

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DOS FATORES DE VIRULÊNCIA DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *Pseudomonas aeruginosa* PRODUTORES DE KPC RECUPERADOS NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE LONDRINA NUM PERÍODO DE DEZ ANOS

Larissa dos Santos Fávaro¹, Suelen Balero de Paula-Petrolí², Camila Felipe de Moura³, Joyce Karoline Coimbra⁴, Floristher Elaine Carrara-Marroni⁵, Emerson José Venâncio⁶

¹ Acadêmica do Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Clínica e Laboratorial, Universidade Estadual de Londrina - UEL, Londrina - Paraná. Bolsista CAPES. larissa_favaro@hotmail.com

² Acadêmica do Curso de Pós-Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina - UEL, Londrina - Paraná. suelenbpetroli@gmail.com

³ Acadêmica do Curso de Farmácia, Universidade Estadual de Londrina - UEL, Londrina - Paraná. Bolsista Fundação Araucária. camilaf.moura@outlook.com

⁴ Acadêmica do Curso de Farmácia, Universidade Estadual de Londrina - UEL, Londrina - Paraná. joycekcoimbra@hotmail.com

⁵ Doutora, Departamento de Patologia, Análises Clínica e Toxicológica (PAC) do Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Estadual de Londrina - UEL, Londrina - Paraná. floristher@gmail.com

⁶ Orientador, Doutor, Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina - UEL, Londrina - Paraná. emersonjvst@gmail.com

RESUMO

Pseudomonas aeruginosa é reconhecida por sua elevada capacidade de adquirir determinantes de resistência aos antimicrobianos e de produzir um arsenal de fatores de virulência, os quais conferem a este microrganismo a habilidade de colonizar e infectar todos os tecidos. O objetivo desse estudo foi detectar os principais genes relacionados à virulência e determinar a expressão destes fatores em 24 isolados de *P. aeruginosa* produtores de KPC recuperados no Hospital Universitário de Londrina entre janeiro de 2008 e dezembro de 2017. Os genes codificadores de elastase (*lasB*), exoenzimas (*exoS*, *exoY*, *exoU*), fosfolipase hemolítica C (*plcH*), exotoxina A (*toxA*), alginato (*algD*), protease alcalina (*aprA*) e o componente do *quorum sensing* (*lasI*) foram investigados por PCR. A produção de proteases, gelatinase e hemolisinas foram avaliadas em ágar enriquecido com caseína de leite (2,0%), gelatina (12,0%) e sangue de carneiro (5,0%), respectivamente. A capacidade de formação de biofilme foi avaliada em microplacas de poliestireno e coloração com cristal violeta. Todos os isolados apresentaram os genes *exoY*, *lasB*, *plcH*, *algD*, *toxA* e *lasI*. Os genes *aprA*, *exoU* e *exoS* foram detectados em 87,5%, 50,0% e 37,5% dos isolados. A produção de hemolisina, protease e gelatinase ocorreu em 100,0%, 87,5% e 58,3% dos isolados, respectivamente. Todos os isolados produziram biofilme, dos quais 8,3%, 41,7% e 50,0% foram considerados fracos, moderados e fortes produtores de biofilme, respectivamente. A presença de isolados produtores de carbapenemases e de uma variedade de fatores de virulência reforça a necessidade de medidas de controles para evitar surtos de infecções por estes patógenos.

PALAVRAS-CHAVE: Carbapenemases; Fatores de virulência; *Pseudomonas aeruginosa*.

