

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA

ALÉXIA PINHEIRO MORAIS

ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE BIOFILME POR CEPAS DE
Pseudomonas aeruginosa* CARREANDO O GENE *aac(6')-Ib7

Uberlândia - MG

2021

ALÉXIA PINHEIRO MORAIS

**ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE BIOFILME POR CEPAS DE
Pseudomonas aeruginosa CARREANDO O GENE *aac(6')-Ib7***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado na forma de artigo ao Curso de Biologia da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito final para obtenção do título de Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Sabrina Royer

Uberlândia - MG

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA

ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE BIOFILME POR CEPAS DE *Pseudomonas*
aeruginosa CARREANDO O GENE *aac(6')-Ib7*

ALÉXIA PINHEIRO MORAIS

Orientadora: Profa. Dra. Sabrina Royer

Coorientador: Prof. Dr. Deivid William da Fonseca Batistão

Banca examinadora:

Profa. Dra. Sabrina Royer

Dra. Iara Rossi Gonçalves

Dra. Paola Amaral de Campos

Uberlândia - MG

2021

Dedico este trabalho, com muito carinho a Deus, aos meus pais e avós, que estiveram ao meu lado durante a realização deste grande sonho.

AGRADECIMENTOS

Não teria como iniciar esses agradecimentos sem antes mencionar a pessoa mais importante da minha vida, Deus. Esse sonho não teria se realizado se não fosse por meio d'Ele. Em todos esses cinco anos de graduação, pude experimentar da bondade do Senhor comigo, sempre me trazendo paz e me encorajando a nunca desistir. Quando eu me sentia fraca, ele vinha e me fortalecia, quando sentia medo ele vinha trazendo calma ao meu teimoso coração. Tiveram dias fáceis e dias difíceis, dias de lutas e dias de glória, e em todos eles eu sempre fui amparada e guardada pelo seu amor incondicional. Obrigada Aba, por me fortalecer e guardar todos os dias.

Agradeço aos meus pais André e Fernanda, irmão Vinicius, e aos meus avós Zolacir e Marli, por sempre apoiarem meus estudos e me encorajarem a nunca desistir de um futuro melhor através da educação. Muito do que sou hoje devo a eles, pois sempre me apoiaram de todas as formas, fazendo com que o sonho de se formar em uma universidade federal fosse real.

Agradeço também ao meu namorado Samuel Cota Teixeira, que desde o início esteve presente em todo meu processo de formação. Sempre disposto a ensinar com gentileza, amor e paciência.

Gostaria de agradecer a minha professora orientadora Sabrina Royer e ao meu professor coorientador Deivid William da Fonseca Batistão por todos os ensinamentos e pela enorme disposição em sempre me ajudar. Obrigada pela paciência e gentileza de sempre. Agradeço a Deus, pois além de orientadores espetaculares, os tenho como amigos que quero carregar em meu coração por toda a vida.

Aos meus amigos de curso, Rayane, Isabela, Maria Thereza, Taynara, César, Milena e Rafaela por fazerem da minha graduação uma experiência doce e agradável. Amo vocês.

A professora Dra. Rosineide Marques Ribas, e a técnica Dra. Cristiane Silveira de Brito por terem me recebido de braços abertos e pelas inúmeras possibilidades e oportunidades a mim oferecidas.

A todos os meus colegas do Laboratório de Microbiologia Molecular (Micromol) sob responsabilidade da Professora Dra. Rosineide Marques Ribas, que tanto me acolheram bem no período de realização dos meus projetos. Todos vocês tiveram uma contribuição impar em minha formação acadêmica.

Ao Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica de Varredura da Faculdade Engenharia Química da Universidade Federal de Uberlândia (FEQ-UFU), particularmente ao Dr. Rafael Heilbuth, pelas análises de MEV.

À Universidade Federal de Uberlândia (UFU), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro para que esse trabalho fosse realizado.

Por fim, agradeço grandemente à banca de avaliação da monografia composta pelas doutoras Paola Amaral de Campos e Iara Rossi Gonçalves por terem aceitado gentilmente o convite para compor a banca.

Muito obrigada!!

ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE BIOFILME POR CEPAS DE *Pseudomonas aeruginosa* CARREANDO O GENE *aac(6')-Ib₇*

Aléxia Pinheiro Morais^{1,*}; Deivid William da Fonseca Batistão²; Sabrina Royer¹.

¹Laboratório de Microbiologia Molecular, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

²Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

*Autor correspondente:

Sabrina Royer. Laboratório de Microbiologia Molecular, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia. Avenida Amazonas, S/N, Bloco 2B, Sala 214 (segundo andar), Campus Umuarama, Cep: 38.400-902. Uberlândia/MG, Brasil. Tel: +55 34 32258574. E-mail: sabrina.royer@ufu.br

Resumo

Nos últimos anos, o problema da resistência antimicrobiana em *Pseudomonas aeruginosa* tem se complicado. Em trabalhos prévios, nossa equipe evidenciou uma frequência elevada da variante do gene plasmidial *aac(6')-Ib₇* em amostras clínicas de *P. aeruginosa* extensivamente resistentes (XDR). Além dos genes de resistência, a virulência dessas cepas, particularmente a capacidade de produzir biofilme, contribui para sua persistência e disseminação nos hospitais. Este trabalho avaliou a capacidade de produção de biofilme de sete cepas de *P. aeruginosa* carreando o gene *aac(6')-Ib₇*. Para esta avaliação, foram selecionadas amostras isoladas de material clínico, positivas para o gene *aac(6')-Ib₇*, recuperadas de pacientes atendidos no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU) durante o ano de 2014. As sete amostras avaliadas aderiram à superfície de poliestireno não modificada no período de 2 horas, no entanto, em quantidades significativamente menores ($P < 0.001$) do que o controle positivo. Todas as amostras de *P. aeruginosa* apresentaram número superior de células viáveis após 24 horas de incubação quando comparadas ao ensaio de adesão. Quando comparadas com o controle no ensaio de enumeração de células viáveis, nenhuma das amostras apresentou diferença significativa. Adicionalmente, das sete amostras analisadas,

quatro (57%) apresentaram valores de biomassa superiores ao *cut-off* utilizado, sendo consideradas forte produtoras de biofilme, um isolado (14%) foi classificado como moderado produtor e duas (29%) amostras caracterizadas como fracas produtoras de biofilme. Nossos resultados demonstram que todas as amostras foram capazes de produzir biofilme, apesar dessa habilidade se apresentar de maneira distinta entre elas.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*. Biofilme. Infecções. Multirresistência.

