

**Secretaria de Estado da Saúde  
Coordenadoria de Controle de Doenças  
Instituto Adolfo Lutz**

**Curso de Especialização  
Vigilância Laboratorial em Saúde Pública**

**ISABELA ALVES DE SOUZA**

**ESTUDO FENOTÍPICO DOS  
FATORES DE VIRULÊNCIA DE  
ISOLADOS CLÍNICOS E  
AMBIENTAIS DE  
*Pseudomonas aeruginosa***

**Presidente Prudente**

**2019**

**ISABELA ALVES DE SOUZA**

**ESTUDO FENOTÍPICO DOS  
FATORES DE VIRULÊNCIA DE  
ISOLADOS CLÍNICOS E  
AMBIENTAIS DE  
*Pseudomonas aeruginosa***

Trabalho de conclusão de curso de especialização apresentado ao Instituto Adolfo Lutz - Unidade do Centro de Formação de Recursos Humanos para o SUS/SP - Doutor Antônio Guilherme de Souza como requisito parcial para obtenção do título de Especialista em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública

Orientador: Profa. Me. Erika  
Kushikawa Saeki

**Presidente Prudente**

**2019**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Souza, Isabela Alves

Estudo fenotípico dos fatores de virulência de isolados clínicos e ambientais de *Pseudomonas aeruginosa*/ Isabela Alves Souza– Presidente Prudente, 2019.

41 f. il

Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização-Vigilância Laboratorial em Saúde Pública)-Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, CEFOR/SUS-SP, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, 2019.

Área de concentração: Vigilância Sanitária em Laboratório de Saúde Pública

Orientação: Profa. Me. Erika Kushikawa Saeki

1- Fatores de virulência; 2- Fibrose cística; 3- Infecções por *Pseudomonas*; 4- Patogenicidade;

SES/CEFOR/IAL-27/2019

*Dedico este trabalho a minha família, amigos, e a todos os funcionários do Instituto Adolfo Lutz de Presidente Prudente que contribuíram para a realização deste trabalho, assim como durante todo o período da especialização.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus que sempre me guiou e concedeu aprendizados, oportunidades e pessoas maravilhosas em minha jornada; e a minha família, minha base e encorajamento para enfrentar qualquer adversidade.

À minha orientadora Erika, pela imensa inspiração e contribuição para minha evolução como analista e pesquisadora.

E a todos os funcionários do Instituto Adolfo Lutz de Presidente Prudente pelo carinho e apoio durante todo o período da especialização, em especial a Rita Chagas e Lusinete Bernardo, por todos os ensinamentos do dia a dia, não só profissionais, mas de vida.

## RESUMO

*Pseudomonas aeruginosa* possui grande importância para a saúde pública por ser uma bactéria presente no ambiente e nas infecções clínicas. O objetivo deste trabalho foi avaliar fenotipicamente os fatores de virulência motilidade, protease e ramnolipídeos em isolados clínicos e ambientais de *Pseudomonas aeruginosa*. Vinte e cinco isolados clínicos e dez isolados ambientais foram analisados no período de julho a novembro de 2018 no Centro de Laboratório Regional Instituto Adolfo Lutz de Presidente Prudente. Os ensaios para motilidade Swarming e Swimming foram inoculados na superfície do ágar e a zona de motilidade foi medida após incubação a 30°C/24h. A motilidade Twitching foi realizada em ágar Twitching; após incubação a 37°C durante 24h, seguido da coloração da placa de Petri com cristal violeta 2% por 2h. A atividade proteolítica foi confirmada pela formação de uma zona clara em torno do inóculo em ágar Leite e a produção de ramnolipídeos pela formação de um halo de precipitação em ágar CTAB. Em todos os ensaios, os isolados foram testados em triplicata em três dias diferentes. As médias da motilidade foram calculadas para a categorização das cepas em não móvel:  $d < 20$ , moderadamente móvel:  $20 \leq d < 40$  e altamente móvel:  $d \geq 40$  para Swarming e Swimming; e não móvel:  $d < 7$ , fracamente móvel:  $7 > d < 15$ , moderadamente móvel:  $16 > d < 25$  e altamente móvel:  $d > 25$  para motilidade Twitching. O Software R (3.4.2) foi utilizado para análise estatística e o valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. Para a motilidade Swarming, 76% e 90% dos isolados clínicos e ambientais, respectivamente, foram classificados como não móveis. Para Swimming, 48% dos isolados clínicos foram não móveis e 70% dos isolados ambientais altamente móveis. Para Twitching, 60% e 80% dos isolados clínicos e ambientais, respectivamente, foram considerados fracamente móveis. Houve produção de protease em 88% dos isolados clínicos e 100% dos isolados ambientais; e a produção de ramnolipídeos em 64% dos isolados clínicos e 90% dos isolados ambientais. Houve diferença significativa entre isolados clínicos e ambientais nos ensaios motilidade Swimming e Twitching, e Ramnolipídeos ( $p < 0,05$ ). Este estudo revela a grande variabilidade de fatores de virulência presentes nos isolados de *P. aeruginosa*, o que nos alerta para o elevado nível de patogenicidade das cepas, principalmente ambientais. A melhor compreensão da motilidade e ramnolipídeos,

fatores que estão diretamente associados à formação de biofilmes, pode favorecer estudos complementares às pesquisas visando o controle de bactérias patogênicas.

**Palavras-chave: fatores de virulência, fibrose cística, infecções por pseudomonas, patogenicidade.**

## ABSTRACT

*Pseudomonas aeruginosa* is a very important bacteria for public health because it is present in the environment and clinical infections. The aim of this study was to evaluate the virulence factors such as motility, protease and rhamnolipids in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Twenty-five clinical isolates and ten environment isolates were analyzed from July to November 2018 at the Regional Laboratory Center Adolfo Lutz Institute of Presidente Prudente. Swarming and Swimming motility assay were inoculated on the agar surface and the motile zone was measured after incubation at 30°C/24 h. The Twitching motility was performed on Twitching agar; after incubation at 37 °C for 24h, staining of Petri dish was done with violet crystal 2% for 2h. The proteolytic activity was confirmed by the formation of a clear zone around the inoculum in milk agar and the production of rhamnolipids by the formation of a precipitation zone on CTAB Agar. All isolates were tested in triplicate on three different days. Motility averages were calculated for the categorization of non- or weakly motile:  $d < 20$ , moderately motile:  $20 \leq d < 40$  and highly motile:  $d \geq 40$  for Swarming and Swimming; and not motile:  $d < 7$ , weakly motile:  $7 > d < 15$ , moderately motile:  $16 > d < 25$  and highly motile:  $d > 25$  for Twitching motility. Software R (3.4.2) was used for statistical analysis and the value of  $p < 0.05$  was considered statistically significant. For Swarming motility, 76% and 90% of the clinical and environmental isolates, respectively, were classified as non-motile. For Swimming, 48% of the clinical isolates were non-motile and 70% of the environmental isolates were highly motile. For Twitching, 60% and 80% of clinical and environmental isolates, respectively, were considered non- or weakly motile. There were significant differences between clinical and environmental isolates in the Swimming and Twitching motility, and Rhamnolipids ( $p < 0.05$ ). This study showed a great variability of virulence factors present in the isolates of *P. aeruginosa*, which alerts us to the high level of pathogenicity, mainly environmental strains. For a better understanding of motility and rhamnolipids, virulence factors that are directly associated with the biofilms formation, may favor studies that complement the research aimed to the control of pathogenic bacteria.

**Key-words: cystic fibrosis, pseudomonas infections, pathogenicity, virulence factors.**

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Testes de motilidade. A1 – Swarming de isolado clínico, B1 – Swarming de isolado ambiental, A2 – Swimming de isolado clínico, B2 – Swimming de isolado ambiental, A3 – Twitching de isolado clínico, B3 – Twitching de isolado ambiental.....	27
FIGURA 2 - Gráfico Boxplot dos resultados de motilidade Swarming, Swimming e Twitching dos isolados clínicos e ambientais. As diferenças significativas estão indicadas com * ( $p < 0,05$ ).....	31
FIGURA 3 – Gráfico Boxplot dos resultados de Protease e Ramnolipídeos dos isolados clínicos e ambientais. As diferenças significativas estão indicadas com * ( $p < 0,05$ ).....	33

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Características dos isolados clínicos e ambientais de *P. aeruginosa* estudados: Média (M), desvio padrão (DP) e classificação das atividades (mm) Swarming, Swimming, Twitching, Protease e Ramnolipídeos.....28

TABELA 2 - Porcentagem (%) das atividades (mm) das motilidades Swarming, Swimming e Twitching em isolados clínicos.....30

TABELA 3 – Porcentagem (%) da atividade (mm) das motilidades Swarming, Swimming e Twitching em isolados ambientais.....31

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CLR – Centro de Laboratório Regional

CTAB - Brometo de cetiltrimetilamônio

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

HC-FMUSP - Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

IQS – Sistema Quorum Sensing Integrado

LB – Luria-Bertani

NaCl – Cloreto de sódio

*P. aeruginosa* – *Pseudomonas aeruginosa*

Pqs - 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

## LISTA DE SÍMBOLOS

% - porcentagem

°C – grau Celsius

n<sup>o</sup> - número

μL – microlitro

d - diâmetro

< - menor que

mm - milímetro

≤ - menor ou igual

≥ - maior ou igual

M – média

DP – desvio padrão

± - mais ou menos

p – probabilidade de significância

= - igual

\* - asterisco

> - maior

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. OBJETIVOS.....	14
2.1 Objetivo Geral.....	14
2.2 Objetivos Específicos.....	15
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
3.1 Morfologia e Fisiopatologia.....	15
3.2 Fatores de Virulência.....	16
3.2.1 Motilidade.....	17
3.2.2 Protease.....	18
3.2.3 Ramnolipídeos.....	19
3.3 Quorum sensing.....	19
3.4 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em infecções clínicas.....	20
3.5 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> no ambiente.....	22
4. MATERIAL E METODOS.....	24
4.1 Amostras clínicas e ambientais.....	24
4.2 Método em placa - Motilidade “Swarming”.....	24
4.3 Método em placa - Motilidade “Swimming”.....	25
4.4 Método em placa - Motilidade “Twitching”.....	25
4.5 Método em placa - Protease Alcalina.....	25
4.6 Método em placa – Ramnolipídeos.....	26
4.7 Análise dos dados.....	26
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
6. CONCLUSÃO.....	34
REFERÊNCIAS.....	35

## 1. INTRODUÇÃO

*Pseudomonas aeruginosa* é um bastonete gram-negativo, aeróbio, porém capaz de sobreviver e se multiplicar lentamente em ambientes anaeróbios em determinadas situações (ARRUDA, 2013). Apresenta motilidade pela presença de um ou mais flagelos e, pode ser encontrado isolado ou em grupo (DOS SANTOS; COLOMBO, 2015; TANA, 2017).

