícies. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 8, n. 15, p. 1-23, 2010.

KIPNIS E, SAWA T, WIENER-KRONISH J. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. **Med Mal Infect**. 2006; 36: 78-91.

KISKA DL, GILLIGAN PH, MURRAY PR, BARON EJ, PFALLER MA, JORGENSEN JH, YOLKEN RH. *Pseudomonas*. In: Manual of Clinical Microbiology. 8ª ed. Manual of Clinical Microbiology. **American Society for Clinical Microbiology**, Washington DC. 2003; 1212.

LEBEAUX, D.; GHIGO, J.-M.; BELOIN, C. Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. **Microbiology and molecular biology reviews: MMBR**, v. 78, n. 3, p. 510–543, set. 2014.

LIMA.; et al. Occurrence and Diversity of Intra- and Interhospital Drug-Resistant and Biofilm-Forming *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Microb Drug Resist**. 2020; 26(7):802–14. <https://10.1089 / mdr.2019.0214>

MADAHA EL.; et al. (2020) Whole-genome sequence of multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains UY1PSABAL and UY1PSABAL2 isolated from human bronchoalveolar lavage, Yaounde', Cameroon. *PLoS ONE* 15(9): e0238390. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238390>

MALONE, J. G. et al. YfiBNR Mediates Cyclic di-GMP Dependent Small Colony Variant Formation and Persistence in *Pseudomonas aeruginosa*. **PLOS Pathogens**, v. 6, n. 3, p. e1000804, 3 dez. 2010.

MANETTI, R. et al. Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 177, n. 4, p. 1199–1204, 1 abr. 1993.

MATARACI, E.; DOSLER, S. In vitro activities of antibiotics and antimicrobial cationic peptides alone and in combination against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 12, p. 6366–6371, dez. 2012.

MATHEE, K.; et al. (2008). Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* genome evolution. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 105, 3100–3105. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711982105>.

MEDEIROS, A. W. Avaliação dos fatores de virulência e capacidade de formação de biofilme in vitro em isolados alimentares e clínicos de *Enterococcus sp* e utilização de PCR-RFLP para a identificação de *Enterococcus casseliflavus* e *Enterococcus gallinarum*. 2011. 116f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011

MILLER MB, GILLIGAN PH. Laboratory Aspects of Management of Chronic Pulmonary Infections in Patients with Cystic Fibrosis. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 4009-4015.

NEIDELL, M.J. et al. Costs of healthcare- and community-associated infections with antimicrobial-resistant versus antimicrobial-susceptible organisms. *Clinical Infectious Disease*, v. 55, p. 807-815, 2012. MOYNAGH, P. N. The Pellino family: IRAK E3 ligases with emerging roles in innate immune signalling. **Trends in Immunology**, v. 30, n. 1, p. 33–42, jan. 2009.

NOWAKOWSKA, J.; LANDMANN, R.; KHANNA, N. Foreign Body Infection Models to Study Host-Pathogen Response and Antimicrobial Tolerance of Bacterial Biofilm. **Antibiotics**, v. 3, n. 3, p. 378–397, 21 ago. 2014.

OLIVEIRA, M. M. M. DE. **Óleos essenciais no controle de biofilmes bacterianos: *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* enteropatogênica.**

PALLERONI, NJ. Family I Pseudomonadaceae. In: Krieg, N. R.; Holt, J. T. (eds) – *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore, Williams & Wilkins. 1984 p. 141-219.

PEDROSA, A. P. et al. Pesquisa de fatores de virulência em *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de águas minerais naturais. **Revista Ambiente & Água**, v. 9, n. 2, p. 313–324, jun. 2014.

RAMPHAL, R. et al. Control of *Pseudomonas aeruginosa* in the lung requires the recognition of either lipopolysaccharide or flagellin. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 181, n. 1, p. 586–592, 1 jul. 2008.

RAOUST, E. et al. *Pseudomonas aeruginosa* LPS or flagellin are sufficient to activate TLR-dependent signaling in murine alveolar macrophages and airway epithelial cells. **PloS One**, v. 4, n. 10, p. e7259, 6 out. 2009.

RASKO, D. A.; SPERANDIO, V. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, n. 2, p. 117–128, fev. 2010.

RODRIGUES, A. V. F. Phenotypic profiling of several strains of *Pseudomonas aeruginosa* : identification of potential virulence determinants. 2014.

ROVETA, S. et al. Activity of moxifloxacin on biofilms produced in vitro by bacterial pathogens involved in acute exacerbations of chronic bronchitis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 30, n. 5, p. 415–421, 1 nov. 2007.

RUPP, M. E. et al. Characterization of the importance of polysaccharide intercellular adhesin/hemagglutinin of *Staphylococcus epidermidis* in the pathogenesis of biomaterial-based infection in a mouse foreign body infection model. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 5, p. 2627–2632, maio 1999.

SAINI, H.; CHHIBBER, S.; HARJAI, K. Azithromycin and ciprofloxacin: a possible synergistic combination against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm-associated urinary tract infections. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 45, n. 4, p. 359–367, abr. 2015.

SAKURAGI, Y.; KOLTER, R. Quorum-sensing regulation of the biofilm matrix genes (pel) of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 14, p. 5383–5386, jul. 2007.

SIQUEIRA, V. L. D. et al. Structural changes and differentially expressed genes in *Pseudomonas aeruginosa* exposed to meropenem-ciprofloxacin combination. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 7, p. 3957–3967, jul. 2014.

STAPPER AP, NARASHIMHAN G, OHMAN DE, BARAKAT J, HENTZER M, MOLIN S, et al. Alginate production affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development and architecture, but is not essential for biofilm formation. **J Med Microbiol**. 2004; 53: 679-690.

STEHLING, E. G.; SILVEIRA, W. D. DA; LEITE, D. DA S. Study of biological characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with cystic fibrosis and from patients with extra-pulmonary infections. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases: An Official Publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 12, n. 1, p. 86–88, fev. 2008.

STEPANOVIC, S. et al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 40, n. 2, p. 175–179, abr. 2000.

STOVER CK.; et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 2000;406:959–964.

STRATEVA, T.; MITOV, I. Contribution of an arsenal of virulence factors to pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Annals of Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 717–732, 1 dez. 2011.

TATEDA K, ISHII Y, HORIKAWA M, MATSUMOTO T, MYIAIRI S, PECHERE JC, et al. The *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer N-3-oxododecanoyl homoserine lactone accelerates apoptosis in macrophages and neutrophils. **Infec Immun**. 2003; 71: 5785-5793.

THELLIN, O. et al. In vitro approach to study the synergistic effects of tobramycin and clarithromycin against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms using prokaryotic or eukaryotic culture media. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 46, n. 1, p. 33–38, jul. 2015.

TODAR, K. 2009. *Todar's Online Textbook of Bacteriology*. (<http://www.textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html> - acessado em 21/01/2017).

TRENTIN DS; GIORDANI RB; MACEDO AJ. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. *Revista Liberato*, Novo Hamburgo, v. 14, n. 22, p. 113-238, jul./dez. 2013.

TRÉ-HARDY, M. et al. In vitro activity of antibiotic combinations against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm and planktonic cultures. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 31, n. 4, p. 329–336, 1 abr. 2008.