Abstract

In recent years, the problem of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* has become more complicated. In previous work, our team evidenced a high frequency of the plasmid gene variant *aac(6')-Ib₇* in clinical samples of extensively drug-resistant *P. aeruginosa*. In addition to resistance genes, the virulence of these strains, particularly their ability to produce biofilm, contributes to their persistence and dissemination in hospitals. This work evaluated the biofilm production capacity of seven strains of *P. aeruginosa* carrying the *aac(6')-Ib₇* gene. For this evaluation, isolated samples of clinical material were selected, positive for the *aac(6')-Ib₇* gene, recovered from patients treated at the Clinical Hospital belonging to the Federal University of Uberlandia, during 2014. The seven strains evaluated adhered to the unmodified polystyrene surface within two hours, however, in significantly smaller amounts ($P < 0.001$) than the positive control. All *P. aeruginosa* strains showed a higher number of viable cells after 24 hours of incubation when compared to the adhesion assay. When compared with the control in the viable cell enumeration assay, none of the strains showed a significant difference. Additionally, of the seven strains analyzed, four (57%) had biomass values higher than the cut-off used, being considered strong biofilm producers, one isolate (14%) was classified as moderate producer and two (29%) were characterized as weak biofilm producers. Our results demonstrate that all strains could produce biofilm, despite this ability being presented differently among them.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*. Biofilm. Infections. Multidrug-resistant bacteria.

Financiamento: FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais).

Conflito de interesses: Os autores declaram não haver conflito de interesse.

Comitê de ética: Não aplicável.

Contribuição dos autores: Ensaio experimental (Aléxia Pinheiro Morais). Pesquisa bibliográfica e análise de dados (Aléxia Pinheiro Morais, Sabrina Royer e Deivid William da Fonseca Batistão). Elaborou e/ou revisou criticamente o trabalho (Aléxia Pinheiro Morais, Sabrina Royer e Deivid e William da Fonseca Batistão).

Introdução

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria Gram-negativa onipresente em ambientes hospitalares e que causa infecções agudas e crônicas, como pneumonia, infecções do trato urinário, bacteremia, bem como infecções fatais em indivíduos imunocomprometidos (Skariyachan et al. 2018). Além disso, *P. aeruginosa* é capaz de colonizar superfícies hospitalares incluindo materiais médicos como cateteres intravenosos e urinários, marcapassos cardíacos, drenos, implantes, válvulas cardíacas etc. (Bai et al. 2021).

Nos últimos anos, o problema da resistência antimicrobiana em *P. aeruginosa* tem se intensificado. Vários estudos relatam aumento na frequência de isolados com perfil multirresistente (MDR), extensivamente resistente (XDR) e pan-resistente (PDR) (Tam et al. 2010; Karaiskos, Giamarellou, 2014; Gonçalves et al. 2014). Em 2017, *P. aeruginosa* foi reconhecida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma das bactérias que confere o maior risco de vida aos pacientes, sendo listada como patógeno prioritário para pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos (OMS, 2017). As preocupações globais foram levantadas devido à tendência crescente de relatos de *P. aeruginosa* multirresistente (MDR) em infecções relacionadas à assistência à saúde (Naik et al. 2021).

Entre os inúmeros mecanismos de resistência descritos na literatura, a presença da enzima aminoglicosídeo-6'-N-acetiltransferase tipo Ib (AAC(6')-Ib) tem sido relatada em uma ampla diversidade de agentes patogênicos Gram-negativos. Essa enzima é capaz de modificar aminoglicosídeos como amicacina, gentamicina, tobramicina e canamicina (Durante-Magoni et al. 2009). Existe interesse particular na pesquisa da enzima AAC(6')-Ib não só pela sua onipresença, mas também por apresentar significativa micro heterogeneidade na extremidade N-terminal da proteína, e o gene codificador *aac(6')-Ib* estar muitas vezes presente em integrons, transposons, plasmídeos, ilhas genômicas e outros elementos genéticos móveis (Ramirez et al. 2013).

Além dos genes de resistência presente nas cepas, a virulência, particularmente a capacidade de produzir biofilme, contribui para sua persistência e disseminação nos hospitais (Yan et al. 2019). Os biofilmes caracterizam-se como uma comunidade complexa de bactérias que se aderem umas às outras, sendo capazes de se ligar a diferentes superfícies, sejam elas vivas, como tecidos humanos, ou inertes, como dispositivos médicos invasivos (Karygianni et al. 2020).

As células aderentes são envolvidas por uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), composta principalmente por polissacarídeos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos (Ghafoor et al. 2011). Esse estilo de vida microbiano permite que as bactérias suportem condições ambientais hostis, como a escassez de nutrientes, mudança de temperatura e dessecação (Rollet et al. 2009; Roy et al. 2016). As bactérias inseridas dentro de um biofilme podem escapar das respostas imunes do hospedeiro e resistir aos tratamentos antimicrobianos até 1000 vezes mais do que suas contrapartes planctônicas, as tornando capazes de causar uma ampla gama de doenças e infecções graves (Lewis et al. 2021).