Encontra-se amplamente distribuído, sendo um patógeno oportunista de fungos, helmintos, plantas, animais e humanos, com preferência por ambientes úmidos (BROOKS et al., 2014; BURROWS, 2012; JÁCOME et al., 2012). Possui elevada resistência a antimicrobianos, grande diversidade genética e capacidade de formar biofilmes (BERNARDI, 2016; BURROWS, 2012; BROOKS et al., 2014).

Esta bactéria é frequentemente associada a infecções em pacientes imunocomprometidos, queimados, com fibrose cística, infecções gastrointestinais, do trato urinário e otites; mas também pode ser isolado em indivíduos saudáveis (ARRUDA, 2013; PARIGUANA; MONTOYA, 2012).

*P. aeruginosa* tem representatividade em média de 75% de isolados de amostras clínicas (SILVA, 2016). Apesar de ser um agente de contaminação comumente encontrado em ambientes hospitalares, a sua presença em ambientes aquáticos também é preocupante (MAGALHÃES et al., 2013), devido à sua capacidade de formação de biofilmes.

No Brasil, esta bactéria pode ser considerada uma boa indicadora de contaminação de águas de abastecimento (DOS SANTOS; COLOMBO, 2015; MAGALHÃES et al., 2013). Frequentemente isolada em águas superficiais como lagos e rios, possui preferência por águas residuárias devido à alta carga de nutrientes, porém pode sobreviver e se proliferar em ambientes com quantidades mínimas de nutrientes, como em água mineral (ARRUDA, 2013; DOS SANTOS; COLOMBO, 2015). Muitos estudos atribuem um papel importante da água sobre a incidência de colonização de humanos por *P. aeruginosa*, principalmente quando associada à presença de cepas contendo múltiplos fatores de virulência (MAGALHÃES et al., 2013).

Há uma intensa variabilidade de fatores de virulência em *P. aeruginosa*, oscilando de moderadamente a altamente virulentas, sendo seu potencial patogênico multifatorial, dependente da cepa, sítio de infecção, tanto em infecções

adquiridas na comunidade como nas adquiridas em ambiente hospitalar (SILVA, 2016; TANA, 2017). Foi constatado que *P. aeruginosa* é capaz de acumular diferentes fatores de resistência e virulência, além de formar rotas de disseminação de genes relativos aos mesmos, dificultando o tratamento de infecções (JÁCOME et al., 2012; MAGALHÃES et al., 2013).

Entre os fatores de virulência fundamentais para promover a patogenicidade da bactéria, destacam-se a motilidade, protease e ramnolipídeos (ABDEL-MAWGOUD; LÉPINE; DÉZIEL, 2010; AL-HAIDARI et al., 2016; BERNARDI, 2016; BURROWS, 2012; BROOKS et al., 2014; MAGALHÃES et al., 2013; SILVA, 2016; TANA, 2017).

A motilidade é feita através dos flagelos ou pili tipo IV, sendo importante para a proliferação bacteriana. As formas de movimentação mais comuns são “Swarming”, “Swimming” e “Twitching” (AL-HAIDARI et al., 2016; BURROWS, 2012). Já a protease alcalina é secretada para auxiliar o patógeno durante a infecção (BERNARDI, 2016; BURROWS, 2012; BROOKS et al., 2014; SILVA, 2016; TANA, 2017). Os ramnolipídeos estão envolvidos com o desenvolvimento de biofilmes, atividade antibacteriana e antifúngica e inibição da resposta fagocitária (ABDEL-MAWGOUD; LÉPINE; DÉZIEL, 2010).

*Pseudomonas aeruginosa* possui grande importância para a saúde pública, sendo atualmente classificada como prioridade 1 (crítico) dentre as três prioridades listadas pela Organização Mundial de Saúde na pesquisa de novos antimicrobianos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017). Contudo, trabalhos que correlacionem a expressão dos fatores de virulência em cepas clínicas e ambientais ainda são raros. Assim, é observada a necessidade de conhecer o potencial patogênico dos isolados de *P. aeruginosa* tanto em áreas de assistência à saúde como no meio ambiente a fim de realizar uma comparação e formular mecanismos efetivos de vigilância e combate a sua disseminação.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar fenotipicamente os fatores de virulência como a motilidade, protease e ramnolipídeos em isolados clínicos e ambientais de *Pseudomonas aeruginosa*.

## 2.2 Objetivos Específicos

- Classificar os tipos de motilidade Swarming, Swimming e Twitching de acordo com a sua expressão fenotípica.
- Comparar estatisticamente a prevalência dos fatores de virulência estudados por origem de isolamento: clínica ou ambiental.

## 3. REFERENCIAL TEÓRICO

### 3.1 Morfologia e Fisiopatologia

*P. aeruginosa* possui morfologia em forma de bastonete gram-negativo, aeróbio, capaz de sobreviver e se multiplicar lentamente em ambientes anaeróbios, desde que utilize nitrato em substituição ao O<sub>2</sub> comoceptor final de elétrons (ARRUDA, 2013). Apresenta motilidade, devido à presença de um único flagelo polar (monotríquero) e, pode ser encontrada isolada ou em grupo (DOS SANTOS; COLOMBO, 2015; TANA, 2017).

Este microrganismo cresce com facilidade em vários tipos de meios de cultura, a temperaturas de 37 a 42°C (apesar de fazê-lo mais lentamente que os bacilos entéricos) (DOS SANTOS; COLOMBO, 2015).

São capazes de produzir colônias de diversos aspectos, habitualmente colônias grandes, com margens lisas e centro elevado em isolados clínicos; e colônias pequenas, rugosas e convexas em isolados ambientais (SILVA, 2016). A maioria, normalmente, de coloração esverdeada fluorescente devido ao pigmento pioverdina, também envolvido em sua patogenicidade, pode ser visualizada com luz ultravioleta em feridas, queimaduras ou urina, indicando infecção por esta bactéria. Outros pigmentos que podem ser produzidos são piorrubina (cor vermelha) e a piocianina (cor azul) e piomelanina (marron) (DOS SANTOS; COLOMBO, 2015).

### 3.2 Fatores de Virulência

As bactérias, durante sua evolução, adquiriram múltiplos mecanismos de adaptação que lhes permitem ter sucesso na competição por nutriente e espaço em seu habitat. Dentre eles, os fatores de virulência são produzidos principalmente em condições de estresse, dificultando a erradicação da *Pseudomonas aeruginosa* nos tecidos infectados (PARIGUANA; MONTOYA, 2012; LAILA; SANTOS, 2016).

Os principais fatores de virulência estão relacionados à superfície celular da bactéria como *pili* (fímbrias) que promove sua fixação às células do hospedeiro; lipopolissacarídeos e flagelos, responsáveis pela mobilidade da célula bacteriana. No entanto, estas estruturas de superfície possuem um grande potencial imunogênico funcionando como sinalizadores para as células imunes, restando às bactérias, diminuir sua expressão da formação de flagelos e pili durante a colonização do hospedeiro, voltando a ativá-los durante uma nova colonização, por exemplo, na formação de biofilmes (SILVA, 2016).

A capacidade de formar biofilmes é uma das características principais para o sucesso de *P. aeruginosa* como patógeno (MAGALHÃES et al., 2013). O desenvolvimento do biofilme ocorre pela adesão da bactéria à superfície de interesse e fixação das mesmas através da matriz de exopolissacarídeo; posteriormente há organização em microcolônias e início da maturação do biofilme com a constituição de canais para água, nutrientes e produtos do metabolismo bacteriano; conforme necessidade há desprendimento e dispersão das células para produção de um novo biofilme (JÁCOME et al., 2012; LAILA; SANTOS, 2016).

*P. aeruginosa* podem produzir pigmentos sideróforos nos sistemas bacterianos de absorção de ferro (PARIGUANA; MONTOYA, 2012). Outros importantes fatores são as substâncias secretadas pela bactéria, que degradam uma variedade de macromoléculas (BERNARDI, 2016; BURROWS, 2012; BROOKS et al., 2014; PARIGUANA; MONTOYA, 2012). Algumas cepas de *P. aeruginosa* produzem um grande número destes exoprodutos, incluindo a elastase, protease alcalina, fosfolipase C, hemolisina, exotoxina A e piocianina que irão, de diferentes formas, auxiliar o patógeno durante a infecção (SILVA, 2016; TANA, 2017).

A hemolisina está relacionada à lesão tecidual (JÁCOME et al., 2012). Já a exotoxina A causa danos às células do hospedeiro; e as elastases são capazes de degradar a elastina que compõem os tecidos, encontrada principalmente nos vasos

sanguíneos e tecido pulmonar, sítios comuns de infecção por *Pseudomonas aeruginosa* (SILVA, 2016).