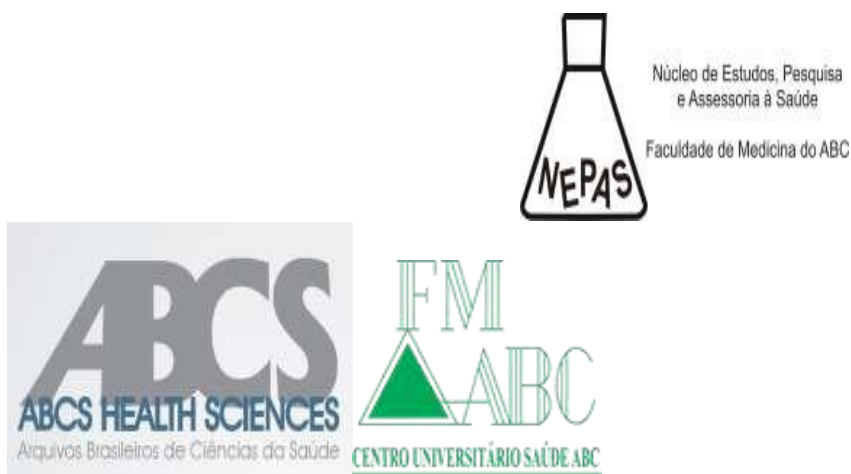
TRØSTRUP, H. et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm aggravates skin inflammatory response in BALB/c mice in a novel chronic wound model. **Wound Repair and Regeneration: Official Publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society**, v. 21, n. 2, p. 292–299, abr. 2013.

VAN GENNIP, M. et al. Interactions between polymorphonuclear leukocytes and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms on silicone implants in vivo. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 8, p. 2601–2607, ago. 2012.

WANG, X. et al. Increased therapeutic efficacy of combination of azithromycin and ceftazidime on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm in an animal model of ureteral stent infection. **BMC Microbiology**, v. 16, 24 jun. 2016.

WIMPENNY, J.; MANZ, W.; SZEWZYK, U. Heterogeneity in biofilms. **FEMS microbiology reviews**, v. 24, n. 5, p. 661–671, dez. 2000.

ZHU, H. et al. *Pseudomonas aeruginosa* with lasI quorum-sensing deficiency during corneal infection. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 45, n. 6, p. 1897–1903, jun. 2004.

ANEXO A – CARTA DE ACEITE DO ARTIGO NA REVISTA ABCS Health Sciences**DECLARAÇÃO**

Declaro para os devidos fins que o manuscrito intitulado “Occurrence of blaKPC gene in clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa proceeding of Brazil” autoria de Jailton Lobo da Costa Lima, Rafael Matos Ximenes, Maria Amélia Vieira Maciel, foi aceito para publicação no periódico ABCS Health Sciences (ISSN 2318-4965).

Santo André, 21/05/2021

Ricardo Souto

Ricardo Peres do Souto - Editor Científico
ABCS Health Sciences
Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde

NEPAS – Núcleo de Estudos, Pesquisa e Assessoria à Saúde/FMABC – CGC 02.879.149/0001-18 Av. Príncipe de Gales, 821 – Vila Príncipe de Gales – Santo André – SP – CEP 09060-650 Fone: (11) 4993 5450 – E-mail: abcs@fmabc.br
www.portalnepas.org.br/abcschs

ANEXO B - ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA ANAIS DA ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS



AN Acad Bras Cienc (2021) 93(suppl. 4): e20210023. doi:10.1590/0001-2788.20210023
 Anais da Academia Brasileira de Ciências | Annals of the Brazilian Academy of Sciences
 Printed ISSN 0001-2788 | Online ISSN 1678-2689
 www.scielo.br/aabc | www.fb.com/aabcjournal

MICROBIOLOGY

Analyses of the response of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* against monotherapy and combined therapy using quantum dots and proteomics

JAILTON L.C. LIMA, JUSSYÉLGES N.P. PEREIRA, BRUNO L. RAPOSO,
 ADRIANA FONTES, PAULO E. CABRAL FILHO, REGINALDO G. LIMA NETO,
 RAFAEL M. XIMENES & MARIA AMÉLIA V. MACIEL

Abstract: Carbapenem-resistant *P. aeruginosa* (CRPA) has become a serious public health problem and the biofilm formation aggravates this problem. The study aimed to evaluate the occurrence of β -lactamases and quorum sensing (QS) genes in CRPA isolates, analyze production of biofilm, evaluate the response against meropenem (MPM) and/or polymyxin B (POL B) and its association with azithromycin (AZT) using quantum dots (QDs) and proteomic analysis. Six CRPA isolates were analyzed. β -lactamases and QS genes were search using specific PCRs and were tested for biofilm production by quantitative technique. A CRPA isolate, containing *blaKPC* gene and biofilm-producing, was selected to assess its response to therapy using QDs and the MALDI-TOF. The β -lactamase detected was *blaKPC* in 66.7% of the isolates. All isolates were biofilm producers and carriers of the QS genes. QDs-MPM conjugates triggered the formation of biofilm and the association with AZT inhibited this effect. Proteomics analysis showed that treatments with MPM or POL B suppressed the expression of the transglycosylase protein, while combined therapy with AZT induced expression of the RpoN protein. Thus, this study shows that the use of fluorescence combined with the proteomics analysis was promising to understand how a CRPA strain reacts to antimicrobial treatment.

Key words: biofilm, drug resistance, fluorescence, RpoN, transglycosylase.

INTRODUCTION

Pseudomonas aeruginosa is a ubiquitous microorganism, able to adapt to diverse environments and acquire different resistance mechanisms, causing different types of infections, mainly in immunosuppressed patients or those with co-morbidities. Besides, the indiscriminate use of antimicrobials to treat infections caused by this microorganism has selected and spread worldwide multidrug-resistant (MDR) or extensively drug-resistant (XDR) *P. aeruginosa* high-risk clones. These

are critical public health problems due to the limitation of effective and safe treatments, being the combination of polymyxin B (POL B) with another antimicrobial drug one of the few possible therapeutic options (Doi 2019, Horcajada et al. 2019, Montero et al. 2019).

Moreover, carbapenem antibiotics are a class of β -lactam antimicrobials widely used to treat infections by gram-negative bacteria, acting in the inhibition of bacterial cell wall synthesis, through binding to penicillin-binding proteins (PBPs), being meropenem (MPM) more effective than imipenem against

P. aeruginosa strains. Another advantage of these antimicrobials is their stability against a broad-spectrum of β -lactamase enzymes (ESBL), although they are hydrolyzed by the enzyme *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), which has greater hydrolytic power. Due to the emergence of strains of carbapenem-resistant *P. aeruginosa* (CRPA), there has been a limitation of therapeutic options, suggesting the use of combinations of antimicrobials against these strains, which may include the use of β -lactam with β -lactamase inhibitors, polymyxins, aminoglycosides and even the use of meropenem (Horcajada *et al.* 2019, Montero *et al.* 2019).

Besides, the capacity of microorganisms to evolve resistance to antimicrobials, their ability to form biofilms allows the development of severe infections with high morbidity and mortality. Biofilms are structured microorganism communities surrounded by an extracellular matrix (EM) adhered to abiotic or biological surfaces, which favor the survival of the microorganisms, especially in hostile environments. Also, biofilm protects bacterial cells from the host immune system. It increases the tolerance to antimicrobial therapy, as it prevents the penetration of most antimicrobial drugs into the EM, which requires higher doses that are practically impossible to achieve *in vivo* due to their inherent toxicity (Lima *et al.* 2018, Maurice *et al.* 2017, Kamali *et al.* 2020).