Considerando as repercussões negativas da possível associação entre a produção de biofilme e a resistência extrínseca aos aminoglicosídeos, assim como uma frequência elevada da variante do gene plasmidial *aac(6')-Ib₇* presente em amostras clínicas de *P. aeruginosa* XDR, o objetivo deste trabalho foi investigar a capacidade de produção de biofilme em algumas amostras previamente genotipadas.

Materiais e métodos

Amostras bacterianas

Foram avaliadas 7 amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de material clínico recuperado de pacientes atendidos no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU) durante o ano de 2014, positivas para o gene *aac(6')-Ib₇*. As amostras fazem parte da bacterioteca do Laboratório de Microbiologia Molecular do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia. A tabela 1 apresenta dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais das amostras de *P. aeruginosa* utilizadas neste estudo. Destas amostras, 86% foram retiradas do ambiente hospitalar e 14% fora do ambiente hospitalar, sendo de origem comunitária. A maioria dos pacientes foram indivíduos masculinos (57%), sendo todos contaminados com o mesmo micro-organismo. A identificação e os testes de resistência

aos antimicrobianos foram realizados pelo Laboratório de Microbiologia do HC-UFU, utilizando o sistema automatizado VITEK 2[®] (bioMérieux).

Avaliação da produção de biofilme

Como controle positivo foi utilizado a amostra *P. aeruginosa* PAO-1 e como controle negativo a cepa *P. aeruginosa* PA103. A pesquisa de biofilme foi realizada de acordo com Merritt; Kadouri e O'Toole (2005). Todos os experimentos foram realizados em tréplica e repetidos em três ensaios independentes.

Preparação do inóculo bacteriano

Uma colônia bacteriana de cada amostra teste de *P. aeruginosa* foi suspensa em 20 mL de TSB (Tryptic Soy Broth) e incubada a 37°C, durante 18 horas (*overnight*), sob agitação a 120 rpm.

Ensaio de adesão a superfície inerte

A suspensão celular obtida pelo crescimento *overnight* ($\sim 10^9$ células/mL) foi lavada três vezes em solução salina estéril (20 mL NaCl 0,9%, 7800 rpm, 10 minutos) e diluída para uma concentração celular de aproximadamente 10^7 células/mL em TSB. 200 μ L dessa suspensão de células foi inoculada em microplacas de poliestireno estéreis com 96 poços, 3 poços para cada amostra testada. As placas foram incubadas por 2 horas a 37°C sob agitação a 120 rpm. Após o período de adesão, os poços foram raspados para remoção das células aderidas (*scrapping*). Diluições seriadas foram realizadas e as suspensões celulares plaqueadas em ágar TSA (Tryptic Soy Agar) para enumeração das células.

Contagem de células viáveis no biofilme

Foram realizados dois ensaios diferentes para formação de biofilme, um para enumeração de células viáveis do biofilme e outro para quantificação de biomassa. Após 24 horas de incubação, os poços foram raspados para remoção das células aderidas (*scrapping*)

por tempo determinado (1 minuto e 30 segundos). Diluições seriadas foram realizadas e as suspensões celulares plaqueadas em Agar TSA para enumeração das células.

Produção de biomassa

Para os ensaios de quantificação de biomassa por cristal violeta, cada bactéria teste foi inoculada em 8 poços da placa. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C sob agitação a 120 rpm. Os biofilmes foram lavados duas vezes com solução salina estéril e, em seguida, os poços foram preenchidos com metanol por 15 minutos para fixação do biofilme. Após esse período, o metanol foi descartado e as placas secas em posição invertida à temperatura ambiente. Em seguida, 200 µL de uma solução de cristal violeta 1% foram adicionados em cada poço por 5 minutos. Os poços foram lavados vigorosamente com água destilada estéril e secos à temperatura ambiente. 200 µL de solução de ácido acético 33% foram adicionados a cada poço para solubilizar o corante. A microplaca foi incubada por 10 minutos. 100 µL da solução de cristal violeta solubilizada foram transferidos para nova placa e a absorbância avaliada em leitor de microplacas a 570 nm com solução de ácido acético 33% como branco.

Classificação do biofilme

Após o experimento de quantificação da biomassa por cristal violeta, as amostras foram classificadas nas categorias de não produtor, produtor fraco, produtor moderado e forte produtor de biofilme, de acordo com os critérios descritos por Saxena e colaboradores (2014) (Tabela 2).

Formação de biofilme em esferas de vidro e análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As amostras 28RB, 132, 28B, 61P e 39B foram selecionadas para a análise da arquitetura dos biofilmes bacterianos em esferas de vidro por MEV, após resultados individuais nos ensaios de adesão e formação de biofilme em placas de poliestireno.

Seguiu-se o mesmo procedimento do ensaio de formação de biofilme, porém, para MEV, foram inseridas duas esferas de vidro padronizadas de 0,5 cm de diâmetro para cada amostra, uma por poço. Após formação de biofilme, as esferas foram fixadas em solução de glutaraldeído/paraformaldeído 2,5% a 4°C por 18 horas; lavadas em solução PBS (pH 7,4) por três vezes; armazenadas em solução de tetróxido de ósmio 1% por 2 horas a temperatura

ambiente; lavadas novamente em solução PBS (Phosphate Buffered Saline) (pH 7,4) por três vezes; desidratadas em álcool 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% e 100% (3 vezes), por 20 minutos cada, à temperatura ambiente, e em seguida levadas ao procedimento de secagem (ponto crítico). As esferas foram metalizadas com ouro na espessura de 20 nm, visualizadas e fotografadas utilizando o microscópio eletrônico de varredura CARL ZEISS MOD EVO MA10 disponível no Laboratório de Microscopia da Faculdade de Engenharia Química da UFU (FEQ-UFU).