1 INTRODUÇÃO

Pseudomonas aeruginosa é um bacilo Gram-negativo não fermentador amplamente disseminado na natureza, encontrado em solo, plantas, água e animais, incluindo seres humanos (KLOCKGETHER; TÜMMLER, 2017). Trata-se de um patógeno oportunista humano que pode causar uma diversidade de infecções agudas e crônicas, como pneumonia, fibrose cística, infecções do trato urinário, bacteremia, infecções cutâneas e de tecidos moles, principalmente em indivíduos imunossuprimidos. A capacidade deste patógeno de causar diferentes infecções, inclusive em indivíduos saudáveis, é atribuída à combinação da sua versatilidade metabólica com sua intrínseca e/ou adquirida resistência aos antimicrobianos, aliada à sua capacidade de produção de um arsenal de fatores de virulência, os quais contribuem com a invasão bacteriana e toxicidade (PEREIRA, 2013; SILVA et al., 2014; POBIEGA et al., 2016; KARIMINIK et al., 2017).

Atualmente, as classes terapêuticas disponíveis para tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa* são: beta-lactâmicos, fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e

polimixinas. Dentre estes, os carbapenêmicos são comumente utilizados no tratamento de infecções graves devido estabilidade contra beta-lactamases de amplo espectro e permeabilidade a membrana externa bacteriana (SILVA et al., 2014; HONG et al., 2015). No entanto, atualmente tem-se observado resistência a múltiplas classes de antimicrobianos, que esta associada à redução das opções terapêuticas, aumento do risco de terapias empíricas inadequadas, taxas significativas de morbidade e mortalidade, bem como o aumento da duração da internação hospitalar e aumento dos custos hospitalares (GEISINGER; ISBERG, 2017; KAISER et al., 2017; ELLAPAN et al., 2018).

Sabe-se que alguns fatores de virulência colaboram com a colonização e outros auxiliam na invasão microbiana. Coadjuvantes aos mecanismos de resistência aos antimicrobianos, os fatores de virulência conferem características de aderência à e superfícies vivas e não vivas, podendo colonizar dispositivos médicos através da formação de biofilme (POBIEGA et al., 2016; ELLAPAN et al., 2018).

Alguns genes de virulência são coordenados através de sinalização química conhecida por *quorum sensing* (QS), incluindo a produção de proteases e exotoxinas (SABHARWAL et al., 2014). As proteases contribuem para a aderência e também para a virulência do microrganismo, levando à lesão tecidual. Além disso, pesquisas com AprA, mostraram que esta enzima também apresenta a capacidade de inativar componentes do complemento, como IgG e IgA, e degradar citocinas, incluindo interleucina 2 (IL-2), interferon γ (INF- γ) e fator de necrose tumoral α (TNF- α) (POBIEGA et al., 2016; BADAMCHI et al., 2017). As toxinas inibem a síntese proteica das células e leva à morte celular, envolvida na mediação da infecção local e sistêmica, favorecendo o processo de colonização e a invasão por necrose local dos tecidos, e está também associada a processos de imunossupressão, através da diminuição da atividade fagocítica por neutrófilos (FARAJI et al., 2016).

Estas proteases e toxinas são provenientes das cinco classes de sistemas secretórios (TSS) presentes em *P. aeruginosa* (T1SS, T2SS, T3SS, T5SS e T6SS). Através destes sistemas, a bactéria é capaz de secretar uma série de fatores de virulência, na sua maioria toxinas ou enzimas hidrolíticas, para o meio extracelular (T1SS, T2SS e T5SS) ou para o citosol das células do hospedeiro (T3SS e T6SS), que interagem com alvos específicos e produzem danos aos tecidos do hospedeiro, desempenhando um importante papel na patogênese (CROUSILLES et al., 2015). Destas, o T3SS, principal sistema de secreção neste patógeno, secreta diretamente no interior das células do hospedeiro quatro exoenzimas, das quais destaca-se ExoS e ExoU, cuja produção de cada uma determina uma lesão distinta no tecido do hospedeiro (AZIMI et al., 2016). A ExoS é a principal citotoxina envolvida nos processos de colonização, invasão e disseminação durante o processo infeccioso. Quando secretada diretamente no citosol das células epiteliais, interrompe a organização normal do citoesqueleto eucariótico e leva a morte celular por apoptose (AMIRMOZAFARI et al., 2016). A ExoU, por sua vez, é a citotoxina mais letal do T3SS sendo 100 vezes mais citotóxica que a ExoS, provocando a morte rápida das células eucarióticas onde é injetada, através da clivagem dos fosfolipídios da membrana plasmática com perda da integridade desta membrana. Esta exoenzima citotóxica pode estar associada ao choque séptico, aumento na severidade infecciosa e mortalidade associada à pneumonia (AMIRMOZAFARI et al., 2016).