The treatment of biofilms requires a better understanding of the mechanisms of action of each antimicrobial, especially its ability to cross the EM. β -lactams are the drugs of choice to treat infections caused by MDR *P. aeruginosa* isolates, while polymyxins are the last therapeutic option for XDR isolates. However, both are not effective in crossing the EM, therefore not being ideal options for infections associated with biofilm. The combined therapy with azithromycin

(AZT) can bypass this problem since this drug dysregulates bacterial *quorum sensing* (QS) and reduces biofilm formation. These effects enhance β -lactams and polymyxins penetration into the EM, making them more effective against the microorganisms (Brackman *et al.* 2011, Xu *et al.* 2015).

To understand how these bacteria respond to antimicrobials, nanotechnological tools, such as quantum dots (QDs), have been used (Luo *et al.* 2011, Li *et al.* 2020). QDs are fluorescent semiconductor nanocrystals that have unique properties, such as high resistance to photodegradation and active surface for conjugation with molecules, such as proteins and drugs. Consequently, the conjugation of QDs to drugs can be used to evaluate the effect of these drugs on bacterial cells using a single nanoprobe (Li *et al.* 2020).

Another promising tool for assessing protein changes of microorganisms in response to antimicrobials is mass spectrometry by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF MS). The use of MALDI-TOF MS has become an excellent tool to identify microbials. Besides, it has a high potential for conducting a rapid investigation of antimicrobial resistance. This tool generates spectra, in which ribosomal proteins appear with molecular mass ranging from 2 to 20 kDa, which can be an advantage since can be used as biomarkers. The identification of microorganisms, as well as the analysis of antimicrobial resistance using the MALDI-TOF MS technique, occurs through the comparison between the acquired spectra with reference spectra included in the microorganism database of collections of cultures from all over the world (Roberto *et al.* 2020).

Therefore, the present study aimed to evaluate the occurrence of β -lactamases and quorum sensing (QS) genes in CRPA isolates, analyze the phenotypic production of biofilm. In

addition, we evaluated the response of a clinical strain of CRPA carrying the *blaKPC* gene and biofilm-producing against monotherapy with MPM or POL B and its association with AZT using QDs and the MALDI-TOF MS analysis.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial isolates and Source

The bacteria analyzed in this study were isolated from patients admitted in a public hospital from Recife, Pernambuco, Brazil. The samples were provided by the bacteriology division of the hospital over the year 2016. This study was approved by the Human Research Ethics Committee of the Federal University of Pernambuco, Brazil (CEP 1.480.085).

Six carbapenem-resistant *P. aeruginosa* strain from spontaneous demand samples were included in the study. The isolates were stored at -20 °C in Bacteriology and Molecular Biology Laboratory, Universidade Federal de Pernambuco. The frozen isolates were reactivated in brain heart infusion (BHI) broth and incubated for 24 h at 37 °C, and then seeded ceftrimide agar and incubated for 24 h at 37 °C. These isolates were diverse clinical samples.

Phenotypic biofilm detection

The six isolates were evaluated phenotypically for biofilm production using the quantitative technique (Stepanovic et al. 2000), with modifications. Briefly, 50 g·L⁻¹ sucrose was added to BHI broth (Lima et al. 2018). The categorization of biofilm production was performed according to the biomass adhered to the bottom of the plate according to the values of the optical densities read at 570 nm. The BHI broth was used as the negative control (CN) and the *P. aeruginosa* strain PA01 was used as the positive control (CP) since this strain is recommended as a positive control for biofilm assays.

Detection of QS genes

The total DNA of the isolates was extracted utilizing the Brazol kit (LGC Biotecnologia), according to the protocol provided by the manufacturer. After extraction, DNA quantification was performed by spectrophotometry (Ultraspec 3000; Pharmacia Biotech) over the wavelength range from 260 to 280 nm. Polymerase chain reactions (PCR) were performed for detecting QS genes: *lasI*, *lasR*, *rhlI*, and *rhlR* (Lima et al. 2018), the primers used are listed in Table I. The parameters used for the amplifications of QS genes were 30 cycles of denaturation at 94 °C for 1 min, annealing at 52 °C for 1 min, and extension at 72 °C for 1.5 min. The PCR products were stained with Blue Green Loading Dye I (LGC Biotecnologia – São Paulo), submitted to 2% agarose gel electrophoresis, and visualized under UV light.

Detection of MBL genes (*blaSPM-1*, *blaIMP*, *blaVIM*) and *blaKPC*

To elucidate the mechanism of resistance to β -lactams in CRPA isolates, the genes of metallo- β -Lactamases (MBLs) and *blaKPC* were searched using specific primers (Jacomê et al. 2016), also listed in Table I. For each PCR, a negative control was added containing all compounds used in the reaction without DNA. In addition, the positive control strains for the genes: *blaSPM-1* (*P. aeruginosa* 48-1997A), *blaIMP* (*P. aeruginosa* PSA319), and *blaVIM* (*P. aeruginosa* VIM-1) supplied by the Laboratory Alert from the Federal University of São Paulo (UNIFESP) and *blaKPC* (*P. aeruginosa* P22A) from the culture collection of the Laboratory of Bacteriology and Molecular Biology, Department of Tropical Medicine, Federal University of Pernambuco (UFPE).

Table 1. Primers used in the detection of β -lactamases and *qs* genes.

Gene	Primer	sequence (5' - 3')	Annealing temperature (°C)	Number of cycles
<i>bla_{KPC}</i>	KPC-13 KPC-1b	TGTCAGTGTATCGCGTC CTCAGTGCTACAGAAAACC	63.0	35
<i>bla_{SPM-1}</i>	SPM-1 F SPM-1 R	CCTACAATCTAACGGCGACC TCGCGGTGCCAGGTATAAC	55.3	30
<i>bla_{IMP}</i>	IMP-F IMP-R	GGAATAGAGTGGCTTAATTCTC GTGATGCGTCYCCAAYTTCACT	50.6	30
<i>bla_{VIM}</i>	VIM-F VIM-R	CAGATTGCCGATGGTGTGG AGGTGGGCCATTAGCCAGA	56.8	30
<i>lasR</i>	<i>lasR</i> -F <i>lasR</i> -R	AAGTGGAAAATTGGAGTGGAG GTAGTTGCCGACGACGATGAAG	52	30
<i>lasI</i>	<i>lasI</i> -F <i>lasI</i> -R	CGTGCTCAAGTGTTCAGG TACAGTCGGAAAAGCCAG	52	30
<i>rhlR</i>	<i>rhlR</i> -F <i>rhlR</i> -R	TGCATTTTATCGATCAGGGC CACTTCCTTTCCAGGAGG	52	30
<i>rhlI</i>	<i>rhlI</i> -F <i>rhlI</i> -R	TTCACTCTCTTTAGTCTTCCC TTCCAGCGATTCAGAGAGC	52	30

Synthesis of CdTe QDs and Conjugation of QDs to meropenem

The synthesis of QDs and the conjugation of QDs to meropenem were performed following the protocols previously described by (Cabral Filho et al. 2016, Silva Júnior et al. 2020). Then, a CRPA *P. aeruginosa* (JX05) isolate carrying the *bla_{KPC}* gene and biofilm-producing was selected to be incubated with the QDs-MPM conjugate to evaluate, by fluorescence microscopy, the effect of the association with the AZT on the bacterial cells.

Bacterial inoculum and labeling with the QDs-MPM conjugate

To confirm the inoculum purity, the *P. aeruginosa* clinical isolate JX05 was grown on Cetrimide agar, and single colonies were then inoculated in 2 mL of Luria Bertani (LB) broth and incubated at 37 °C for 24 h. For the labeling experiments, the inoculum was adjusted to 0.5 McFarland. Before bacterial labeling experiments, the remaining activated carboxyl groups of the QDs conjugates

(500 μ L) were blocked using 25 μ L Tris base (15 mg/mL⁻¹), according to (Silva Júnior et al. 2020).