Os ramnolipídeos produzidos possuem uso industrial, propriedades hemolíticas, potencial descontaminante no ambiente e efeito algicida (LOPES, 2014). Dependendo do tecido infectado, alguns fatores de virulência desempenham papéis mais importantes na patogênese das infecções por *P. aeruginosa* do que outros (WANG et al., 2013).

### 3.2.1 Motilidade

A motilidade é um fenótipo complexo que envolve vários componentes regulatórios, importante para a proliferação das bactérias em queimaduras e colonização de feridas. A bactéria *P. aeruginosa* utiliza diversos tipos de motilidade como adaptação fenotípica, sendo as mais comuns: motilidade “Swimming” utilizada em superfícies aquosas, motilidade “Swarming” em superfícies semi-sólidas e motilidade “Twitching” em superfícies sólidas. A primeira é dependente de flagelos e as duas últimas de pili tipo IV (motilidade independente de flagelo), todas controladas pelo Sistema Quorum Sensing (AL-HAIDARI et al., 2016; BURROWS, 2012).

Pili tipo IV são estruturas pequenas filamentosas superficiais relacionadas com a motilidade, formação de biofilme e conjugação bacteriana. O pili tipo IV tem se mostrado importante para a adesão, absorção de DNA, transporte de elétrons e colonização da superfície das células do hospedeiro, contribuindo com a patogênese da bactéria (BURROWS, 2012; TANA, 2017).

Muitas bactérias que apresentam motilidade secretam surfactantes, moléculas que agem reduzindo a tensão superficial entre o substrato e a célula bacteriana para permitir o espalhamento sobre a superfície (RODRIGUES, 2015).

A motilidade “Swarming” ocorre em meios menos viscosos (com 0,4 a 0,7% em ágar), dependente de flagelo e da produção de surfactantes pela bactéria, permitindo assim que elas deslizem em grupos. Fenotipicamente, apresenta padrão micromorfológico organizado em giros e bandas devido ao rápido movimento bacteriano, contínuo e regular ao longo do eixo das células agregadas em feixes,

formando padrões dendríticos em meio de cultura (BURROWS, 2012; NICASTRO, 2008; RODRIGUES, 2015).

Já a motilidade “Swimming” ocorre por meio do deslocamento rotatório dos flagelos em padrão desorganizado onde as células se movem individualmente e de forma aleatória em meio líquido (RODRIGUES, 2015).

A motilidade “Twitching”, proporcionada pelo pili tipo IV, acontece devido às propriedades pulsantes irregulares intermitentes e retráteis do pili na superfície da bactéria, permitindo que ela se espalhe em ambientes úmidos, independente de serem bióticos ou abióticos (MAGALHÃES et al., 2013; NICASTRO, 2008; TANA, 2017). Acredita-se que o movimento seja resultado da remoção de subunidades de pilina; assim o pili é encurtado, gerando força para superar o atrito entre as interações do corpo celular com a superfície de fixação (BURROWS, 2012).

Esta contração ocorre em superfícies úmidas de viscosidade moderada, equivalente a 1% de ágar. Apesar das células serem capazes de se movimentar individualmente, é comum vê-las em grupos alinhados, porém não se sabe como é coordenada essa organização. Já a distância que pode ser percorrida pelas células em “Twitching” depende de fatores extrínsecos como nutrientes disponíveis, viscosidade e hidrofobicidade da superfície; e fatores intrínsecos como a quantidade e retração de pili produzida. Esta motilidade ajuda também no contato inicial com o hospedeiro, estabelecendo interações com o patógeno. No início da formação de biofilmes, contribui na fixação superficial e na formação de microcolônias (colonização da superfície), afetando o desenvolvimento da arquitetura do biofilme e consequentemente sua estrutura (BURROWS, 2012; NICASTRO, 2008).

### **3.2.2 Protease**

As enzimas proteolíticas de *P. aeruginosa* são classificadas em proteases neutras (elastases) e proteases alcalinas. Possuem um papel importante no processo de infecção, pois contribuem para a proliferação bacteriana e quebra das defesas físicas do hospedeiro degradando componentes teciduais fornecendo aminoácidos e peptídeos para as bactérias, além de interferirem no mecanismo de defesa imunológico ao degradar imunoglobulinas e outros componentes (FINLAYSON; BROWN, 2011; SILVA, 2016).

### 3.2.3 Ramnolipídeos

Os ramnolipídeos são biossurfactantes glicolipídicos, exoprodutos de *P. aeruginosa* controlados pelo Sistema “Quorum Sensing”, mas também são produzidos por outras espécies bacterianas. Em *P. aeruginosa*, as enzimas responsáveis pela síntese de ramnolipídeos, são codificadas por três genes: *rhIA*, *rhIB* e *rhIC*. Suas funções como fator de virulência ainda não são completamente definidas, mas sabe-se que estão envolvidos com o desenvolvimento de biofilmes, atividade antibacteriana e antifúngica e inibição da resposta fagocitária (ABDEL-MAWGOUD et al., 2010).

### 3.3 Quorum sensing

O sistema Quorum Sensing é o principal regulador da expressão de muitos fatores de virulência em *Pseudomonas aeruginosa* quando há aumento da população bacteriana no local, a fim de controlar sua patogenicidade e sobrevivência (SILVA, 2016).

Este sistema é um processo de comunicação química através da produção, liberação e detecção de moléculas sinalizadoras que as bactérias utilizam para regular seu comportamento em grupo conforme as necessidades surgidas no ambiente, contribuindo na adaptação à disponibilidade de nutrientes e defesas contra a ação de outros microrganismos (LAILA; SANTOS, 2016; O'LOUGHLIN et al., 2013).

Os fatores de virulência controlados pelo Quorum Sensing são: elastase, protease, plicianina, ramnolipídeos, formação de biofilme, produção de toxinas, hemolisina, alginato, motilidade e adesão bacteriana. Na bactéria *P. aeruginosa*, todo este processo é coordenado simultaneamente através de quatro sistemas principais de detecção de quorum Las, Rhl, Pqs e IQS (AL-HAIDARI et al., 2016; O'LOUGHLIN et al., 2013; RODRIGUES, 2015; SILVA, 2016; WANG et al., 2013; LEE et al., 2013). Os isolados que não produzem as moléculas sinalizadoras do Quorum Sensing não expressam a maioria dos fatores de virulência associados, mas ainda podem causar infecções de grande importância (WANG et al., 2013).

### 3.4 *Pseudomonas aeruginosa* em infecções clínicas

A maior parte dos isolados de infecções clínicas produzem enzimas extracelulares, como elastases e proteases, importantes fatores de virulência (BERNARDI, 2016; BURROWS, 2012; BROOKS et al., 2014). Wang e colaboradores (2013) constataram que 80% dos isolados clínicos estudados apresentavam produção de elastase, piocianina e protease alcalina. Da mesma forma, Jácome e colaboradores (2012) encontraram uma elevada porcentagem (70,5%) de produção de piocianina. Lima e colaboradores (2017) verificaram produção de biofilme em 68% de isolados clínicos de *P. aeruginosa*. Além dos fatores de virulência, outra preocupação é a resistência antimicrobiana, desencadeando em grande mobilização científica para a criação de antimicrobianos capazes de combatê-la (ARRUDA, 2013).

*Pseudomonas aeruginosa* é um patógeno importante em infecções respiratórias crônicas em pacientes com fibrose cística, sendo a maior causa de morbidade e mortalidade desta doença (BERNARDI, 2016; LAILA; SANTOS, 2016; O'LOUGHLIN et al., 2013; SILVA, 2016).

Segundo o Ministério da Saúde (BRASIL, 2017), a fibrose cística é uma doença hereditária autossômica recessiva grave que afeta principalmente os pulmões e o pâncreas com obstrução progressiva dos órgãos por aumento da viscosidade de muco. No pâncreas, a obstrução de seus ductos causa perda de enzimas digestivas, com consequente má nutrição; e nos pulmões, há bloqueio das vias respiratórias propiciando infecções endobronquiais e lesão pulmonar, podendo chegar ao óbito por disfunção respiratória. No Brasil, a incidência é em torno de 1 caso para cada 10.000 indivíduos, afetando homens e mulheres de maneira igual.

Segundo o GRUPO BRASILEIRO DE ESTUDOS DE FIBROSE CÍSTICA (2016), em 2015, foram identificados isolados de *P. aeruginosa* em 42,7% de pacientes com fibrose cística, sendo 20,6% com fenótipo mucoide. Estes dados evidenciam a capacidade que este microrganismo tem de se adaptar a zona respiratória e resistir ao sistema imune, principalmente devido à formação dos biofilmes, que lhe confere proteção por longos períodos (BERNARDI, 2016; NORA, 2014).

Um fator de virulência muito relacionado ao sucesso de *P. aeruginosa* como patógeno, responsável pela cronicidade nesta doença, é a produção de alginato, que lhe confere o fenótipo mucoide, contribuindo na aderência a superfície pulmonar, ação antimicrobiana e desenvolvimento de biofilmes. A piocianina participa da patogenicidade causando dano no epitélio pulmonar através do estresse oxidativo, destruição de neutrófilos e desequilíbrio da atividade antiproteolítica das células das vias respiratórias dos pacientes, sendo identificada regularmente em amostras de escarro dos pacientes. Sua superprodução está associada à gravidade da doença, declínio da função pulmonar e estabelecimento de *P. aeruginosa* no pulmão (FINLAYSON; BROWN, 2011; LAILA; SANTOS, 2016; O'LOUGHLIN et al., 2013; SILVA et al., 2014; SILVA, 2016).

A elastase e protease alcalina contribuem degradando elastina, laminina e colágeno, causando necrose de tecidos conectivos, inativando componentes do complemento e clivando imunoglobulinas do sistema imune. Seus níveis elevados em isolados dos pacientes são correlacionados com as más condições clínicas dos pacientes (FERREIRA, 2005; OLDAK; TRAFNY, 2005).