A produção de biofilme, por sua vez, também é considerada um importante fator de virulência em diversos casos de infecção por *P. aeruginosa*, sendo responsável por infecções crônicas persistentes, bem como está associado à persistência e disseminação deste patógeno no ambiente hospitalar (KAISER et al., 2017; MORADALI et al., 2017). Considerado um "mecanismo" primário para sobrevivência bacteriana, por proteger as bactérias do estresse ambiental, o biofilme consiste em uma estrutura tridimensional composta por bactérias aderidas a um substrato biótico ou abiótico e entre si, envoltas por uma matriz de exopolissacarídeos, proteínas, lipídeos e DNA extracelular, cujo

crescimento em um contexto clínico é marcado pela resistência à resposta imunológica do hospedeiro e aos antimicrobianos, devido baixa difusão destes agentes na matriz do biofilme. Os exopolissacarídeos Psl, Pel e alginato são os maiores constituintes da matriz do biofilme, que em conjunto com o DNA extracelular determinam a arquitetura do biofilme (PEREIRA, 2013; DI DOMENICO et al., 2017; MORADALI et al., 2017). A composição dos exopolissacarídeos pode variar nos biofilmes e nos estágios do mesmo, sendo Psl e Pel característicos nas fases iniciais, enquanto o alginato (AlgD) é produzido durante a maturação conferindo um aspecto viscoso ou mucoso e garantindo a estabilidade estrutural, a proteção e a persistência do biofilme, além de também desempenhar o papel de adesina nas membranas mucosas, sobretudo em pacientes com fibrose cística (MORADALI et al., 2017; SINGH; KULHARIA, 2017).

No Hospital Universitário de Londrina (HU), estudos têm fornecido dados a respeito da epidemiologia molecular de determinantes de resistência aos antimicrobianos, no entanto, são escassos os dados a respeito da epidemiologia de determinantes de virulência nestes isolados. O objetivo deste estudo foi detectar molecularmente a presença de determinantes de virulência e determinar fenotipicamente a expressão de fatores de virulência em isolados de *P. aeruginosa* produtores de carbapenemases recuperadas de pacientes atendidos e/ou hospitalizados no HU entre janeiro de 2008 e dezembro de 2017.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ISOLADOS BACTERIANOS E SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

Foram selecionados 24 isolados clínicos de *P. aeruginosa* produtores de carbapenemases e portadores do gene *bla_{KPC}* recuperados de pacientes atendidos e/ou hospitalizados no HU no período de janeiro de 2008 e dezembro de 2017.

Os isolados foram previamente identificados por testes bioquímicos convencionais e por sistemas automatizados *MicroScan/Siemens*[®] (*Beckman Coulter, Inc.*, Indianapolis, IN, USA), *BD Phoenix*[™] (*Becton, Dickinson and Company*, Franklin Lakes, NJ, USA), *Vitek2*[®] (*bioMérieux*, Craponne, France) no Laboratório de Microbiologia Clínica do HU. A identificação molecular como *P. aeruginosa* foi confirmada por amplificação do rDNA 16S de acordo com Spilker e colaboradores (2004).

A avaliação da sensibilidade antimicrobiana foi realizada pelo método de disco-difusão e por sistemas automatizados. Os resultados foram analisados e interpretados de acordo com o CLSI (documentos M07-A9 e M100-S28). Os isolados foram classificados em multirresistentes (MR) ou extensivamente-resistentes (ER) aos antimicrobianos conforme as definições propostas por Magiorakos e colaboradores (2012).