Effect of the QDs conjugates on the bacterial growth

To assess the effectiveness of the bacterial labeling by QDs-MPM conjugates, the inoculum (50 μ L) and the QDs-MPM conjugates suspension (50 μ L) were added in a 0.5-mL microtube. The microtube was kept under constant agitation for 1 h at 25 °C, and after this period, two successive washes were performed by centrifuging the microtube at 1,400 $\times$ g for 5 min. Then, the pellet was resuspended in NaCl 0.9% (w/v – from now on named as saline solution) and observed using an inverted fluorescence microscope (DMI4000B) (Leica Microsystems, Germany) at 63 $\times$ objective with numerical aperture of 1.25. The fluorescence of conjugates was observed using the excitation and emission band pass (BP) filters 560/40 nm and 645/75 nm, respectively (Silva Júnior et al. 2020).

A second procedure was performed to increase the formation of bacterial aggregates in

the presence of an excess of MPM. The inoculum (50 μ L) and the QDs-MPM conjugate suspension (50 μ L) were incubated together as in the previous experiment, but an additional 50 μ L of MPM (1 mg·mL⁻¹) was added to the microtube (Silva Júnior *et al.* 2020). The microtube was kept under constant agitation for 1 h at 25 °C. The same washing and resuspension procedures described above were used. As a negative control, the bacterial inoculum without any treatment was evaluated and also using only bare QDs.

Effect of the association of the QDs-MPM conjugates with azithromycin

To evaluate the effects of disrupting the QS on the bacterial aggregation, 50 μ L of AZT (1 mg·mL⁻¹) was added to the inoculum previously incubated for 1 h with the QDs-MPM and the excess of MPM (second procedure). Then, the system was incubated for another 30 min at 25 °C. After this second incubation period, the same washings and resuspension procedures, using saline solution, were followed as described in the previous tests. These analyzes were performed in triplicate (Silva Júnior *et al.* 2020).

Proteomic analysis by MALDI-TOF MS

The effect of antibiotics on the protein composition of the *P. aeruginosa* clinical isolate JX05 was determined by MALDI-TOF MS.

For this purpose, the inoculum was prepared as described in the previous experiments and then treated with MPM, POL B, AZT, and their association, as shown in Table II. These analyzes were performed in triplicate.

The inocula were treated with MPM and/or POL B and kept under constant agitation for 1 h at 25 °C. For the groups that also received AZT, after this first incubation period, this antimicrobial was added and the samples were incubated for an additional 30 min at 25 °C under constant agitation. Then, samples were centrifuged at 9,000 $\times$ g for 5 min, and the pellet was washed three times with 50 μ L of ultra-pure water. One microliter of the samples was directly spotted in duplicate on a polished steel target plate (Bruker Daltonics, MA, USA). Then, samples were covered with α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) matrix solution (75 mg/mL of CHCA matrix in ethanol/water/acetonitrile [1:1:1] with 0.03% trifluoroacetic acid) and dried (Cordeiro *et al.* 2017).

Mass spectra were acquired using a MALDI-TOF MS Autoflex III smart bean mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) equipped with a 1,064 nm Nd:YAG laser, in the positive reflector mode, and laser frequency of 100 Hz. MS spectra were acquired at 400-2000 m/z range using the Flex Control software (version 3.3, Bruker). The spectra were processed using the Flex Analysis software (version 3.3, Bruker).

Table II. Experimental groups used for proteomic analysis. The antibiotics were dissolved at 1 mg·mL⁻¹.

Groups	Treatments
1	50 μ L of the inoculum without any treatment (negative control)
2	50 μ L of the inoculum + 50 μ L of AZT
3	50 μ L of the inoculum + 50 μ L of MPM
4	50 μ L of the inoculum + 50 μ L of POL B
5	50 μ L of the inoculum + 50 μ L of MPM and 50 μ L of AZT
6	50 μ L of the inoculum + 50 μ L of POL B and 50 μ L of AZT
7	50 μ L of the inoculum + 50 μ L of MPM, 50 μ L of POL B, and 50 μ L of AZT

Besides, the spectra obtained from different treatments were compared among them using the MMass software version 5.5, an Open Source Mass Spectrometry Tool (Strohalm et al. 2010). To compare the peak list, the data were processed using the following tools: peak picking, baseline correction, and smoothing, according to (Niedermeyer & Strohalm 2012).

Afterward, selected parent ions were fragmented using LIFT mode. The sequences were compared with the protein database of the National Centre for Biotechnology Information (NCBI, MD, USA), BioPep (Iwaniak et al. 2016), and UniProt (Bateman et al. 2019).

RESULTS

Origin of isolates

The six CRPA isolates from samples of tracheal secretion, blood and urine were evaluated, with the most frequent sample being tracheal secretion with 66.7% (4/6), as can be seen in Table III.

Biofilm detection

The six isolates studied were biofilm producers, besides, all were classified as strongly adherent as demonstrated in Table III.

Detection of QS, MβL (*bla_{SPM-1}*, *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*) and *bla_{KPC}* genes

All six CRPA isolates displayed the four studied QS genes (*lasI*, *lasR*, *rhlI*, *rhlR*). Of the six CRPA isolates analyzed in this study, none had genes related to MβL, however, 66.7% (4/6) were positive for the presence of the *bla_{KPC}* gene, Table III.

Evaluation of biofilm formation by QDs-MPM conjugates

Untreated bacteria did not show any fluorescence when excited using the filter 560/40 nm (Fig. 1a). After incubating the *P. aeruginosa* clinical isolate JX05 with the QDs-MPM conjugates, rare isolated cells, and small bacterial aggregates (microcolonies) labeled by the conjugate were observed (Fig. 1b), which proves the feasibility of using this tool. Then, a second experiment was carried out, in which the clinical isolate JX05

Table III. Phenotypic and genetic characterization of CRPA Isolates.

isolato	susceptibility profile	source	Adhesion profile of biofilm	<i>lasR</i>	<i>lasI</i>	<i>rhlR</i>	<i>rhlI</i>	<i>KPC</i>	<i>SPM-1</i>	<i>VIM</i>	<i>IMP</i>
JM01	MDR	Tracheal secretion	strongly adherent	+	+	+	+	-	-	-	-
JM02	MDR	Tracheal secretion	strongly adherent	+	+	+	+	-	-	-	-
JX03	XDR	Tracheal secretion	strongly adherent	+	+	+	+	+	-	-	-
JX04	XDR	blood	strongly adherent	+	+	+	+	+	-	-	-
JX05	XDR	Tracheal secretion	strongly adherent	+	+	+	+	+	-	-	-
JX06	XDR	urine	strongly adherent	+	+	+	+	+	-	-	-

was incubated with the QDs-MPM conjugates supplemented with an excess of free MPM. The extra MPM induced the formation of large bacterial aggregates, suggesting that biofilm formation is the first response of this clinical isolate JX05 to the stress caused by MPM (Fig. 1c). Then, when the treatment with AZT was combined, it disrupted the biofilm formation, and only free bacteria (planktonic cells) was seen, demonstrating that the association of AZT with MPM is capable to impair the biofilm formation in this CRPA clinical isolate (Fig. 1d).