Os dispositivos médicos artificiais como equipamentos de terapia respiratória podem ser portas de entrada para colonização por *P. aeruginosa* nos pacientes portadores de fibrose cística, neste exemplo, através da água contaminada do equipamento; muitas vezes, há também a constituição de biofilmes, que degradam persistentemente o epitélio pulmonar mesmo com terapia intensiva, resultando em grandes índices de morbimortalidade. Na concepção da infecção, as cepas apresentam o fenótipo móvel através de seus flagelos e pili tipo IV e se aderem à superfície pulmonar, aproveitando-se da defasagem do sistema mucociliar que não consegue eliminar os microrganismos inalados e do acúmulo de muco nos pulmões, um ambiente favorável para o desenvolvimento do patógeno; com o estabelecimento da bactéria, há a conversão para o fenótipo mucoide (não móvel) atestando a relação da perda do flagelo com a produção exacerbada de alginato (BERNARDI, 2016; FERREIRA, 2005; LAILA; SANTOS, 2016, NORA, 2014).

Um fator preocupante nos centros de tratamento para fibrose cística é a disseminação de isolados de *P. aeruginosa* entre os pacientes e/ou sua aquisição do ambiente e sua alta resistência antimicrobiana. Esta última sendo explicada pela alta taxa de mutação devido a falhas no processo de reparação do DNA. A colonização de longa duração propicia a obtenção de mecanismos de resistência aos

antimicrobianos e o desenvolvimento de biofilmes (MARQUES, 2015; NORA, 2014; WU et al., 2011).

### 3.5 *Pseudomonas aeruginosa* no ambiente

Doenças de veiculação hídrica possuem alta incidência na população (DOS SANTOS; COLOMBO, 2015). *P. aeruginosa*, pode ser frequentemente isolada em águas superficiais como lagos e rios, apesar de não ser encontrada normalmente em água potável, sendo capaz de sobreviver até mesmo em água destilada. Possui preferência por águas residuárias devido à alta carga de nutrientes, porém pode sobreviver e se proliferar em ambientes com quantidades mínimas de nutrientes, como em água mineral, gerando grande preocupação (ARRUDA, 2013; DOS SANTOS; COLOMBO, 2015; GOMES, 2017).

Segundo a RDC nº 173/2006, que dispõe sobre o regulamento técnico de boas práticas para industrialização e comercialização de água mineral natural e água mineral, a água mineral natural é obtida de fontes naturais ou por extração de águas subterrâneas, sendo caracterizada por um conteúdo conhecido e constante de determinados sais minerais e outros constituintes presentes em flutuações naturais (BRASIL, 2006).

*Pseudomonas aeruginosa* está incluída no grupo bactérias alóctones, ou seja, as que aparecem durante as etapas prévias do processamento da água mineral ou mesmo provenientes do ambiente, e apresentam rápida multiplicação após o engarrafamento. Sua ocorrência em água mineral deve ser evitada por duas razões; de um lado, como indicadora da vulnerabilidade ou controle deficiente do ambiente de envase e, de outro, pelo fato de ser um patógeno oportunista (COELHO et al., 2010; PRADO et al., 2014).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária regulamenta as características microbiológicas para água mineral e água natural através da RDC ANVISA nº 275/2005, onde proíbe a presença de bactérias potencialmente patogênicas como a *P. aeruginosa* (BRASIL, 2005).

Gomes; Santana; Carvalho (2015) observaram contaminação por *P. aeruginosa* acima do limite estabelecido pela legislação em 50% de suas amostras de água mineral envasada em galões de 20 litros. Pedrosa e colaboradores (2014)

obtiveram 47,5% de amostras insatisfatórias, onde 9,7% foram capazes de formar biofilme. Coelho e colaboradores (2010) obteve positividade em 18,3% de suas amostras. Bernardo (2009) encontrou 20,5% de suas amostras de água mineral com resultados insatisfatórios quanto à *P. aeruginosa* e, todas apresentavam positividade para piocianina e motilidade, 41,5% eram produtoras de biofilme.

Estes dados reforçam que entre amostras de água mineral que apresentam qualidade microbiológica insatisfatória, o agente microbiológico mais recorrente e responsável por contaminações é *P. aeruginosa*, sendo também conhecida por ser a bactéria mais comumente isolada em amostras de águas minerais naturais comercializadas em galões de 20 litros no país. Além do fato das embalagens serem reutilizáveis, esta alta prevalência de contaminação ocorre muitas vezes por ineficiência nas boas práticas de higienização e desinfecção dos galões, que possuem grandes índices de presença de biofilmes. A capacidade de formação de biofilmes nas embalagens de água mineral está relacionada às características da cepa que influenciam na expressão de fímbrias, fatores ambientais como luz, oxigênio, temperatura e a disponibilidade de nutrientes (PEDROSA et al., 2014).

O tratamento contra *P. aeruginosa* requer a associação de antimicrobianos de várias classes, incluindo agentes beta-lactâmicos de terceira e quarta geração, aminoglicosídeos, carbapenêmicos e quinolonas, entre outros. Esta resistência pode impossibilitar o tratamento de pacientes no caso de infecções por estas cepas (PRADO et al., 2014).

A água constitui não só uma forma de disseminação de organismos resistentes entre populações humanas e animais, mas também o caminho pelo qual genes de resistência são introduzidos em ecossistemas bacterianos naturais. O aumento do uso indiscriminado de antimicrobianos nas práticas médicas, veterinárias e agrárias pode ser uma causa de ambientes aquáticos contaminados. A resistência intrínseca da *P. aeruginosa* aos agentes antimicrobianos é decorrente de uma combinação de mecanismos que envolvem permeabilidade da membrana, sistema ativo de efluxo e a inativação enzimática (PRADO et al., 2014).

Há também preocupação com biofilmes de *P. aeruginosa* no meio ambiente, comumente encontrados em tubulações da rede de distribuição de água potável, chuveiros, bebedouros, pias, entre outros (MAGALHÃES et al., 2013).

Em suma, *P. aeruginosa* têm sido amplamente estudada, devido ao seu papel na biorremediação (método de tratamento de locais contaminados), controle

biológico, doenças de plantas e animais, e muitos outros processos ambientais, especialmente a suspeita de ligação entre contaminação de águas e as infecções clínicas (GOMES, 2017; HESSE et al., 2018; OLIVEIRA; ALVES, 2013).

## **4. MATERIAL E METODOS**

### **4.1 Amostras clínicas e ambientais**

Foram analisados 25 isolados clínicos oriundos de pacientes com fibrose cística atendidos no Ambulatório de Pneumologia do Instituto da Criança “Professor Pedro de Alcântara” do HC-FMUSP, obtidos no período de 2003 a 2009, gentilmente cedidos pela pesquisadora científica Dra Doroti de Oliveira Garcia, do Laboratório Central do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo; e 10 isolados ambientais provenientes de água de abastecimento público pertencente à Coleção de Culturas do CLR Instituto Adolfo Lutz de Bauru, obtidos no período de fevereiro a dezembro de 2016, gentilmente cedidos pela pesquisadora científica Me. Laís Anversa. O estudo foi realizado entre julho e novembro de 2018. Todas as análises laboratoriais de fatores de virulência empregadas no trabalho foram realizadas no Laboratório de Microbiologia Alimentar do Núcleo de Ciências Químicas e Bromatológicas do CLR Instituto Adolfo Lutz de Presidente Prudente.

Este projeto possui aprovação do Comitê Técnico Científico do Instituto Adolfo Lutz CTC 31-J/2017. Os isolados clínicos possuem cadastro e aprovação no Comitê Técnico Científico e Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto Adolfo Lutz/CEPIAL (Projeto nº 0046D-2010).

### **4.2 Método em placa - Motilidade “Swarming”**

As cepas testes foram semeadas em Caldo Luria Bertani (LB) e incubadas a 37°C por 24 horas. Em seguida, inoculou-se 10 µL de suspensão de *P. aeruginosa* no centro do Agar Swarming (glicose 1%, peptona 0,5%, extrato de levedura 0,2% e ágar 0,5%), previamente mantidos em temperatura ambiente. A zona de motilidade foi medida após incubação a 30°C por 24 horas. O ensaio de motilidade foi realizado em triplicata em dias diferentes. As médias foram calculadas para a categorização

conforme Abdouchakour et al. (2018): não ou fracamente móveis:  $d < 20$  mm; moderadamente móvel:  $20 \text{ mm} \leq d < 40$  mm; altamente móvel:  $d \geq 40$ .

#### **4.3 Método em placa - Motilidade “Swimming”**

As cepas foram semeadas em Agar LB e incubadas a 37°C por 24 horas. Em seguida, os isolados foram inoculados em superfície do Agar Swimming (triptona 1%, cloreto de sódio 0,5%, ágar 0,3%), previamente em temperatura ambiente. A área de motilidade foi medida após incubação a 30°C durante 24 horas. O ensaio de motilidade foi realizado em triplicata em dias diferentes. As médias foram calculadas para a categorização conforme Abdouchakour et al. (2018): não móvel ou fracamente móvel  $d < 20$  mm, moderadamente móvel:  $20 \text{ mm} \leq d < 40$  mm; altamente móvel  $d \geq 40$  mm.