2.2 DETECÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA

Os genes codificadores de virulência *lasB*, *plcH*, *exoS*, *exoU*, *exoY*, *toxA*, *lasI*, *algD* e *aprA* foram detectados por PCR conforme descrito anteriormente (LANOTTE et al., 2004; MITOV et al., 2010; SABHARWAL et al., 2014). As reações de PCR foram realizadas utilizando o *Top Taq Master Mix* (*Qiagen*, Germantown, MD, EUA) seguindo as instruções do fabricante.

2.3 DETECÇÃO FENOTÍPICA DE FATORES DE VIRULÊNCIA

Os isolados foram previamente cultivados em ágar *Muller-Hinton* a 37°C por 18h. A densidade celular foi ajustada para 1x10⁷ UFC/mL em caldo *Muller-Hinton* e este inóculo padrão foi utilizado nos testes. Os experimentos foram realizados em triplicata em três

ocasiões diferentes, exceto quando especificado. *P. aeruginosa* PA01 foi incluído em todos os testes.

2.3.1 Detecção Da Produção De Proteases

A produção de proteases foi avaliada utilizando o protocolo descrito por Sokol, Ohman e Iglewski (1979). Foram adicionados 10µL do inóculo padrão na superfície do meio contendo caseína de leite (2,0%), seguidos por incubação por 24h a 37°C. A atividade proteolítica foi observada pela presença de uma zona clara ao redor da colônia.

Colônias de cada isolado também foram inoculadas em tubos com ágar gelatina nutriente (*Becton, Dickinson and Company*, Sparks, USA), e incubadas a 37°C por até 7 dias. Após refrigeração a 4°C/1h, a presença de meio líquido indicou atividade proteolítica (CRUZ; TORRES, 2014).

2.3.2 Detecção Da Atividade Hemolítica

A atividade hemolítica em placas de ágar sangue foi testada pela inoculação de 10µL do inóculo padrão na superfície do meio ágar suplementado com 5,0% de eritrócitos de carneiro. As placas foram incubadas por 24h a 37°C e a presença de um halo translúcido ao redor do inóculo indicou atividade hemolítica (GEORGESCU et al., 2016).

2.3.3 Formação De Biofilme

A capacidade de produção de biofilme foi avaliada adicionando 200µL da suspensão padrão em uma placa de microtitulação de poliestireno de 96 poços de fundo chato. Poços de controle negativo contendo apenas caldo *Muller-Hinton* foram incluídos. As placas foram incubadas por 24h a 37°C sem agitação. Após o período de incubação, o meio foi aspirado e as células planctônicas foram removidas com solução salina tamponada com fosfato estéril (0,2M, pH 7,2). O biofilme foi fixado com metanol gelado durante 15 minutos e depois corado com solução de cristal violeta (1,0%). Após lavagem e secagem das placas, o cristal violeta foi ressuspensionado utilizando etanol-acetona (80:20 v/v) e a suspensão foi transferida para nova placa para realização da leitura em espectrofotômetro a 570nm (GEORGESCU et al., 2016). Os experimentos foram realizados em quintuplicatas em três diferentes ocasiões. A formação de biofilme foi interpretada segundo os critérios estabelecidos por Stepanovic e colaboradores (2000).

3 RESULTADOS

Do total de 24 isolados clínicos de *P. aeruginosa* previamente caracterizados como produtores de KPC, 17 (70,8%) foram recuperados de pacientes do sexo masculino e 7 (29,2%) do sexo feminino, com idade entre 19 e 97 anos e média de 58 anos. Os isolados foram obtidos de diversos materiais clínicos, como: urina (50,0%), secreção traqueal (33,3%), swab (8,3%), secreção de ferida cirúrgica (4,2%) e tecido (4,2%). Estes foram coletados, em sua maioria, de pacientes internados em unidades de tratamento intensivo (33,3%) e enfermarias clínicas (33,3%).