Análise estatística

Os ensaios quantitativos foram comparados por meio de análise de variância simples (One way ANOVA) ou pelo teste de Kruskal-Wallis, utilizando como pós-testes os testes de comparação múltipla de Bonferroni ou Dunn's, quando apropriado. Todos os testes foram realizados com intervalo de confiança de 95% e considerados significativos quando $P < 0,05$. A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism[®], versão 5.01.

Resultados e discussão

Para avaliação da formação de biofilme, foram selecionadas amostras de *Pseudomonas aeruginosa* positivas para o gene *aac(6')-Ib₇*, sendo uma de origem comunitária e as demais de origem hospitalar (Tabela 1).

Todas as amostras avaliadas aderiram à superfície de poliestireno não modificada no período de 2 horas, no entanto, em quantidades significativamente menores ($P < 0,001$) do que o controle positivo (Fig. 1A). Todas as amostras de *P. aeruginosa* apresentaram número superior de células viáveis após 24 horas de incubação quando comparadas ao ensaio de adesão. Quando comparadas com o controle no ensaio de enumeração de células viáveis, nenhuma das amostras apresentou diferença significativa (Fig. 1B). Adicionalmente, quatro amostras (57,1%) apresentaram valores de biomassa superiores ao *cut-off* calculado de acordo com os critérios estabelecidos por Saxena e colaboradores (2014), sendo consideradas forte produtoras de biofilme; um isolado foi classificado como moderado produtor e as amostras 28B e 148 caracterizadas como fracas produtoras de biofilme ($0,238 \pm 0,1510$ e $0,270 \pm 0,1850$, respectivamente) (Fig. 1C, Tabela 3).

Atualmente no Brasil, os bacilos Gram-negativos multirresistentes, incluindo *P. aeruginosa*, têm surgido como os principais agentes de infecções relacionadas à assistência à saúde (Gonçalves et al. 2014; Royer et al. 2015). A presença de fatores de virulência, como a capacidade de formação de biofilme, pode contribuir para a emergência e a disseminação dos fenótipos multirresistentes no ambiente hospitalar. A formação de biofilme é crucial, não só para a sobrevivência do microrganismo no ambiente, mas também para o seu sucesso como patógeno oportunista (Vuotto et al. 2014).

Um aspecto importante a ser avaliado no processo de formação do biofilme é a adesão inicial do microrganismo à superfície, passo considerado essencial. Todas as amostras avaliadas neste estudo aderiram à superfície de poliestireno não modificada. Após a adesão as bactérias iniciam o processo de multiplicação e a síntese da matriz polimérica que compõe o biofilme (Thi et al. 2020).

A matriz do biofilme envolve as bactérias tornando-as tolerantes às condições adversas e ainda mais resistentes aos tratamentos antimicrobianos, desempenhando um papel significativo na persistência de infecções (Roy et al. 2016). A matriz atua como uma barreira à difusão dos agentes antimicrobianos, limitando sua penetração e os imobilizando. Ela é também responsável pela geração de gradientes nutricionais, o que pode resultar em declínio na taxa de crescimento e redução na atividade metabólica bacteriana, levando a um aumento da quantidade de células persistentes (metabolicamente inertes) (Rabin et al. 2015). Como a maioria dos β -lactâmicos e aminoglicosídeos são eficazes apenas contra células em crescimento, as células persistentes do biofilme resistem aos antimicrobianos e conseguem ultrapassar a matriz (Azam, Khan 2019).

A maioria dos estudos publicados avalia a produção de biofilme apenas pelo ensaio de cristal violeta, sem enumerar as células do biofilme (Azeredo et al. 2017). O ensaio de cristal violeta é uma medida indireta da biomassa do biofilme, composta pelas células bacterianas e a matriz polimérica e, apesar de sua versatilidade, é pouco reprodutível especialmente devido às etapas de lavagem, podendo subestimar ou superestimar os resultados (Azeredo et al. 2017). Nosso trabalho também avaliou o número de células viáveis no biofilme revelando que todos os isolados testados apresentam número considerável de células após 24 horas de incubação, resultado que sugere a limitação do ensaio de cristal violeta. Apesar das limitações associadas ao método, o cristal violeta continua sendo a técnica mais utilizada para a quantificação da biomassa do biofilme (Saxena et al. 2014; Azeredo et al. 2017).

Com a finalidade de avaliar a ultraestrutura do biofilme das amostras caracterizadas como forte produtoras de biofilme (28RB, 132, 61P e 39B), a microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada. No entanto, as imagens de MEV não foram capazes de corroborar os resultados observados nos ensaios anteriores, apresentando apenas bactérias aderidas à superfície inerte. Mesmo com as limitações do ensaio da microscopia, vale ressaltar que os resultados anteriormente encontrados são suficientes para indicar que as amostras são fortes produtoras de biofilme. Uma hipótese que pode explicar os resultados da MEV é a destruição da estrutura da matriz durante o processo de preparação das amostras (Azeredo et al. 2017). Adaptações da técnica podem resolver o problema e garantir a visualização da ultraestrutura do biofilme (Alhede et al. 2012).

Por fim, nosso estudo demonstra que a formação de biofilme parece ser um comportamento comum entre cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, ainda que exista variação entre elas, o que corrobora com achados prévios (Donlan, 2001; Dantas 2014; Fleming 2018). Essa observação refuta a hipótese de relação direta entre o gene *aac(6')-Ib7* e a produção de biofilme em *P. aeruginosa*.

Conclusões

O tratamento de infecções por *Pseudomonas aeruginosa* é desafiador pela multiplicidade de mecanismos de resistência apresentados por esse patógeno, o que é agravado por sua capacidade de formar biofilmes limitando a penetração dos antibióticos, de modo que a comunidade de células sésseis persiste mesmo na presença de antibióticos eficazes contra suas contrapartes planctônicas.