#### **4.4 Método em placa - Motilidade “Twitching”**

As cepas foram semeadas em Agar LB e incubadas a 37°C por 24 horas. Uma colônia de cada cepa foi perfurada em Agar Twitching (triptona 1%, extrato de levedura 0,5%, cloreto de sódio 1% e ágar 1%) até o fundo da placa e incubada a 37°C por 24 horas. Posteriormente, o ágar foi cuidadosamente removido e a zona de motilidade foi medida em milímetros após coloração com violeta de cristal 2% por 2 horas. O ensaio de motilidade foi realizado em triplicata em dias diferentes. As médias foram calculadas para a categorização conforme Wolska e Kot (2013): não móvel:  $d < 7$ ; fracamente móvel:  $d 7-15$  mm; moderadamente móvel:  $d 15-25$  mm; e altamente móvel:  $d > 25$  mm.

#### **4.5 Método em placa - Protease Alcalina**

As cepas foram semeadas em Caldo LB e incubadas a 37°C por 24 horas. A atividade proteolítica foi confirmada pela formação de uma zona clara em torno do inóculo (10  $\mu\text{L}$  em poço) em Agar Leite (leite em pó 1%, peptona 0,1%, cloreto de sódio 0,5%, ágar 2%) e quantificada através do diâmetro do halo após incubação a 37°C por 24 horas.

#### 4.6 Método em placa – Ramnolipídeos

Semeou-se a bactéria a ser testada em Caldo LB e incubou-se a 37°C por 24 horas. A partir do crescimento de *P. aeruginosa* foi inoculado 10 µL em poço na placa com Agar CTAB modificado, de acordo com Siegmund e Wagner (1991), e incubado a 37°C por 48 horas. A produção de ramnolipídios foi confirmada pela formação de um halo de coloração azul ao redor da colônia e o diâmetro do halo foi mensurado.

#### 4.7 Análise dos dados

O Software R (3.4.2) foi utilizado para representações gráficas e análise estatística. O valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. As variáveis foram comparadas utilizando o teste T Student (dados com distribuição normal) ou teste de Mann-Whitney (dados com distribuição não normal).

### 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

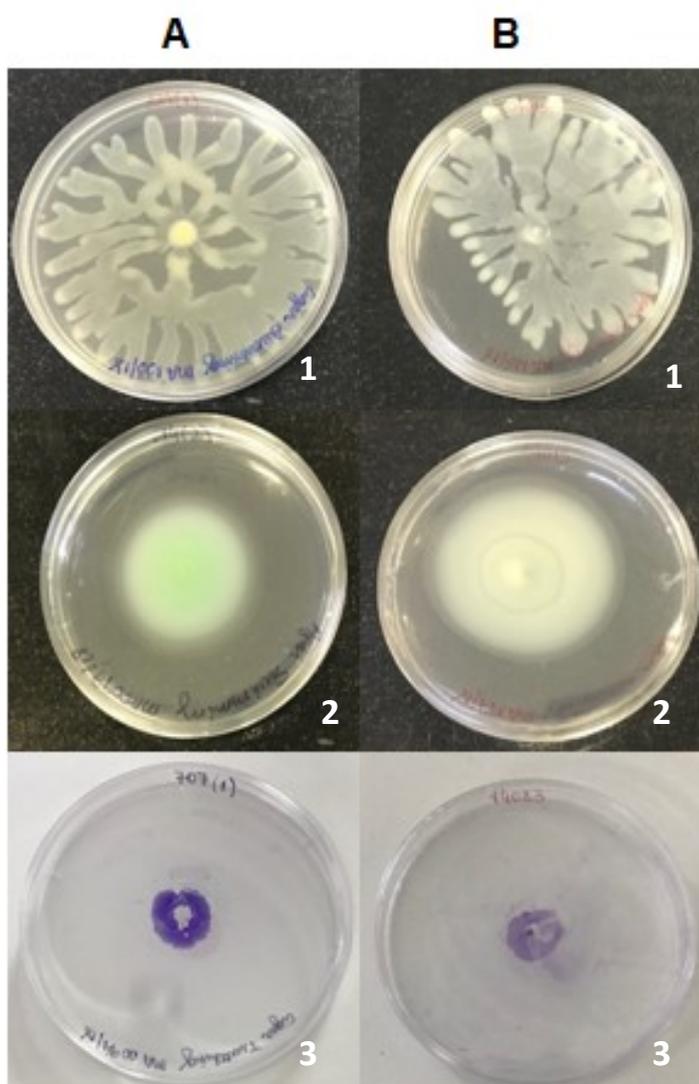
Encontra-se bem documentado a importância da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* para a saúde pública, principalmente por sua capacidade infecciosa, colonização de diversas superfícies bióticas e abióticas e crescente resistência antimicrobiana, tornando-se essencial entender sua patogênese, especialmente através do monitoramento de seus fatores de virulência. Alguns estudos têm associado os isolados obtidos do ambiente, principalmente de água encanada, com cepas infecciosas (ABDOUCHAKOUR et al., 2018; CHAVES, 2017; MAGALHÃES et al., 2013; OTTON et al., 2017).

Grande parte das cepas de *P. aeruginosa* envolvidas produzem fatores de virulência que atuam na superfície (que permite fixação bacteriana, colonização e invasão) e outros fatores de virulência como hemolisina, elastase, protease, entre outros. A combinação destes fatores é determinante para o estabelecimento de uma infecção (SANTOS, 2014).

Neste estudo foram analisados cinco fatores de virulência em *P. aeruginosa*, três de superfície (motilidades Swarming, Swimming e Twitching) e dois exoprodutos (Protease alcalina e Ramnolipídeos) em isolados clínicos e ambientais.

Os resultados de motilidade foram interpretados usando medidas de diâmetro em milímetros (Figura 1), seguida de categorização (Tabela 1), mostrando diversidade no comportamento de motilidade entre os grupos clínico e ambiental.

**Figura 1** - Testes de motilidade. A1 – Swarming de isolado clínico, B1 – Swarming de isolado ambiental, A2 – Swimming de isolado clínico, B2 – Swimming de isolado ambiental, A3 – Twitching de isolado clínico, B3 – Twitching de isolado ambiental.



**Tabela 1** - Características dos isolados clínicos e ambientais de *P. aeruginosa* estudados: Média (M), desvio padrão (DP) e classificação das atividades (mm) Swarming, Swimming, Twitching, Protease e Ramnolipídeos.

Identificação	Origem	Swarming M ± DP	C <sup>1</sup>	Swimming M ± DP	C <sup>2</sup>	Twitching M ± DP	C <sup>3</sup>	Protease M ± DP	Ramnolipídeos M ± DP
491 (1)	Clínica	9 ± 2	NM	10 ± 2	NM	8 ± 2	FM	19 ± 2	9 ± 1
491 (2)	Clínica	9 ± 1	NM	17 ± 2	NM	9 ± 1	FM	12 ± 5	8 ± 1
407 (3)	Clínica	12 ± 2	NM	23 ± 3	MM	11 ± 2	FM	18 ± 2	11 ± 1
407 (2)	Clínica	11 ± 1	NM	14 ± 2	NM	10 ± 1	FM	22 ± 1	11 ± 1
437 (1)	Clínica	9 ± 1	NM	10 ± 1	NM	3 ± 2	NM	15 ± 1	0
420 (2)	Clínica	11 ± 2	NM	0	NM	6 ± 1	NM	0	0
45 (1)	Clínica	8 ± 1	NM	17 ± 3	NM	7 ± 2	FM	0	0
302 (2)	Clínica	9 ± 1	NM	11 ± 3	NM	9 ± 2	FM	21 ± 4	0
653 (2)	Clínica	10 ± 2	NM	10 ± 1	NM	10 ± 1	FM	10 ± 1	0
783 (1)	Clínica	9 ± 1	NM	0	NM	7 ± 1	FM	11 ± 1	0
783 (2)	Clínica	10 ± 2	NM	0	NM	13 ± 2	FM	19 ± 2	0
167 (1)	Clínica	12 ± 3	NM	20 ± 3	MM	8 ± 1	FM	18 ± 2	14 ± 2
707 (1)	Clínica	13 ± 2	NM	27 ± 1	MM	18 ± 1	MM	21 ± 2	12 ± 1
254 (1)	Clínica	21 ± 3	MM	36 ± 2	MM	13 ± 1	FM	21 ± 2	14 ± 1
614 (2)	Clínica	21 ± 3	MM	44 ± 3	AM	18 ± 1	MM	31 ± 3	16 ± 1
855 (1)	Clínica	9 ± 1	NM	13 ± 2	NM	8 ± 1	FM	9 ± 2	0
99	Clínica	8	NM	0	NM	10 ± 1	FM	18 ± 2	12 ± 1
134 (1)	Clínica	9 ± 1	NM	39 ± 4	MM	5 ± 2	NM	15 ± 1	8 ± 2
324 (1)	Clínica	74 ± 7	AM	26 ± 6	MM	7 ± 2	FM	23 ± 3	15 ± 1
194 (1)	Clínica	75 ± 5	AM	29 ± 4	MM	6 ± 2	NM	21 ± 2	15 ± 1
35 (1)	Clínica	11 ± 3	NM	43 ± 2	AM	6 ± 1	NM	21 ± 1	15 ± 1
240	Clínica	29 ± 2	MM	25 ± 3	MM	6 ± 1	NM	21 ± 1	16 ± 1
762 (1)	Clínica	8 ± 1	NM	32 ± 3	MM	5 ± 1	NM	0	0
171 (1)	Clínica	22 ± 4	MM	48 ± 2	AM	6 ± 1	NM	21 ± 1	15 ± 1
171 (2)	Clínica	11 ± 2	NM	30 ± 3	MM	13 ± 1	FM	20 ± 1	13 ± 1
4023	Ambiental	14 ± 3	NM	45 ± 2	AM	15 ± 1	FM	18 ± 2	15 ± 1
14048	Ambiental	11 ± 2	NM	40 ± 2	AM	14 ± 2	FM	22 ± 2	16
14083	Ambiental	12 ± 2	NM	45 ± 3	AM	17 ± 2	MM	22 ± 1	14 ± 2
4015	Ambiental	62 ± 4	AM	52 ± 3	AM	10 ± 1	FM	16 ± 3	14 ± 1
4021	Ambiental	9	NM	44 ± 4	AM	14 ± 1	FM	12 ± 1	15 ± 1
35010	Ambiental	14 ± 1	NM	22 ± 3	MM	13 ± 1	FM	18 ± 1	0
4064	Ambiental	12 ± 4	NM	44 ± 3	AM	16 ± 1	MM	19 ± 3	17 ± 1
4024	Ambiental	11 ± 1	NM	36 ± 2	MM	15 ± 1	FM	14 ± 2	15 ± 1
14063	Ambiental	13 ± 2	NM	25 ± 2	MM	10 ± 1	FM	13 ± 1	12 ± 2
4010	Ambiental	12 ± 2	NM	46 ± 2	AM	17 ± 1	MM	18 ± 1	15 ± 2

C<sup>1</sup>: Classificação; NM: não móvel/fracamente móvel; MM: moderadamente móvel; AM: altamente móvel.