Tabela 1: Perfil de resistência e detecção (fenotípica e molecular) dos fatores de virulência em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* produtores de KPC recuperados entre os anos de 2008 e 2017 no Hospital Universitário de Londrina

Isolados	Perfil de resistência	Detecção fenotípica				Detecção molecular								
		Gelatinase	Protease	Hemolisina	Biofilme	<i>lasI</i>	<i>algD</i>	<i>plcH</i>	<i>aprA</i>	<i>lasB</i>	<i>toxA</i>	<i>exoY</i>	<i>exoS</i>	<i>exoU</i>
Pa 1461	ER				++									
Pa 1773	ER				++									
Pa 2188	ER				++									
Pa 2228	ER				+++									
Pa 2278	ER				++									
Pa 2611	ER				+++									
Pa 2622	ER				+++									
Pa 2641	ER				+++									
Pa 293/15	ER				++									
Pa 06/16	ER				++									
Pa 100/16	ER				++									
Pa 208/16	ER				+++									
Pa 240/16	MR				++									
Pa 363/16	MR				+++									
Pa 178/17	ER				+									
Pa 212/17	ER				+++									
Pa 262/17	ER				+++									
Pa 278/17	ER				+									
Pa 284/17	ER				++									
Pa 320/17	ER				+++									
Pa 379/17	ER				+++									
Pa 422/17	ER				+++									
Pa 424/17	ER				+++									
Pa 437/17	ER				++									

ER, extensivamente resistente aos antimicrobianos; MR, multirresistente aos antimicrobianos; Lacunas em preto, positivo; +, fraco produtor de biofilme; ++, moderadamente produtor de biofilme; +++, forte formador de biofilme.

Fonte: Dados da pesquisa

O teste de sensibilidade aos antimicrobianos mostrou altas taxas de resistência para a maioria dos antimicrobianos avaliados, incluindo os carbapenêmicos, cefalosporinas, monobactâmicos, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e penicilina associada com inibidor de beta-lactamases. Somente as polimixinas foram ativas contra estes patógenos (Gráfico 1). Destes isolados, 22 (91,7%) foram classificados como ER e 2 (8,3%) MR (Tabela 1).

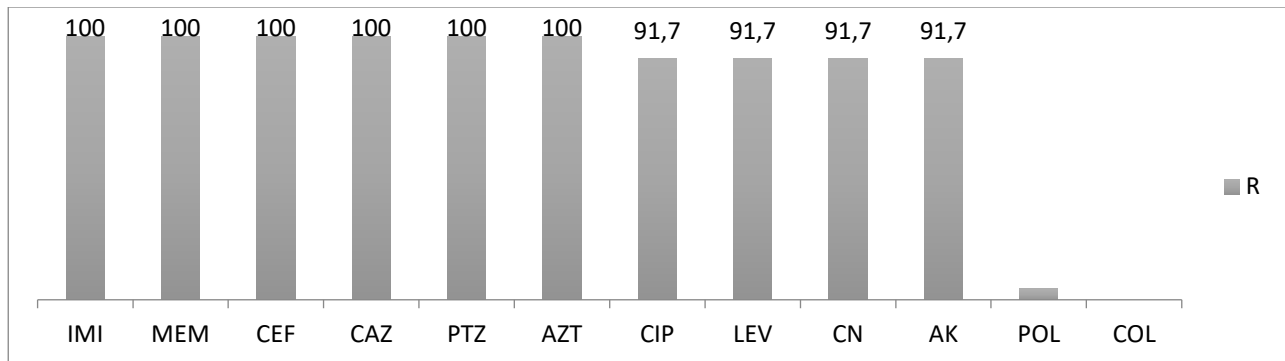


Gráfico 1: Taxas de resistência aos antimicrobianos utilizados na prática clínica para o tratamento de infecções causadas por *Pseudomonas aeruginosa*.