Proteomic analysis by MALDI-TOF MS

The analysis of the MS of the untreated *P. aeruginosa* clinical isolate JX05 (negative control) showed several peaks with m/z between 400,000 and 1,264,420 Da as showed in Fig. 2a. The treatment with AZT (treatment 2) did not change the mass spectra pattern (Fig. 2b). However, the comparative analysis of the mass spectra acquired for the bacteria treated with MPM (treatment 3 – Fig. 2c), POL B (treatment 4), MPM + AZT (treatment 5), POL B + AZT (treatment 6), and MPM + POL B + AZT (treatment 7) revealed the suppression of two peaks at 1,151,450 and 1,264,420 Da. MS/MS analysis of the

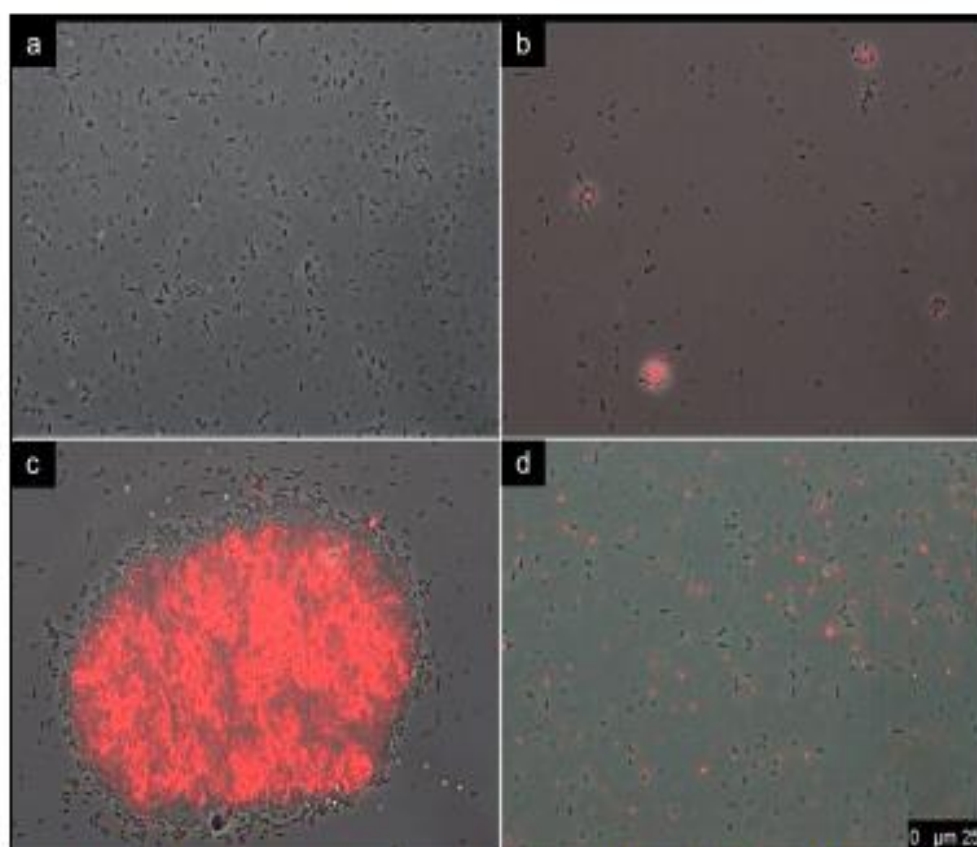


Figure 1. Representative fluorescence microscopy images of JX05 clinical isolate. (a) untreated bacteria; (b) bacteria treated with QDs-MPM conjugates; (c) bacteria treated QDs-MPM conjugates and an excess of free MPM, and (d) bacteria treated with QDs-MPM conjugate and an excess of free MPM, combined with AZT. Micrographs show the overlapping of fluorescence (BP 645/75 nm) and phase-contrast images. Scale bar: 25 μ m.

peak 1,264.420 Da revealed the following amino acid sequence: glutamic acid-lysine-threonine-proline-glycine-proline-valine-tyrosine-glycine, which showed 100% similarity with the protein transglycosylase, as indicated by *P. aeruginosa* taxonomy id:287 database (*P. aeruginosa* ATCC 10145), accession number: EVT86745.1, Table IV.

In the mass spectra of the clinical isolate JX05 treated with the association of MPM + AZT (treatment 5), POL B + AZT (treatment 6), and

MPM + POL B + AZT (treatment 7), a different peak appeared at 972.389 Da. MS/MS analysis revealed the following amino acid sequence: glycine-methionine-arginine-glutamic acid-methionine-lysine-glutamine, which showed 100% similarity with the protein RpoN ($\alpha 54$), as indicated by *P. aeruginosa* taxonomy id:287 database (*P. aeruginosa* ATCC 10145), NCBI Reference Sequence IDWP_047150239.1, Table IV.

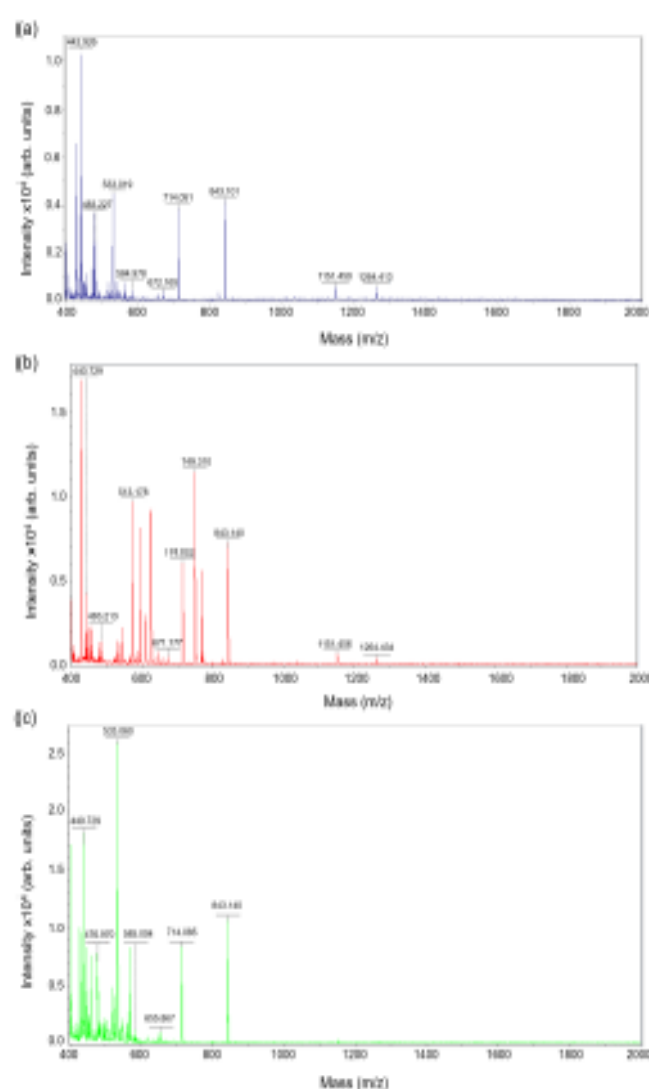


Figure 2. Effect of antibiotics on the protein composition of *P. aeruginosa* JX05 isolate obtained from MALDI TOF mass spectrometry. In (a) only *P. aeruginosa* JX05 bacterial strain; (b) *P. aeruginosa* after treatment with AZT and (c) *P. aeruginosa* after treatment with MPM. arb. units is arbitrary units.

Table IV. Analysis of expression (+) and suppression (-) of transglycosylase and rpon proteins against different antimicrobial treatments in *P. aeruginosa* JX05 isolate by MALDI-TOF MS.

Proteins \ Treatments	1	2	3	4	5	6	7
transglycosylase	+	+	-	-	-	-	-
rpon	-	-	-	-	+	+	+

DISCUSSION

Most of the CRPA isolates analyzed in this study were obtained from samples of tracheal secretion, data that corroborate the findings described in the literature that brings this *P. aeruginosa* as one of the main microorganisms related to lower respiratory tract infections (Lima et al. 2018).