C<sup>2</sup>: Classificação; NM: não móvel/fracamente móvel; MM: moderadamente móvel; AM: altamente móvel.

C<sup>3</sup>: Classificação; NM: não móvel; FM: fracamente móvel; MM: moderadamente móvel; AM: altamente móvel

A motilidade Swarming dos isolados clínicos variou de 8 mm a 75 mm (Tabela 1), obtendo média de 17±18 mm. Quatro cepas foram classificadas como moderadamente móveis (4/25; 16%) e duas como altamente móveis (2/25; 8%). Entretanto, como a maior parte das cepas teve deslocamento menor que 20 mm na placa de Petri, foram consideradas não móveis (19/25; 76%) segundo a classificação de Abdouchakour et al. (2018) (Tabela 2). Macin et al. (2017) observou que a característica de motilidade Swarming de isolados de pacientes com fibrose cística foi de 84%, menor do que a detectada em pacientes sem a doença (97%). Isto indicou que a pressão contínua e seletiva no ambiente leva a algumas mudanças fenotípicas nas bactérias para ajudar a sua adaptação ao hospedeiro, não

necessariamente permanentemente ligado as suas estruturas móveis (flagelo e pili tipo IV).

Já as cepas ambientais variaram de 9 a 62 mm para motilidade Swarming (Tabela 1), também com média de  $17 \pm 16$  mm. Uma cepa foi classificada como altamente móvel (1/10; 10%), e o restante não móvel (9/10; 90%) (Tabela 3). Abdouchakour et al. (2018) encontrou a maioria dos isolados ambientais de *P. aeruginosa* com motilidade Swarming moderada (17/33; 51%). Otton et al. (2017) obteve 56% de suas cepas ambientais de *P. aeruginosa* (41/73) exibindo motilidade Swarming, variando de 25 a 80 mm.

Conforme Figura 2, não houve diferença estatística significativa na motilidade Swarming entre os isolados clínicos e ambientais ( $p= 0,14$ ). Abdouchakour et al. (2018) também não observou diferença estatística ( $p= 0,34$ ) entre os dois grupos, uma vez que ambos demonstraram habilidades semelhantes para exibir a motilidade Swarming, que é mediada pelos flagelos em colaboração com os pili do tipo IV.

Apesar da motilidade ser necessária no desenvolvimento do biofilme, isolados que exibem pouca ou nenhuma motilidade Swarming são mais propensos a terem sucesso em sua formação, pois se fixam mais eficientemente em sua estrutura que compõe o biofilme (ABDEL-MAWGOUD; LÉPINE; DÉZIEL, 2010).

A motilidade Swimming apresentou expressão em 21 dos 25 isolados clínicos pesquisados (84%), variando de 10 a 48 mm, com média de  $21 \pm 14$  mm (Tabela 1). Conforme a Tabela 2, a maior parte das cepas clínicas apresentou-se não móvel/fracamente móvel (12/25; 48%).

Entre os isolados ambientais, todos apresentaram motilidade Swimming, variando de 22 a 52 mm, com média de  $40 \pm 10$  mm (Tabela 1). Magalhães et al. (2013) obteve a mesma prevalência com média de 27 mm. A maior parte das cepas ambientais deste estudo foi classificada como altamente móvel (7/10; 70%), o restante (3/10; 30%) apresentou-se moderadamente móvel (Tabela 3). Abdouchakour et al. (2018) encontrou a maioria dos isolados ambientais de *P. aeruginosa* com Swimming pouco móveis.

Em nosso estudo, houve diferença estatística significativa quanto à motilidade Swimming nos dois grupos estudados ( $p < 0,05$ ) (Figura 2). Abdouchakour et al. (2018) não encontrou diferença significativa entre isolados clínicos e ambientais ( $p=0,65$ ).

A atividade da motilidade Twitching dos 25 isolados clínicos de *P. aeruginosa* variou de 3 a 18 mm, obtendo média de  $9\pm 4$  mm (Tabela 1). A maior parte das cepas clínicas apresentou-se fracamente móvel (15/25; 60%) (Tabela 2). Wolska e Kot (2013) encontraram a maior parte das cepas demonstrando moderada (20/44; 45%) e alta atividade (19/44; 43,2%).

A divergência de nosso estudo, quanto a motilidade Twitching em isolados clínicos, com os outros apresentados, pode ser explicada pelo estudo de Macin et al. (2017), onde isolados de pacientes com fibrose cística apresentaram motilidade menor que isolados clínicos de outras fontes de isolamento e etiologia, já que cepas de *P. aeruginosa* não móveis são dificilmente fagocitadas, despistando o sistema imune. Esta estratégia pode afetar a capacidade em causar infecções, mas favorece a persistência no hospedeiro através de biofilmes. A correlação entre a atividade da motilidade Twitching, a produção de biofilme e a fonte de isolamento das cepas também foi encontrada por Wolska e Kot (2013).

Já os 10 isolados ambientais variaram de 10 a 17 mm (Tabela 1), com média de  $14\pm 2$  mm. A maior parte das cepas ambientais também se apresentou fracamente móvel (8/10; 80%) (Tabela 3). No estudo de Magalhães et al. (2013), onde foram analisados 8 isolados de *P. aeruginosa* de água superficial, todas as cepas apresentaram motilidade Twitching, 2 apresentando fraca e 6 apresentando alta motilidade.

Houve diferença estatística significativa na motilidade Twitching nos dois grupos estudados ( $p < 0,05$ ) (Figura 2). Já Abdouchakour et al. (2018) não encontrou diferença estatisticamente significativa entre as cepas ambientais e clínicas ( $p = 0,96$ ) para motilidade Twitching.

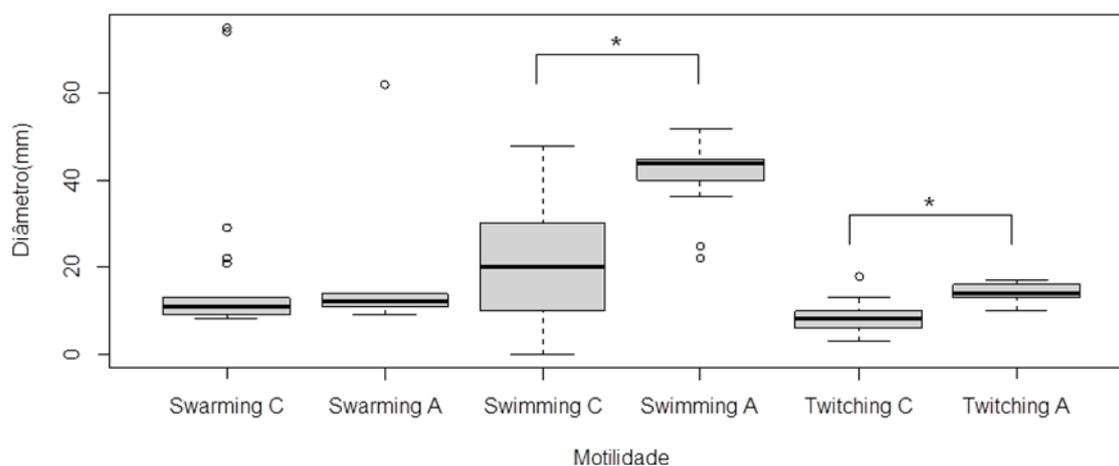
**Tabela 2** - Porcentagem (%) das atividades (mm) das motilidades Swarming, Swimming e Twitching em isolados clínicos.

Tipo de motilidade	Classificação			
	não móvel	fracamente	moderado	muito móvel
<b>Swarming</b>	19 (76%)	-	4(16%)	2 (8%)
<b>Swimming</b>	12 (48%)	-	10 (40%)	3 (12%)
<b>Twitching</b>	8 (32%)	15 (60%)	2 (8%)	0

**Tabela 3** - Porcentagem (%) das atividades (mm) das motilidades Swarming, Swimming e Twitching em isolados ambientais.

Tipo de motilidade	Classificação			
	não móvel	fracamente	moderado	muito móvel
Swarming	9 (90%)	-	0	1 (10%)
Swimming	0	-	3 (30%)	7 (70%)
Twitching	0	8 (80%)	2 (20%)	0

**Figura 2** - Gráfico Boxplot dos resultados de motilidade Swarming, Swimming e Twitching dos isolados clínicos e ambientais. As diferenças significativas estão indicadas com \* ( $p < 0,05$ ).



Neste estudo, 12% (3/25) das cepas clínicas e 10% (1/10) das cepas ambientais apresentaram as duas motilidades Twitching e Swarming. Otton et al. (2017) observou que 37% (27/73) de suas cepas ambientais obtiveram teste positivo para os dois grupos de motilidade. É importante ressaltar que a motilidade Swarming não depende exclusivamente do pili tipo IV, mas também do flagelo.