IMI, imipenem; MEM, meropenem; CEF, cefepime; CAZ, ceftazidima; PTZ, piperacilina-tazobactam; AZT, aztreonam; CIP, ciprofloxacina; LEV, levofloxacina; CN, gentamicina; AK, amicacina; POL, polimixina B; COL, colistina.

Fonte: dados da pesquisa

Todos os isolados apresentaram pelo menos um gene de virulência e 2 (8,3%) isolados apresentaram todos os genes pesquisados. Os genes *exoY*, *lasB*, *plcH*, *algD*, *toxA* e *lasI* foram detectados em todos os isolados. Os genes *aprA*, *exoU* e *exoS* foram detectados em 87,5%, 50,0% e em 37,5% dos isolados, respectivamente (Tabela 1).

A produção de hemolisina foi o fator de virulência mais observado nos isolados (100,0%). Um total de 21 isolados (87,5%) foram produtores de protease e 14 foram produtores de gelatinase (58,3%). Todos os isolados foram capazes de formar biofilme em superfície abiótica, dos quais 2 (8,3%), 10 (41,7%) e 12 (50,0%) isolados foram considerados fracos, moderados e fortes produtores de biofilme, respectivamente (Tabela 1).

4 DISCUSSÃO

P. aeruginosa é uma bactéria oportunista dotada de diversos fatores de virulência e mecanismos de resistência intrínsecos e/ou adquiridos responsável por causar uma variedade de infecções hospitalares, especialmente em pacientes imunossuprimidos (AMIRMOZAFARI et al., 2016; FARAJI et al., 2016). No presente estudo, uma alta prevalência de isolados de *P. aeruginosa* MR (PA-MR) e ER produtores de KPC foi detectada em nosso hospital. A crescente prevalência de PA-MR no ambiente clínico é um problema global, que leva a limitação das opções terapêuticas para infecções causadas por esta bactéria. Até alguns anos atrás, os carbapenêmicos eram eficientes no tratamento de infecções por PA-MR, devido à sua potente atividade contra este patógeno. No entanto, a exposição excessiva a este antimicrobiano e a outras classes podem levar ao desenvolvimento de resistência, seja por mutações cromossômicas ou transferência lateral de genes (MOREIRA et al., 2013; LABARCA et al., 2016; ELLAPAN et al., 2018).

Além da produção de genes codificadores de carbapenemases, estudos recentes têm demonstrado que a expressão de um grande número de fatores de virulência por isolados clínicos de *P. aeruginosa* interferem diretamente na patogênese das infecções causadas por esse patógeno (GOLOVKINE et al., 2014; ELLAPAN et al., 2018). Estes

fatores conferem à bactéria a capacidade de causar lesão tecidual, interferir na resposta imune do hospedeiro, afetando atividade fagocitária, e produzir barreira protetora aos antimicrobianos (SILVA et al., 2014).

LasI é uma proteína auto indutora do QS, um sistema de comunicação dependente da densidade celular que está envolvido na regulação de fatores de virulência como a produção de exoenzimas (LasB, LasA, AprA e ToxA), adesão bacteriana e formação de biofilme, cuja expressão pode variar com o curso da infecção, o sítio anatômico, o perfil de sensibilidade dos isolados e até mesmo de acordo com o tratamento das infecções (SABHARWAL et al., 2014; SILVA et al., 2014; CROUSILLES et al., 2015; RASAMIRAVAKA et al., 2016). Sabharwal e colaboradores (2014) observaram o gene *lasI* em 75,0% dos isolados estudados, taxa inferior ao presente trabalho.