In this study, the phenotypic test used to analyze biofilm formation by CRPA isolates demonstrated biofilm production by all isolates, which were classified as strong producers. These findings corroborate other studies that used the same technique to analyze the production of biofilm by this same microorganism, obtaining high production of biofilm among the analyzed (Perez et al. 2013, Lima et al. 2017, 2018, Kirmusaoğlu & Yurdugül 2017).

The formation of biofilm is a multifactorial process and is regulated by different genes related to the QS (Lima et al. 2018). The presence of QS genes associated with the detection of biofilm formation by the isolates can help in the evaluation of the regulation of the expression of these genes. In this study, the presence of QS genes was found in all analyzed CRPA isolates, corroborating the data obtained in other studies that detected a high occurrence of them (Perez et al. 2013, Kirmusaoğlu & Yurdugül 2017, Lima et al. 2018).

Different enzymes may be related to the development of resistance among CRPA isolates, in this study, a high occurrence of the *bla*KPC gene was found among the analyzed isolates,

data that corroborate the results obtained in other studies (Jacomé et al. 2016, Scavuzzi et al. 2019).

The increase of MPM-resistant bacteria is a serious public health problem even if high doses of MPM are still effective against planktonic bacteria. However, the formation of biofilm hinders the action of this antimicrobial in the microorganism (Song et al. 2019).

In our study, the KPC-positive *P. aeruginosa* clinical isolate JX05 responded to the stress caused by the highest concentration of MPM in producing biofilm. Besides, (Perez et al. 2013), demonstrated that *P. aeruginosa* isolates metallo- β -lactamase producer had a higher ability to induce biofilm formation, mainly those carrying the QS genes, also being observed in the CRPA isolates in this study harboring the QS and *bla*KPC genes.

The biofilm extracellular matrix (EM) hinders most antibiotics from reaching the bacterial cells, making therapeutic doses ineffective (Olivares et al. 2020). Consequently, the release of β -lactamase enzyme KPC by the *P. aeruginosa* clinical isolate JX05 in the EM of the biofilm in formation helps in the tolerance of this isolate to MPM, which induced the formation of large bacterial aggregates. This result demonstrates the role that different resistance and virulence factors play in bacterial resistance (Bowler et al. 2012, Olivares et al. 2020).

In this study, QDs were used as probes conjugated to MPM to evaluate the response of a biofilm-producing CRPA isolate to different

therapies, which has shown to be a promising tool. Corroborating the results obtained by (Luo *et al.* 2011), they used QDs as probes to evaluate the effect of the antimicrobial rocephin against *Escherichia coli* and obtained good results. Similar data were observed in the study in which the activity of the antimicrobial peptide indolicidin (Ind) was evaluated using QDs against *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *P. aeruginosa* (ATCC 1025), *E. coli* (ATCC 11229), and *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031) (Galdiero *et al.* 2016). Although the studies mentioned here show the effects of drugs when conjugated with QDs, it is essential to reinforce that all these combinations were tested against microorganisms with high susceptibility to antimicrobials. Different from our study, in which is the first to use QDs conjugated with MPM and combined therapy with AZT for *P. aeruginosa* strain with *blaKPC* gene and a high degradation power of antimicrobials agents. The MPM tolerance of this clinical isolate may be associated with the release of the β -lactamases (KPC) enzyme in the extracellular matrix of the biofilm formed, which corroborates the data obtained by (Bowler *et al.* 2012).

QD-MPM was already used previously by our group to trigger the biofilm formation and also revealed the role of an efflux pump inhibitor, the CCCP (carbonyl cyanide-3-chlorophenylhydrazone), in an MDR *P. aeruginosa* strain (Silva Júnior *et al.* 2020). Authors analyzed a clinical isolate of *P. aeruginosa* (P118) carrying the *blaGES-1* gene (a clinically relevant extended-spectrum β -lactamase (ESBL), that hydrolyzes penicillins and broad-spectrum cephalosporins but spares monobactams and carbapenems) using the QDs-MPM conjugates. Their results demonstrated that this probe was efficient to label this microorganism making it possible to visualize the formation of bacterial aggregates in response to treatment with MPM. They also

verified using QDs-MPM the effect of CCCP on a *P. aeruginosa* (MDR) strain, which was able to inhibit the efflux pump of this microorganism, increasing the susceptibility of this isolate (Silva Júnior *et al.* 2020).

Herein, we also confirmed the effectiveness of the QDs-MPM conjugates in bacterial tolerance to antimicrobials and the effect of the association of drugs in XDR *P. aeruginosa* strain (Fig. 1 b-d). To our knowledge, this is the first study that used QDs-MPM in an XDR *P. aeruginosa* (JX05) strain carrying the *blaKPC* gene, which confers resistance to all β -lactams, including carbapenems, and explored the combination therapy using AZT and QDs-MPM.

In this context, AZT has been proven as an effective alternative to impair adhesion and biofilm formation of *P. aeruginosa* in abiotic surfaces (Xu *et al.* 2015). Accordingly, with our results, in which AZT was associated with the QD-MPM conjugates, the effectiveness of AZT in inhibiting QS has been proven, preventing the formation of bacterial aggregates (Fig. 1d).

Examination of protein profiles by proteomic analysis has become an important tool for the study of bacterial resistance and the understanding of the biology of the proteomic response of pathogens is generally specific to each antibiotic (Pérez-Llarena & Bou 2016). Our data related to proteomic analysis employing MS showed that treatments with MPM or POL B suppressed the expression of lytic protein transglycosylases (LTs), while treatments with MPM + AZT (treatment 5), POL B + AZT (treatment 6) and MPM + POL B + AZT (treatment 7) resulted in the expression of RpoN protein ($\alpha 54$).

RpoN is required by several genes involved in many functions, such as; the production of extracellular elements, different resistance mechanisms, and virulence factors, which are needed to adjust in a variety of environmental conditions (Yamano *et al.* 1998). Besides,

RpoN protein regulates genes related to the QS in *P. aeruginosa*, reducing the cellular metabolism and triggering the tolerance of this microorganism to MPM (Viducic et al. 2016). Another study of the same research group showed that the RpoN protein promoted the survival of *P. aeruginosa* when it was treated with tobramycin, favoring therapeutic tolerance (Viducic et al. 2017). On the other hand, the inhibition of the RpoN protein in *P. aeruginosa* clinical isolates reduces the virulence and resistance of these bacteria (Lloyd et al. 2019, 2017).

Moreover, according to the MS, lytic transglycosylases were inhibited after the incubation of bacterial cells with MPM or POL B. These LTs are responsible for catalyzing the non-hydrolytic cleavage of the peptidoglycan structures of the bacterial cell wall. Besides, the LTs play important roles in different pathways, including (i) cell wall synthesis, remodeling, and degradation; (ii) detection of antibiotics which act on the cell wall; and (iii) expression of resistance mechanisms to antibiotics that act on the cell wall by certain Gram-negative bacteria (Dik et al. 2017).

P. aeruginosa strains mutants for genes related to the transglycosylase enzyme cause the highest level of resistance to these pathogens, and loss of specific transglycosylase in *P. aeruginosa* increased β -lactam sensitivity (Cavallari et al. 2013), suggesting that transglycosylase enzyme may be a target for antimicrobial adjuvants (Lamers et al. 2015).