Segundo Abdouchakour et al. (2018), cada um dos três sistemas de motilidade funcionam de forma independente e parecem não estar relacionados com outros caracteres bacterianos. A alta atividade da motilidade Twitching, por exemplo, leva à redução da formação de biofilme por *P. aeruginosa*, enquanto a motilidade Swarming é necessária para o desenvolvimento de suas estruturas, mas dispensável em sua permanência no hospedeiro. Isto é, a bactéria adapta sua atividade móvel conforme a sua necessidade no hospedeiro, seja para estabelecer a infecção, formar biofilme ou garantir sua permanência no organismo, independentemente de sua origem, clínica ou ambiental, o que pode explicar a falta

de diferenças significativas em algumas características adaptativas, como formação de biofilme, motilidade e resistência (WU et al., 2011).

Quanto à produção de protease alcalina, houve produção em 22 dos 25 isolados clínicos avaliados (88%), com variação de 9 a 31 mm (Tabela 1), obtendo média de  $16\pm 8$  mm. Silva (2016) obteve 93% de atividade proteolítica em seus isolados. Já Macin et al. (2017) encontrou em 64% dos isolados clínicos de fibrose cística e 80% para os isolados de outras etiologias. Ciragil e Soyletir (2004) estudaram as propriedades de elastase, protease e alginato de cepas de *P. aeruginosa* de origem clínica isoladas de diferentes fontes. Eles descobriram que a protease alcalina foi detectada em 52% dos pacientes com fibrose cística e 65% dos não portadores de fibrose cística.

Entre os isolados ambientais houve síntese de protease alcalina em todos os isolados analisados com variação de 12 a 22 mm (Tabela 1), apresentando média de  $17\pm 3$  mm.

Não houve diferença estatística significativa na atividade proteolítica ( $p=0,84$ ) comparando-se os isolados clínicos e ambientais (Figura 3).

A protease alcalina produzida por *P. aeruginosa* exerce um papel importante na virulência durante a colonização, contribuindo para o desmoronamento das barreiras físicas do hospedeiro e aumentando a proliferação bacteriana, fornecendo aminoácidos e peptídeos das proteínas teciduais às bactérias. Em estágios mais avançados, pode interferir com o mecanismo de defesa imune por degradar imunoglobulinas (STEHLLING, 1999).

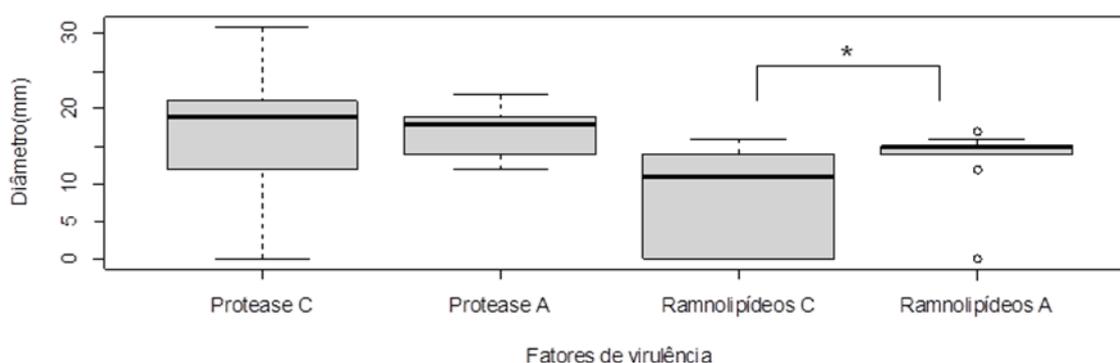
A respeito dos ramnolipídeos, houve síntese em 16 dos 25 isolados clínicos avaliados (64%), com variação de 8 a 16 mm (Tabela 1), apresentando média de  $8\pm 7$  mm. Entre as cepas ambientais, 9 das 10 pesquisadas produziram ramnolipídeos (90%), com variação de 12 a 17 mm (Tabela 1) e média de  $13\pm 5$  mm.

Houve diferença estatística significativa na síntese de ramnolipídeos ( $p<0,05$ ) nos dois grupos estudados (Figura 3).

Kearns (2010) relatou a atuação de surfactantes, como os ramnolipídeos, como agente indutor de expansão da motilidade Swarming. Em nosso estudo esta relação foi concordante nos isolados clínicos, já que as cepas que não produzem ramnolipídeos apresentaram motilidade Swarming sem atividade. Os isolados ambientais apresentaram fenótipos de Swarming e ramnolipídeos diversos, sem associação considerável entre si.

Sabe-se que os ramnolipídeos estão envolvidos no desenvolvimento de biofilme. Eles são responsáveis por induzirem a liberação de lipopolissacarídeos, aumentando a hidrofobicidade da superfície celular, sendo um regulador ambiental quando mudanças nas condições nutricionais ocorrem e favorecendo a adesão primária de células planctônicas. Funciona também como um escudo contra células polimorfonucleadas, contribuindo para a fixação da bactéria no hospedeiro, além de colaborar na competição com outras espécies bacterianas, já que pode perturbar outros biofilmes (ABDEL-MAWGOUD; LÉPINE; DÉZIEL, 2010).

**Figura 3** - Gráfico Boxplot dos resultados de Protease e Ramnolipídeos dos isolados clínicos e ambientais. As diferenças significativas estão indicadas com \* ( $p < 0,05$ ).



*P. aeruginosa* possui preferência por ambientes úmidos, portanto deve-se dar atenção especial às pias, banheiras e chuveiros (BERNARDI, 2016). Sua ocorrência em águas de abastecimento indica deficiência no controle da rede de distribuição de água e é um possível indicativo de disseminação de microrganismos de origem nosocomial no ambiente aquático (PERESI et al., 2011), ocasionando em fonte possível de infecção por *P. aeruginosa*, principalmente em ambientes onde circulam pessoas imunocomprometidas, como hospitais (WOLSKA E KOT, 2013).

Encontra-se bem estabelecido a influência do Sistema Quorum Sensing na expressão dos fatores de virulência por cepas de *P. aeruginosa*. Portanto, mecanismos capazes de inibir esta comunicação pode diminuir a secreção de fatores de virulência e é um caminho promissor para um possível controle de infecção bacteriana (WANG et al., 2013).

Estudos que visam à descoberta de moléculas relevantes sob o ponto de vista terapêutico capazes de impactar mecanismos de virulência específicos também são de grande importância, auxiliando até mesmo no desenvolvimento de novas drogas (OTTON et al., 2017).

Pesquisas recentes com plantas medicinais como o louro e coentro apresentaram-se bons inibidores do sistema quorum sensing, sendo uma opção de redução da patogenicidade de *Pseudomonas aeruginosa* para os fatores de virulência como motilidade (AL-HAIDARI et al., 2016). Outros pesquisadores analisaram a eficiência de moléculas sintéticas como a Meta-bromo-tiolactona na redução do biofilme (O'LOUGHLIN et al., 2013).

Hentzer et al. (2003) testaram a ação da furanona para inibição de protease e ramnolipídeos, enquanto que Otton et al. (2017) estudaram o mesmo composto para a inibição de motilidades Twitching e Swarming. Havasi et al. (2008) e Michon et al. (2014) verificaram uma diminuição da motilidade Swimming e global, respectivamente, em cepas de *P. aeruginosa* após incubação com solução salina hipertônica (NaCl >2%).

## 6. CONCLUSÃO

A análise fenotípica realizada revelou grande variabilidade de fatores de virulência entre os isolados estudados, o que nos alerta para o elevado nível de patogenicidade das cepas, principalmente as ambientais.

A partir deste estudo, é possível sugerir que o contato com cepas de *P. aeruginosa* presentes no ambiente, como em águas de abastecimento público, pode oferecer risco patogênico, principalmente para os imunocomprometidos, já que estas cepas apresentam fatores de virulência importantes para a infecção e disseminação no hospedeiro, como motilidade Swimming, Twitching e protease alcalina, que todas as cepas ambientais pesquisadas apresentaram, com potencial de expressão muitas vezes maior que cepas clínicas.

A produção exacerbada destes fenótipos pelas cepas ambientais isoladas neste estudo representa um potencial de colonização e infecção, garantindo a rápida disseminação e capacidade inflamatória. Além disso, a maior expressão do pili tipo

IV contribui para uma maior aderência aos diversos materiais e equipamentos hospitalares que podem servir de veículos de disseminação do patógeno.

O estudo do comportamento de motilidade dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa* é de extrema importância para a compreensão dos fatores de virulência e seus mecanismos envolvidos em sua patogenicidade. Os tipos de motilidades identificados, fatores que estão diretamente associados à formação de biofilmes podem ser responsáveis por estudos complementares às pesquisas visando o controle de bactérias patogênicas.

Como o presente estudo limitou-se à pesquisa fenotípica desses fatores de virulência, não sendo pesquisados os genes responsáveis pela expressão dos mesmos, aliar a pesquisa fenotípica com a identificação genética dos isolados clínicos e ambientais é recomendado para complementar os dados apresentados. Estudos moleculares poderiam constituir um método auxiliar para uma melhor caracterização das diferenças ou semelhanças existentes entre linhagens oriundas de ambientes tão distintos.

## REFERÊNCIAS

ABDEL-MAWGOUD, A. M.; LÉPINE, F.; DÉZIEL, E. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 86, n. 5, p. 1323-1336, 2010.

ABDOUCHAKOUR, F. et al. Intraclonal variations of resistance and phenotype in *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clone ST308: A key to success within a hospital?. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 308, n. 2, p. 279-289, 2018.

AL-HAIDARI, R. A. et al. Anti-quorum sensing activity of some medicinal plants. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 13, n. 5, p. 67-71, 2016.