As atividades enzimáticas de proteases e elastases são importantes fatores de virulência durante a interação de *P. aeruginosa*-hospedeiro e contribuem para o estabelecimento do processo infeccioso (GELATTLY; HANCOCK, 2013). O gene codificador da elastase (*lasB*) foi detectado em todos os isolados analisados, assim como observado em outros estudos (MITOV et al., 2010; NIKBIN et al., 2012; SAFREN et al., 2015), e apresentando uma taxa superior ao detectado por Badamchi e colaboradores (2017) e Pobiega e colaboradores (2016) que detectaram *lasB* em 92,9% e 80,8% dos isolados, respectivamente. A prevalência deste gene nos isolados clínicos estudados implica a importância de um fator de sobrevivência de *P. aeruginosa* em várias configurações, uma vez que confere a capacidade de degradar diferentes proteínas, como colágeno, elastina e outras proteínas estruturais das células (COTAR et al., 2013; NEWMAN et al., 2017; BENIE et al., 2017).

O gene *toxA*, assim como o *lasB*, foi encontrado em todos os isolados clínicos. Esta exotoxina é membro do T2SS e tem como alvo a inibição da síntese proteica (FARAJI et al., 2016). Um estudo feito por Amirmozafari e colaboradores (2016), mostrou que distribuição de isolados codificando o gene *toxA* foi variável de acordo com o tipo de infecção, sendo mais prevalente em isolados de feridas (91,4%). Este resultado é consistente com outros que relatam taxas de 80,0 a 100,0% deste gene em isolados clínicos de *P. aeruginosa* (SADEGHIFARD, et al., 2012; COTAR et al., 2013; ASLANI, et al., 2014).

Foi observada em nosso estudo atividade proteolítica na maioria dos isolados avaliados. Além disso, estudos apontam que microrganismos produtores de proteases promovem atraso da cura de feridas devido lesão tecidual causada pela ação em componentes da matriz extracelular como elastina, colágeno, fibrina e fibronectina, além da atuação no sistema imunológico agindo em imunoglobulinas, interferon-gama (INF- γ), fator de necrose tumoral (TNF), e proteínas do complemento. (SILVA et al., 2014; GALDINO et al., 2016; GEORGESCU et al., 2016).

A fosfolipase hemolítica codificada pelo gene *plcH* é responsável pela hidrólise de lipídios das membranas celulares e do pulmão, cuja produção está associada ao prolongamento do período de internação dos pacientes, uma vez que estas enzimas são coadjuvantes na extensão de lesões nos tecidos (SILVA et al., 2014; FADHIL et al., 2016; GEORGESCU et al., 2016). No presente estudo foi observada uma elevada taxa de detecção do gene *plcH*, assim como do número de isolados que apresentaram atividade hemolítica no sangue de carneiro. Este resultado é consistente com outros estudos que apresentam frequência de 75,0% a 96,9% (MITOV et al., 2010; SABHARWAL et al., 2014; SAFREN et al., 2015), e foram superiores ao observado por Badamchi e colaboradores (2016) que obtiveram uma taxa de detecção do gene de 38,8% em isolados de *P. aeruginosa*. Adicionalmente, Georgescu e colaboradores (2016) também observaram elevada produção de hemolisina, 83,33% dos isolados, sendo este o segundo fator mais expressado no estudo.

Neste estudo, foram identificadas três genes codificadores destas proteínas efetoras: *exoU*, *exoS* e *exoY*. Destas, a *ExoY* foi a mais prevalente, estando este resultado de acordo com outros estudos que relatam que esta exoenzima encontra-se presente na maioria das cepas de *P. aeruginosa*. As taxas obtidas na detecção de *exoU*, exotoxina relacionada a citotoxicidade, são semelhantes a outros estudos, que relatam prevalência variando de 10% a 40%, no entanto, para *exoS* foram inferiores, uma vez que na literatura é relatada uma prevalência de 60% a 90% em isolados clínicos de *P. aeruginosa* (FERREIRA et al., 2015; AZIMI et al., 2016).