Apesar das limitações técnicas encontradas durante a execução do trabalho, este estudo demonstra que a formação de biofilme é uma característica prevalente entre as várias cepas de *P. aeruginosa* testadas, apesar dessa habilidade se apresentar de maneira distinta entre elas. A produção de biofilme por cepas de *Pseudomonas aeruginosa* extrinsecamente resistentes aos aminoglicosídeos, como as que carregam o gene *aac(6')-Ib7* certamente é um limitante para o tratamento de infecções causadas por esse genótipo.

Referências

Alhede M, Qvortrup K, Liebrechts R et al (2012). Combination of microscopic techniques reveals a comprehensive visual impression of biofilm structure and composition. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 65(2):335-42. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2012.00956.x>

Azam MW, Khan AU. Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa* (2019). *Drug Discov Today*. 24(1):350-359. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.07.003>

Azeredo J, Azevedo NF, Briandet R et al (2017). Critical review on biofilm methods. *Crit Rev Microbiol* 43(3):313-351. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2016.1208146>

Bai X, Nakatsu CH, Bhunia AK (2021). Bacterial Biofilms and Their Implications in Pathogenesis and Food Safety. *Foods*. 10(9):2117. <https://doi.org/10.3390/foods10092117>

Dantas RC, Ferreira ML, Gontijo-Filho PP, Ribas RM (2014). *Pseudomonas aeruginosa* bacteraemia: independent risk factors for mortality and impact of resistance on outcome. *J Med Microbiol*. 63(Pt12):1679-1687. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.073262-0>

Donlan RM (2001). Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 33(8):1387–1392. <https://doi.org/10.1086/322972>

Durante-Mangoni E, Grammatikos A, Utili R, Falagas ME (2009). Do we still need the aminoglycosides? *International Journal of Antimicrobial Agents*. 33 (3): 201-205. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.09.001>

Fleming D, Rumbaugh K (2018). The Consequences of Biofilm Dispersal on the Host. *Sci* 8, 10738. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29121-2>

Gonçalves PS, Marques M, Pereira J, Cardoso O (2014). Multidrug and Extensive Drug Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from a Portuguese Central Hospitas: 10-Years Survey. *Microbial Drug Resistance*, 0(0):2-7. <https://doi.org/10.1089/mdr.2014.0137>

Ghafoor A, Hay ID, Rehm BH (2011). Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture. *Appl Environ Microbiol.* 77(15):5238-46. <https://doi.org/10.1128/AEM.00637-11>

Karaiskos I, Giamarellou H (2014). Multidrug-resistant and extensively drug-resistant Gram-negative pathogens: current and emerging therapeutic approaches. *Expert Opin Pharmacother.* 15(10):1351-70. <https://doi.org/10.1517/14656566.2014.914172>

Karygianni L, Ren Z, Koo H, Thurnheer T (2020). Biofilm Matrixome: Extracellular Components in Structured Microbial Communities. *Trends Microbiol.* 28(8):668-681. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.03.016>

Lewis K (2021). Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 45(4):999-1007. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.4.999-1007.2001>

Merritt JH, Kadouri DE, O'Toole GA (2005). Growing and analyzing static biofilms. *Curr Protoc Microbiol.* 1:Unit 1B.1. <https://doi.org/10.1002/9780471729259.mc01b01s00>

Naik P, Pandey S, Gagan S et al (2021). Virulence factors in multidrug (MDR) and Pan-drug resistant (XDR) *Pseudomonas aeruginosa*: a cross-sectional study of isolates recovered from ocular infections in a high-incidence setting in southern India. *J Ophthalmic Inflamm Infect.* 11(1):36. <https://doi.org/10.1186/s12348-021-00268-w>

OMS (2017). Priorização de patógenos para orientar a descoberta, pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos para infecções bacterianas resistentes a medicamentos, incluindo tuberculose. Organização Mundial da Saúde. <https://www.apcd.org.br/index.php/noticias/766/em-foco/02-03-2017/oms-publica-lista-de-bacterias-para-as-quais-se-necessitam-novos-antibioticos-urgentemente>. Acessado em 04 de outubro de 2021.

Rabin N, Zheng Y, Opoku-Temeng C (2015). Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Med Chem.* 7(4):493-512. <https://doi.org/10.4155/fmc.15.6>

Ramirez MS, Nikolaidis N, Tolmasky ME (2013). Rise and dissemination of aminoglycoside resistance: the aac(6)-Ib paradigm. *Front Microbiol.* 17(4):121. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00121>

Rollet C, Gal L, Guzzo J (2009). Biofilm-detached cells, a transition from a sessile to a planktonic phenotype: a comparative study of adhesion and physiological characteristics in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett.* 290(2):135-42. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01415.x>

Roy R, Tiwari M, Donelli G, Tiwari V (2018). Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence.* 9(1):522-554. <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1313372>

Royer S, Faria AL, Seki L et al (2015). Spread of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* clones in patients with ventilator-associated pneumonia in an adult intensive care unit at a university hospital. *Brazilian Journal of Infectious Diseases.* 19(4):350-357. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2015.03.009>

Saxena S, Banerjee G, Garg R, Singh M (2014). Comparative Study of Biofilm Formation in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Patients of Lower Respiratory Tract Infection. *J Clin Diagn Res.* 8(5):09-11. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2014/7808.4330>

Skariyachan S, Sridhar VS, Packirisamy S (2018). Recent perspectives on the molecular basis of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* and approaches for treatment and biofilm dispersal. *Folia Microbiol.* 63(4):413-432. <https://doi.org/10.1007/s12223-018-0585-4>

Souli M, Galani I, Giamarellou H (2008). Emergence of extensively drug-resistant and pandrug-resistant Gram-negative bacilli in Europe. *Euro Surveill.* 20;13(47):19045.