ARRUDA, K. L. S. **Resistência das *Pseudomonas* à ciprofloxacina e sua relação com a saúde ambiental**. 2013. 75 f. Monografia (Curso de Graduação em Engenharia Sanitária e Ambiental) – Universidade Federal de Santa Catarina, 2013.

BERNARDI, P. M. **Avaliação por microdiálise da penetração pulmonar da tobramicina em modelo de pneumonia por microrganismo formador de biofilme.** 2016. 127 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2016.

BERNARDO, S. P. C. **Avaliação da suscetibilidade a antimicrobianos e formação de biofilmes em *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de água mineral.** 2009. 53 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2009.

BRASIL. Resolução de Diretoria Colegiada – RDC – n.º 275, de 22 de setembro de 2005. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 23 set. 2005. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2005/rdc0275\\_22\\_09\\_2005.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2005/rdc0275_22_09_2005.html)> Acesso em: 17 dez. 2018.

BRASIL. Resolução de Diretoria Colegiada - RDC - n.º 173, de 13 de setembro de 2006. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fibrose Cística (FC). Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN), 2017. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/acoes-e-programas/programa-nacional-da-triagem-neonatal/fibrose-cistica-fc>>. Acesso em: 19 mai. 2018.

BROOKS, G. F. et al. **Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick & Adelberg.** 26. ed. Porto Alegre: AMGH, 2014. AMGH Editora, 2014.

BURROWS, L. L. *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility: type IV pili in action. **Annual Review of Microbiology**, v. 66, p. 493-520, 2012.

CHAVES, M. A. **Perfil de suscetibilidade em bastonetes gram negativos não fermentadores isolados de amostra de água superficial submetida a tratamento com antimicrobiano.** 2017. 76 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e Meio Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.

CIRAGIL, P.; SÖYLETİR, G. Alginate, elastase and alkaline protease production of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from various body sites. **Mikrobiyoloji bulteni**, v. 38, n. 4, p. 341-347, 2004.

COELHO, M. I. S. et al. Avaliação da qualidade microbiológica de águas minerais consumidas na região metropolitana de Recife, Estado de Pernambuco. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, v. 32, n. 1, p. 1-8, 2010.

DOS SANTOS, G. COLOMBO, T. E. Prevalência de *Pseudomonas aeruginosa* em águas e superfície. São José do Rio Preto. **Journal of the Health Sciences Institute**, v. 33, n. 4, p. 314-318, 2015.

FERREIRA, L. L. Estrutura clonal e multirresistência em *Pseudomonas aeruginosa*. 2005. 113 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2005.

FINLAYSON, E. A. BROWN, P. D. Comparison of antibiotic resistance and virulence factors in pigmented and non-pigmented *Pseudomonas aeruginosa*. **West Indian Medical Journal**, v. 60, n. 1, p. 24-32, 2011.

GOMES, A. F. T. **Implementação da ISO 16266 - Detecção e contagem de *Pseudomonas aeruginosa* em água de consumo por membrana de filtração.** 2017. 58 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar) – Universidade Nova de Lisboa, Portugal, 2017.

GOMES, T. P.; SANTANA, J. da S.; CARVALHO, L. R.. Avaliação microbiológica de água mineral comercializada no município de Itabuna-Bahia. **Electronic Journal of Pharmacy**, vol. XII, n. 4, p. 65-72, 2015.

GRUPO BRASILEIRO DE ESTUDOS DE FIBROSE CÍSTICA. Registro Brasileiro de Fibrose Cística 2015. Relatórios anuais (REBRAFC), 2016. Disponível em: <<http://portalgbefc.org.br/wp-content/uploads/2017/11/Registro2015.pdf>>. Acesso em: 19 mai. 2018.

HAVASI, V. et al. Inhibitory effects of hypertonic saline on *P. aeruginosa* motility. **Journal of Cystic Fibrosis**, v. 7, n. 4, p. 267-269, 2008.

HENTZER, M. et al. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by quorum sensing inhibitors. **The European Molecular Biology Organization Journal**, v. 22, n. 15, p. 3803-3815, 2003.

HESSE, C. et al. Genome-based evolutionary history of *Pseudomonas* spp. **Environmental microbiology**, v. 20, n. 6, p. 2142-2159, 2018.

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

KEARNS, D. B. A field guide to bacterial swarming motility. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 634, 2010.

LAILA, H. J. E. A.; SANTOS, R. C. V. Aspectos gerais e mecanismos moleculares envolvidos na formação de biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa*. **Disciplinarum Scientia Saúde**, v. 17, n. 1, p. 125-144, 2016.

LEE, J. et al. A cell-cell communication signal integrates quorum sensing and stress response. **Nature chemical biology**, v. 9, n. 5, p. 339, 2013.

LIMA, J. L. C. et al. Analysis of biofilm production by clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with ventilator-associated pneumonia. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 29, n. 3, p. 310-316, 2017.

LOPES, P. R. M. **Biorremediação de solo contaminado com óleo lubrificante pela aplicação de diferentes soluções de surfactante químico e biosurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* LBI**. 2014. 184 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” UNESP, Rio Claro, 2014.

MACIN, S. et al. Comparison of virulence factors and antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with and without cystic fibrosis. **Revista Romana de Medicina de Laborator**, v. 25, n. 4, p. 327-334, 2017.

MAGALHÃES, M. J. T. L. **Caracterização fenotípica e similaridade genética de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de efluentes hospitalares e água superficial do igarapé do Mindu/Manaus-AM**. 2013. 76 f. Dissertação (Mestrado em Saúde, Sociedade e Endemias na Amazônia) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2013.

MARQUES, D. R. A. **Prevalência e susceptibilidade de isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* numa unidade hospitalar de Portugal**. 2015. 70 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica Aplicada) – Universidade do Minho, Braga, 2015.

MICHON, A. et al. Advances toward the elucidation of hypertonic saline effects on *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients. **PloS one**, v. 9, n. 2, p. e90164, 2014.

NICASTRO, G. G. **Efeito dos reguladores de resposta PvrR e RcsB na motilidade, formação de biofilme e sua relação com a fímbria CupD de *Pseudomonas aeruginosa* PA14**. 2008. 69 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

NORA, S. T. R. **Diversidade genética de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas do trato respiratório de pacientes com fibrose cística**. 2014. 98 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, São Paulo, 2014.

OŁDAK, E.; TRAFNY, E. A. Secretion of proteases by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to ciprofloxacin. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 8, p. 3281-3288, 2005.

OLIVEIRA, R. M.; ALVES, F. Diversidade microbiana utilizada na biorremediação de solos contaminados por petróleo e derivados - Microbial diversity used in the bioremediation of soils contaminated by petroleum and oil products. **NBC-Periódico Científico do Núcleo de Biociências**, v. 3, n. 05, p. 01-14, 2013.

O'LOUGHLIN, C. T. et al. A quorum-sensing inhibitor blocks *Pseudomonas aeruginosa* virulence and biofilm formation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 44, p. 17981-17986, 2013.

OTTON, L. M. et al. Influence of twitching and swarming motilities on biofilm formation in *Pseudomonas* strains. **Archives of microbiology**, v. 199, n. 5, p. 677-682, 2017.

PARIGUANA, R. E. C; MONTOYA, R. C. **Bacteriocinas producidas por *Pseudomonas aeruginosa* y su acción inhibitoria frente a *Helicobacter pylori***. 2012. 88 f. Trabalho de Conclusão (Curso de Biologia) – Universidad Nacional de San Antonio Abad Del Cusco, 2012.

PEDROSA, A. et al. Pesquisa de fatores de virulência em *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de águas minerais naturais. **Ambiente & Água-An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v. 9, n. 2, p. 313-324, 2014.

PERESI, J. T. M. et al. *Pseudomonas aeruginosa*: ocorrência e suscetibilidade aos agentes antimicrobianos de isolados de amostras de água tratada utilizada em solução de diálise. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 70, n. 4, p. 542-547, 2011.

PRADO, R. R. et al. Resistência antimicrobiana de *Pseudomonas aeruginosa* em água mineral. **PUBVET**, v. 9, n. 3, p. 101-157, 2014.

RODRIGUES, A. C. **Atividade anti-quorum sensing de extratos de grumixama (*Eugenia brasiliensis*) e pitanga (*Eugenia uniflora* L.)**. 2015. 76 f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Nutrição) – Escola de Nutrição, Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais, 2015.

SANTOS, S. O. **Estudo de isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. multirresistentes do Hospital Universitário de Santa Maria**. 2014. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2014.

SIEGMUND, I; WAGNER F. New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth on mineral agar. **Biotechnology Letters**, v. 5, n. 4, p. 265-268, 1991.

SILVA, L. V. et al. Virulence attributes in Brazilian clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 304, n. 8, p. 990-1000, 2014.

SILVA, S. T. **Análise fenotípica e genética de fatores virulência de isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* multidroga-sensível e multidroga-resistente de Recife-PE**. 2016. 69 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016.

STEHLING, E. G. **Estudo comparativo dos fatores de virulência de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de fibrose cística e outras infecções**. 1999. 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

TANA, F. L. **Avaliação da expressão e do papel dos microRNAs mmu-miR-155-5p e mmu-miR-146b-5p durante a infecção pulmonar causada pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa***. 2017. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2017.

WANG, H. et al. Antibiotic resistance profiles and quorum sensing-dependent virulence factors in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Indian journal of microbiology**, v. 53, n. 2, p. 163-167, 2013.

WOLSKA, K.; KOT, B. Twitching motility activity, biofilm formation, and genetic typing for clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* by random amplified DNA PCR. **Acta microbiologica et immunologica Hungarica**, v. 60, n. 3, p. 313-328, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics**. Geneva: World Health Organization, 2017.

WU, H. et al. Effects of ginseng on *Pseudomonas aeruginosa* motility and biofilm formation. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 62, n. 1, p. 49-56, 2011.