Suppression of mutation in genes that encoding LTs in *P. aeruginosa* increase biofilm production, a mechanism capable of compensating the absence of this protein (Lamers et al. 2015). This explains the formation of large bacterial aggregates when the CRPA clinical isolate (JX05) was treated with MPM conjugated with QDs as observed by the

fluorescent images (Fig. 1b and 1c). We also observed the absence of LTs in this same system (treatment 3) when it was analyzed by MS.

Biofilm formation impacts *P. aeruginosa* resistance to POL B since it interferes with the penetration of this drug (Da Silva Carvalho & Rodriguez Perez 2019). In our study, it was found that the association between POL B + AZT (treatment 6) and MPM + POL B + AZT (treatment 7) resulted in the expression of the RpoN protein (o54), a protein that is involved in the activation of different virulence and resistance mechanisms in this microorganism, also acting in the formation of biofilm and also regulates the susceptibility some antimicrobials including carbapenems in *P. aeruginosa* (Viducic et al. 2016, 2017).

Besides, to our knowledge, this is the first study that uses MS for proteomic analysis of a CRPA isolate, aiming to understand the tolerance of this microorganism through protein expression or/and suppression. This platform of analysis has become more and more relevant in clinical practice, allowing the phenotypic characterization and a dynamic analysis of the microorganisms behavior against antimicrobial therapy (Greco et al. 2018).

Therefore, through fluorescence and MS techniques, it was possible to observe the induction of biofilm formation from a CRPA carrying the *blaKPC* enzyme and the expression of proteins important to virulence and resistance mechanisms. In addition, the association of these two techniques was able to elucidate the mechanism of tolerance by this strain of CRPA to antimicrobials.

CONCLUSIONS

The clinical isolate of CRPA *P. aeruginosa* JX05 carrying the QS and *blaKPC* genes produced

biofilm when treated with an excess of MPM, and the association with AZT inhibited this mechanism of resistance. Moreover, the treatment with MPM or POL B inhibited the production of LT enzyme. In contrast, the association of POL B or MPM with AZT, or both, induced the synthesis of the protein RpoN. These data show it is necessary to take into account the impact of bacterial virulence when choosing the best therapy for the treatment of infections, to avoid therapeutic failures and the increase in bacterial resistance.

In this study, QDs and MALDI TOF MS, two contrasting techniques were applied to evaluate the action of antimicrobials in a biofilm-producing CPRA strain. We believe that researchers will be able to address these techniques to evaluate the effect of drugs in inhibiting biofilm formation of microorganisms with prospects of applicability in the biofilm therapy of resistant and virulent bacteria.

REFERENCES

- BATEMAN A. 2019. UniProt: A worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res.* 47(D1): D506-D515.
- BRACKMAN G, COS P, MAES L, NELIS HJ & COENYE T. 2011. Quorum sensing inhibitors increase the susceptibility of bacterial biofilms to antibiotics in vitro and in vivo. *Antimicrob Agents Chemother* 55(6): 2655-2661.
- BOWLER LL, ZHANEL GG, BALL TB & SAWARD LL. 2012. Mature *Pseudomonas aeruginosa* biofilms prevail compared to young biofilms in the presence of ceftazidime. *Antimicrob Agents Chemother* 56(9): 4976-4979.
- CABRAL FILHO PE ET AL. 2016. CdTe quantum dots as fluorescent probes to study transferrin receptors in glioblastoma cells. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1860(1): 28-35.
- CORDEIRO RA ET AL. 2017. The HIV aspartyl protease inhibitor ritonavir impairs planktonic growth, biofilm formation and proteolytic activity in *Trichosporon* spp. *Biofouling* 33(8): 640-650.
- CAVALLARI JF, LAMERS RP, SCHEURWATER EM, MATOSAL & BURROWS LL. 2013. Changes to its peptidoglycan-remodelling enzyme repertoire modulate β -lactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 57(7): 3078-3084.
- DA SILVA CARVALHO T & RODRIGUES PEREZ LR. 2019. Impact of biofilm production on polymyxin B susceptibility among *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Infect Control Hosp Epidemiol* 40(6): 739-740.
- DIX DA, MAROUS DR, FISHER JF & MOBASHERY S. 2017. Lytic transglycosylases: conductivity in conclusion of the bacterial cell wall. *Crit Rev Biochem Mol* 52(5): 503-542.
- DOI Y. 2019. Treatment options for carbapenem-resistant gram-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis* 69(suppl 7): S565-S575.
- GALDIERO E ET AL. 2016. An integrated study on antimicrobial activity and ecotoxicity of quantum dots and quantum dots coated with the antimicrobial peptide indolicidin. *Int J Nanomedicine* 11: 4199-4211.
- GRECO V ET AL. 2018. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical proteomics. *Expert Rev Proteomics* 15(8): 683-696.
- HORCAJADA JP ET AL. 2019. Epidemiology and treatment of multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Clin Microbiol Rev* 32(4): 1-52.
- IWANIAK A, MINKIEWICZ P, DAREWICZ M, SIENIAWSKI K & STAROWICZ P. 2016. BIOPEP database of sensory peptides and amino acids. *Food Res Int* 85: 155-161.
- JACOMÉ PRLA ET AL. 2016. Detection of bla_{SPM-1}, bla_{KPC}, bla_{TEM} and bla_{CTX-M} genes in isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. and *Klebsiella* spp. from cancer patients with healthcare-associated infections. *J Med Microbiol* 5(7): 658-665.
- KAMALI E, JAMALI A, ARDEBILI A, EZADI F & MOHEBBI A. 2020. Evaluation of antimicrobial resistance, biofilm forming potential, and the presence of biofilm-related genes among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Res Notes* 13(1): 4-9.
- KIRMUSAOĞLU S & YURDUGÜL S. 2017. The effect of urinary catheters on microbial biofilms and catheter associated urinary tract infections. *Miscellaneous* 14(02): 3033.
- LAMERS RP, NGUYEN UT, NGUYEN Y, BUENSUCESO RNC & BURROWS LL. 2015. Loss of membrane-bound lytic transglycosylases increases outer membrane permeability and β -lactam sensitivity in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology Open* 4(6): 879-895.
- LI P ET AL. 2020. Low-toxicity carbon quantum dots derived from gentamicin sulfate to combat antibiotic resistance