Tam VH, Rogers CA, Chang KT (2010). Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia on patient outcomes. *Antimicrob Agents Chemother.* 54(9):3717-22. <https://doi.org/10.1128/AAC.00207-10>

Thi MTT, Wibowo D, Rehm BHA (2020). *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Int J Mol Sci.* 17;21(22):8671. <https://doi.org/10.3390/ijms21228671>

Vuotto C, Longo F, Pascolini C (2017). Biofilm formation and antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* urinary strains. *Journal of Applied Microbiology*. 123(4); 1003-1018. <https://doi.org/10.1111/jam.13533>

Yan S, Wu G (2019). Can Biofilm Be Reversed Through Quorum Sensing in *Pseudomonas aeruginosa*? *Front Microbiol*. 23(10):1582. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01582>

Tabela 1. Características das 7 cepas de *P. aeruginosa* carreando o gene *aac(6)-Ib7* utilizadas no estudo da produção de biofilmes

Identificação dos isolados	Data da coleta	Origem	Sítio de isolamento	Idade do paciente	Gênero	Diagnóstico de entrada	Unidade ¹	Fenótipo ²	CIM ³ ($\mu\text{g/mL}$)		MBL ⁶
									IMP ⁴	CIP ⁵	
148	2014	Comunitária	Fragmento de tecido	60	F	Exame	AMBC	não-MR	1	2	ND
132	2014	Hospitalar	Fragmento de tecido	70	M	Diabetes Mellitus	Psiquiatria	MR	>32	32	-
62	2014	Hospitalar	Pulmão	69	F	Hematoma Subdural	UTI A III	MR	>32	32	-
61P	2011	Hospitalar	Pulmão	26	M	Politraumatismo	UTI	MR	>32	16	-
28RB	2010	Hospitalar	Sangue	84	M	Insuficiência Renal	CM	MR	>32	32	-
28B	2009	Hospitalar	Sangue	38	F	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida	MI	MR	>32	16	VIM
39B	2010	Hospitalar	Sangue	38	M	Politraumatismo	UTI	MR	>32	16	-

¹AMBC, Ambulatório Central; UTI, Unidade de Terapia Intensiva; CM, Clínica Médica; MI, Enfermaria de Moléstias Infecciosas; ²MR, Multirresistente; ³CIM, Concentração inibitória mínima; ⁴IMP, Imipenem; ⁵CIP, Ciprofloxacina; ⁶MBL, Metallo- β -lactamase; ND, não determinado.

Tabela 2. Critérios para classificação da produção de biofilme

Valor médio da DO	Produção de Biofilme
$DO_i^1 \leq DO_c^2$	Não produtor
$DO_c < DO_i \leq 2 \times DO_c$	Fraco produtor
$2 \times DO_c < DO_i \leq 4 \times DO_c$	Moderado produtor
$4 \times DO_c < DO_i$	Forte produtor

Valor de *cut-off* da densidade ótica (DO): média da DO controle negativo + 3x desvio padrão; ¹DO_i da amostra; ²DO_c do controle negativo.

Tabela 3. Produção de biofilme e multirresistência das amostras de *P. aeruginosa*

Amostras (n=7)	D.O. ¹	Produção de biofilme	Fenótipo de Resistência²
<i>P. aeruginosa</i> PAO-1 (cepa controle)	0,81	Forte	MDR
28RB	0,76	Forte	MDR
132	1,53	Forte	MDR
28B	0,24	Fraco	MDR
62	0,55	Moderado	MDR
148	0,27	Fraco	não-MDR
61P	1,09	Forte	MDR
39B	1,07	Forte	MDR

¹Média da densidade óptica; ²MDR:multidrug-resistance, multirresistente.

LEGENDAS DAS FIGURAS

Fig. 1. Avaliação do número de células aderidas, formação de biofilme e biomassa em 7 amostras clínicas de *P. aeruginosa*. **(A)** Número de células aderidas em placas de poliestireno após 2 h de contato; **(B)** Concentração celular do biofilme; **(C)** Biomassa do biofilme expressa como densidade óptica do cristal violeta (DO_{570} nm). Resultados representam médias com desvio padrão (barras de erro) de três experimentos independentes. $*p<0,01$; $**p<0,001$, $***p<0,0001$, no teste de Kruskal-Wallis e comparação múltipla de Dunn. Amostra de *Pseudomonas aeruginosa* PAO-1 foi utilizada como controle.

Fig. 2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de amostras clínicas de *P. aeruginosa*, desenvolvidas na superfície de esferas de vidro após 24 horas de incubação. Células das amostras 61P **(A e B)** e 132 **(C e D)** aderidas à superfície.

Fig. 3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de amostras clínicas de *P. aeruginosa*, desenvolvidas na superfície de esferas de vidro após 24 horas de incubação. Células das amostras 28 RB **(A e B)** e 39B **(C e D)** aderidas à superfície.