- and eradicate mature biofilms. *Chem Commun* 56(15): 2316-2319.
- LIMA JLC, ALVES LR, PAZ JNP, RABELO MA, MACIEL MAV & MORAIS MMC. 2017. Analysis of biofilm production by clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with ventilator-associated pneumonia. *Rev Bras Ter Intensiva* 29(3): 310-316.
- LIMA JLC, ALVES LR, JACOMÉ PRLA, BEZERRA NETO JR, MACIEL MAV & MORAIS MMC. 2018. Biofilm production by clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and structural changes in LasR protein of isolates non biofilm-producing. *Braz J Infect Dis* 22(2): 129-136.
- LOYD MG ET AL. 2017. Targeting the alternative sigma factor RpoN to combat virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci Rep* 7(1): 1-12.
- LOYD MG, VOSSLER JL, NOMURA CT & MOFFAT JF. 2019. Blocking RpoN reduces virulence of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients and increases antibiotic sensitivity in a laboratory strain. *Sci Rep* 9(1): 1-10.
- LUO Z, WU Q, ZHANG M, LI P & DING Y. 2011. Cooperative antimicrobial activity of CdTe quantum dots with cefepime and fluorescence monitoring for *Escherichia coli*. *J Colloid Interface Sci* 362(1): 100-106.
- MAURICE NM, BEDI B & SADIQT RT. 2017. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: Host response and clinical implications in lung infections. *Am J Respir Cell Mol Biol* 58(4): 428-439.
- MONTERO MM ET AL. 2019. Colistin plus meropenem combination is synergistic in vitro against extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, including high-risk clones. *J Glob Antimicrob Resist* 18: 37-44.
- NIEDERMEYER TH & STROHLM M. 2012. Mmass as a software tool for the annotation of cyclic peptide tandem mass spectra. *PLoS ONE* 7(9).
- OLIVARES E, BADEL-BERCHOUX S, PROVOT C, PRÉVOST G, BERNARDI T & JEHL F. 2020. Clinical impact of antibiotics for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections. *Front Microbiol* 10: 1-12.
- PÉREZ LLARENA FI & BOU G. 2016. Proteomics as a tool for studying bacterial virulence and antimicrobial resistance. *Front Microbiol* 7: 1-21.
- ROBERTO AEM, XAVIER DE, VIDAL EE, VIDAL CFL, NEVES RP & LIMA-NETO RG. 2020. Rapid detection of echinocandins resistance by MALDI-TOF MS in *Candida parapsilosis* complex. *Microorganisms* 8(1): 1-13.
- SCAVUZZI AML, BELTRÃO EMB, FIRMO EF, OLIVEIRA ÉM, BESERRA FG & LOPES ACS. 2019. Emergence of bla_{VIM-2}, bla_{NDM-1}, bla_{IMP-7} and bla_{GES-1} in bla_{KPC-2} harbouring *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Brazil. *J Glob Antimicrob Resist* 19: 181-182.
- SILVA JÚNIOR W ET AL. 2020. Activity of carbonyl cyanide-3-chlorophenylhydrazone on biofilm formation and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* using quantum dots-meropenem conjugates as nanotools. *Methods Appl Fluoresc* 1-6.
- SONG X, WU Y, CAO L, YAO D & LONG M. 2019. Is meropenem as a monotherapy truly incompetent for meropenem-nonsusceptible bacterial strains? A pharmacokinetic/pharmacodynamic modelling with Monte Carlo simulation. *Front Microbiol* 10: 1-15.
- STEPANOVIC S, VUKOVIC D, DAKICI, SAVIC B & SVABIC-VLAHOVIC M. 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods* 115(8): 891-899.
- STROHLM M, KAVAN D, NOVÁK P, VOLNÝ M & HAVLÍČEK V. 2010. Mmass 3: A cross-platform software environment for precise analysis of mass spectrometric data. *Anal Chem* 82(11): 4648-4651.
- VIDUČIĆ D, MURAKAMI K, AMOH T, ONO T & MIYAKE Y. 2016. RpoN modulates carbapenem tolerance in *Pseudomonas aeruginosa* through *Pseudomonas* quinolone signal and PQS. *Antimicrob Agents Chemother* 60(10): 5752-5764.
- VIDUČIĆ D, MURAKAMI K, AMOH T, ONO T & MIYAKE Y. 2017. RpoN promotes *Pseudomonas aeruginosa* survival in the presence of tobramycin. *Front Microbiol* 8: 839.
- XU ZG, GAO Y, HE JG, XU WF, JIANG M & JIN HS. 2015. Effects of azithromycin on *Pseudomonas aeruginosa* isolates from catheter-associated urinary tract infection. *Exp Ther Med* 9(2): 569-572.
- YAMANO Y, NISHIKAWA T & KOMATSU Y. 1998. Involvement of the rpoN protein in the transcription of the *oprE* gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* 162(1): 31-37.

How to cite

LIMA JLC, PEREIRA JNP, RAPOSO BL, FONTES A, CABRAL FILHO PE, LIMA NETO RG, XIMENES RM & MACIEL MAV. 2021. Analyses of the response of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* against monotherapy and combined therapy using quantum dots and proteomics. *AN Acad Bras Cienc* 93: e20210822. DOI 10.1590/0001-208520210210822.

Manuscript received on June 4, 2021;
accepted for publication on August 24, 2021

JAILTON L.C. LIMA¹

<https://orcid.org/10000-0002-5500-1129>

JUSSYÉGLIS N.P. PEREIRA¹

<https://orcid.org/10000-0002-6494-0128>

BRUNO L. RAPOSO²

<https://orcid.org/10000-0003-2937-9687>

ADRIANA FONTES³

<https://orcid.org/10000-0003-4625-2162>

PAULO E. CABRAL FILHO³

<https://orcid.org/10000-0002-1626-7769>

REGINALDO G. LIMA NETO³

<https://orcid.org/10000-0002-8846-877X>

RAFAEL M. XIMENES³

<https://orcid.org/10000-0002-2011-2865>

MARIA AMÉLIA V. MACIEL¹

<https://orcid.org/10000-0002-4220-6889>

¹Universidade Federal de Pernambuco, Coordenação de Área Medicina Tropical, Centro de Ciências Médicas, Av. Prof. Moraes Rago, 1235, Cidade Universitária, 50670-901 Recife, PE, Brazil

²Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Centro de Biociências, Av. Prof. Moraes Rago, 1235, Cidade Universitária, 50670-901 Recife, PE, Brazil

³Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Antibióticos, Centro de Biociências, Av. Prof. Moraes Rago, 1235, Cidade Universitária, 50670-901 Recife, PE, Brazil

Correspondence to: Jailton Lobo da Costa Lima

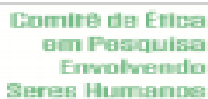
E-mail: jailtonlobo@hotmail.com

Author contributions

JLC conceived and designed research, conducted experiments, analyzed data and wrote the manuscript. JNPP and BLR contributed new reagents or analytical tools. AF, PECF and RGLN contributed new reagents or analytical tools, analyzed data and wrote the manuscript. RMX analyzed data and wrote the manuscript. MAVM conceived and designed research, analyzed data and wrote the manuscript.



ANEXO C - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

		UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-	
---	---	---	---

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Detecção molecular de beta-lactamases de espectro estendido e potencial para formação de biofilme em isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* obtidos no estado de Pernambuco

Pesquisador: MARIA BETÂNIA MELO DE OLIVEIRA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 54187516.8.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.480.085

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um Projeto de Pesquisa para Dissertação de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia. Apresentado pela estudante Ana Vitória Araújo Lima, sob a orientação da Prof. Dra. Patrícia Maria Guedes Paiva. O projeto tem como título: Detecção molecular de beta-lactamases de espectro estendido e potencial para formação de biofilme em isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* obtidos no Estado de Pernambuco. Este projeto tem como finalidade investigar a ocorrência de betalactamases em isolados bacterianos de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* obtidos de hospitais em Recife-PE e verificar o potencial de formação de biofilme nesses isolados. Serão investigados 30 isolados de *A. baumannii* e 40 de *P. aeruginosa*. Os isolados serão coletados de ponta de cateter, sangue, secreção traqueal, e serão mantidos em glicerol (25%) -80°C para análises. Os isolados serão testados quanto ao perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, de acordo com suas classes e espectro de ação. Para avaliar o potencial de formação de biofilme será realizado os experimentos em placas de microtitulação, pelo método de Cristal Violeta descrito por Stepanovic et al., em diferentes meios de cultura. A partir das leituras de densidade óptica (OD), será determinada a média dos valores da absorbância de cada amostra (ODa) em comparação com a absorbância do controle de esterilidade (ODc). As amostras serão classificadas como fortemente, moderadamente e fracamente formadoras de

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS	
Bairro: Cidade Universitária	CEP: 50.740-900
UF: PE	Município: RECIFE
Telefone: (81)2126-8088	E-mail: cepccs@ufpe.br