Fig. 1

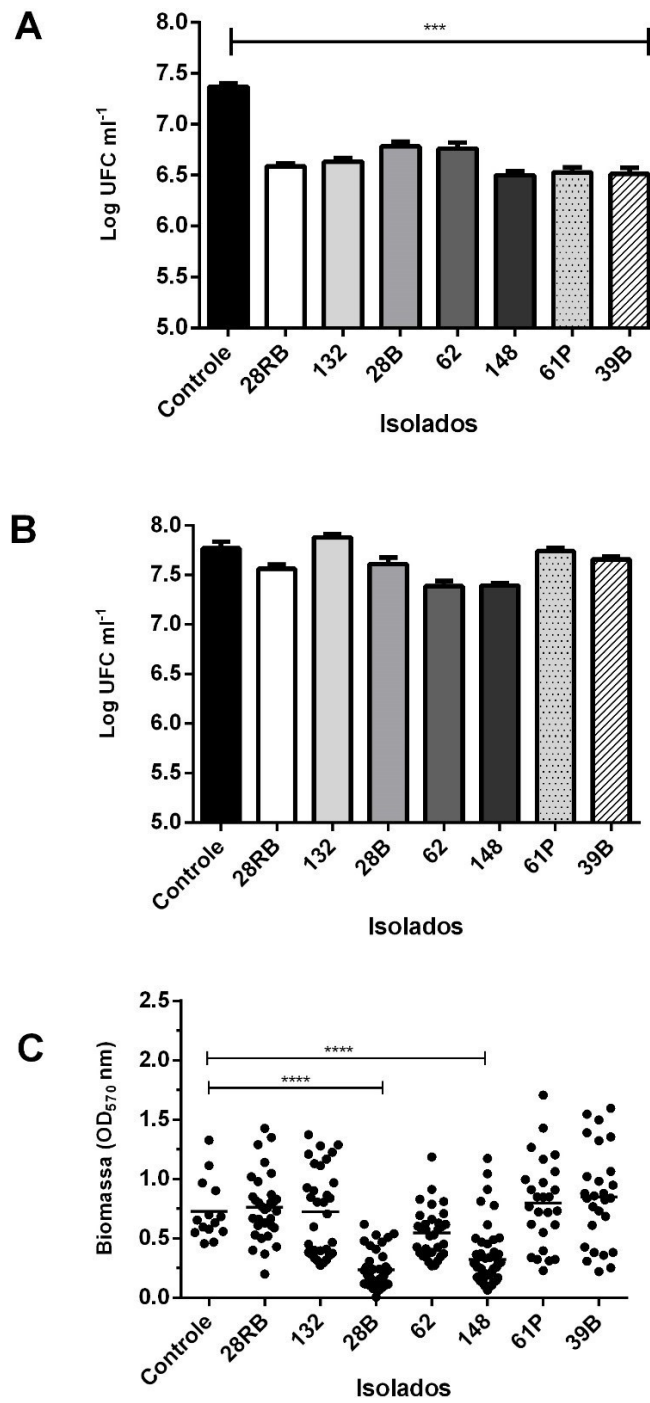


Fig. 2

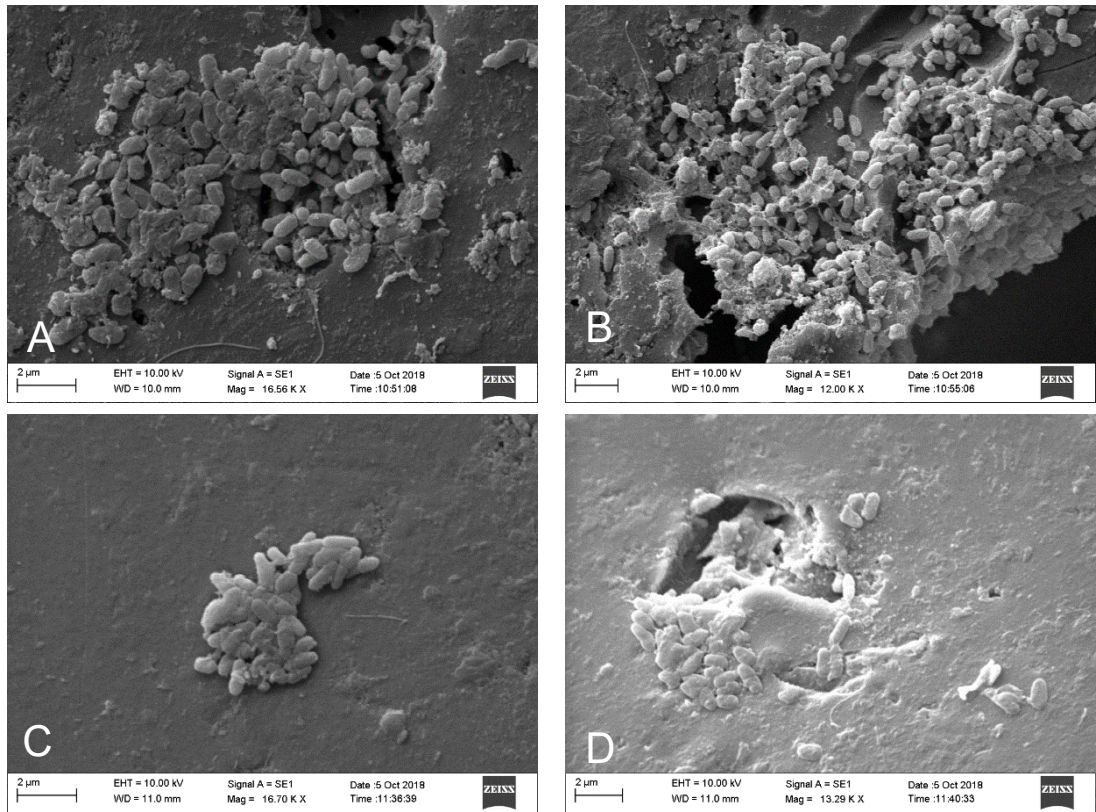
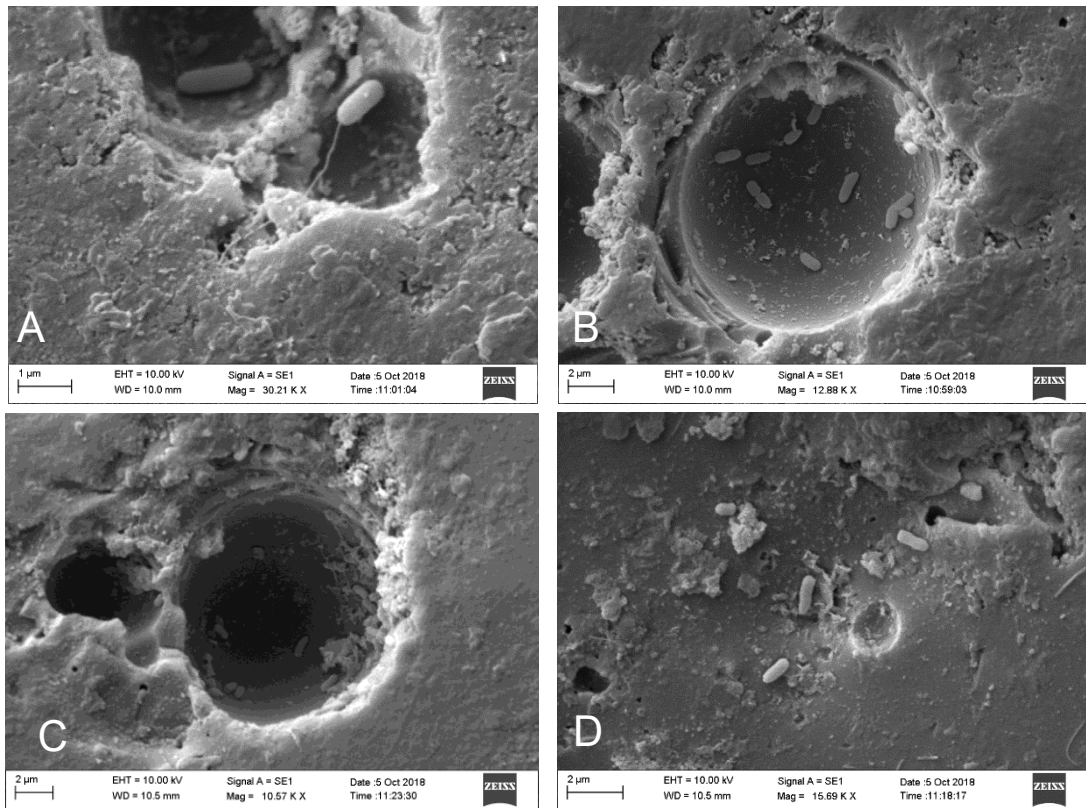
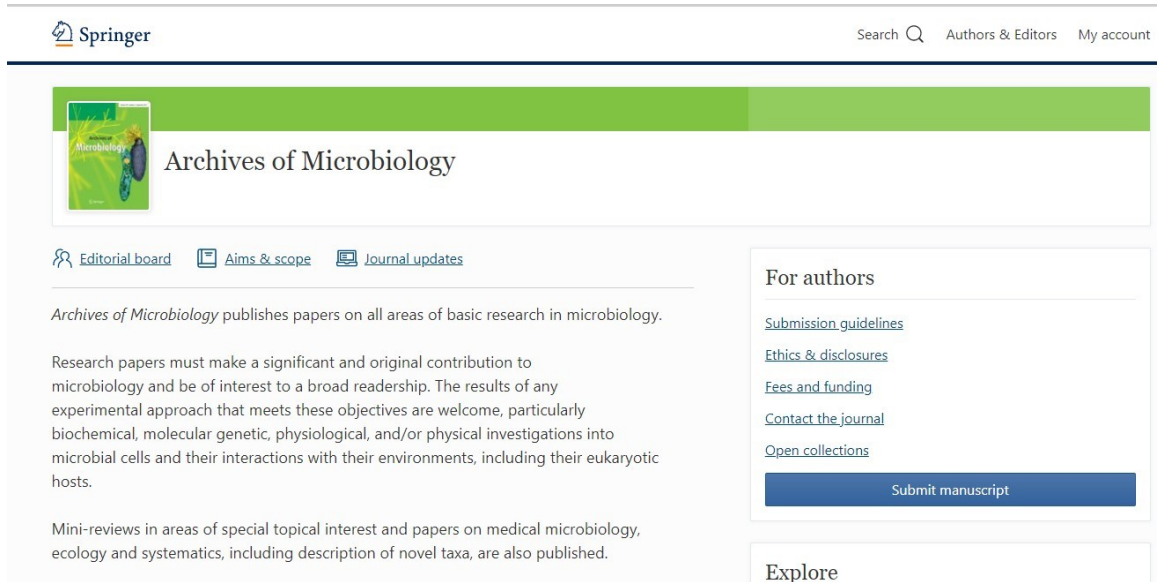


Fig. 3



Este Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) foi redigido sob a forma de artigo científico seguindo as normas da revista *Archives of Microbiology* (ISSN 0302-8933; <https://www.springer.com/journal/203/>).



The screenshot shows the Springer website for the journal *Archives of Microbiology*. At the top left is the Springer logo. At the top right are links for "Search", "Authors & Editors", and "My account". Below the header is a green banner with the journal's cover image on the left and the title "Archives of Microbiology" on the right. Underneath the banner are three navigation links: "Editorial board", "Aims & scope", and "Journal updates". The main content area is divided into two columns. The left column contains a paragraph stating that the journal publishes papers on all areas of basic research in microbiology, followed by a detailed description of the journal's scope: "Research papers must make a significant and original contribution to microbiology and be of interest to a broad readership. The results of any experimental approach that meets these objectives are welcome, particularly biochemical, molecular genetic, physiological, and/or physical investigations into microbial cells and their interactions with their environments, including their eukaryotic hosts." Below this is another paragraph: "Mini-reviews in areas of special topical interest and papers on medical microbiology, ecology and systematics, including description of novel taxa, are also published." The right column is titled "For authors" and contains several links: "Submission guidelines", "Ethics & disclosures", "Fees and funding", "Contact the journal", and "Open collections". At the bottom of this column is a blue button labeled "Submit manuscript". Below the "For authors" section is a section titled "Explore".