Semelhante a outros estudos, todos os isolados avaliados foram capazes de formar biofilme em superfície de poliestireno neste estudo (SILVA et al., 2014; MERADJI et al., 2016; DI DOMENICO et al., 2017). Considerado um importante fator de virulência em *P. aeruginosa*, esta estrutura atua como uma barreira contra a penetração de antimicrobianos, dificultando o tratamento de infecções. Além disso, sua formação confere proteção à resposta imune do hospedeiro, efeitos danosos de espécies reativas de oxigênio e radiação ultravioleta (DI DOMENICO et al., 2017; KAISER et al., 2017). Devido à extrema resistência das células do biofilme, acredita-se que a maioria das infecções crônicas persistentes estejam associadas a este fenótipo (KIM; LEE, 2016). Consequentemente, estudos têm demonstrado que o biofilme apresenta um enorme impacto nos cuidados à saúde e estão associados a 65,0% das infecções em pacientes em unidades de terapia intensiva (UTI). Outros têm mostrado que sua formação é maior em cepas MR (GUPTA et al., 2016) e identificaram padrões de variação fenotípica em isolados ER de acordo com o seu sítio de isolamento, com isolados de fibrose cística apresentando níveis mais altos de formação de biofilmes (KAISER et al., 2017). Outros ainda têm demonstrado associação de forte formação de biofilme em isolados produtores de beta-lactamases (GONÇALVES et al., 2017).

5 CONCLUSÃO

Estudos como este visam buscar respostas para o problema de saúde global instalado por microrganismos patogênicos produtores de fatores de virulência e mecanismos de resistência. Foi observado que os isolados produtores de carbapenemases apresentaram resistência à maioria dos agentes antimicrobianos clinicamente disponíveis. Nossos resultados também mostraram que os isolados produtores de carbapenemase exibem uma capacidade variável de produzir diferentes determinantes de virulência. O perfil de resistência e a presença de fatores de virulência são aspectos de grande preocupação que exigem controle para evitar a disseminação desses isolados resistentes a carbapenêmicos.

REFERÊNCIAS

AMIRMOZAFARI N.; MEHRABADI J. F.; HABIBI A. Association of the Exotoxin A and Exoenzyme S with Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas Aeruginosa* Strains. **Archives of Iranian Medicine**, v. 19, n. 5, p. 353-358, 2016.

ASLANI MM NV.; SHARIFI Z.; HASHEMIPOUR M.; SHAHEHERAGHI F.; EBRAHIMIPOUR G. H. Molecular identification and detection of virulence genes among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from different infectious origins. **Iranian Journal of Microbiology**, v. 2, n. 3, p. 118-123, 2014.

AZIMI S.; KAFIL H.S.; BAGHI H.B.; SHOKRIAN S.; NAJAF K.; ASGHARZADEH M.; YOUSEFI M.; SHAHRIVAR F.; AGHAZADEH M. Presence of *exoY*, *exoS*, *exoU* and *exoT* genes, antibiotic resistance and biofilm production among *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Northwest Iran. **Hygiene and Infection Control**, v. 11, p. 1-6, 2016.

BADAMCHI A.; MASOUMI H.; JAVADINIA S.; ASGARIAN R.; TABATABAEE A. Molecular detection of six virulence genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolates detected in children with urinary tract infection. **Microbial Pathogenesis**, n. 107, p. 44-47, 2017.

BENIE C.K.; DADIÉ A.; GUESSENND N.; N'GBESSO-KOUADIO N.A.; KOUAME N.D.; N'GOLO D.C.; AKA S.; DAKO E.; DJE K.M.; DOSSO M. Characterization of Virulence Potential of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Bovine Meat, Fresh Fish, and Smoked Fish. **European Journal of Microbiology and Immunology**, v. 7, n. 1, p.55-64, 2017.

COTAR A. I.; CHIFIRIUC M. C.; BANU O.; LAZAR V. Molecular characterization of virulence patterns in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from respiratory and wound samples. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 3, p. 551-558, 2013.

CROUSILLES A.; MAUNDERS E.; BARTLETT S.; FAN C.; UKOR E. F.; ABDELHAMID Y.; BAKER Y.; FLOTO A.; SPRING D. R.; WELCH M. Which microbial factors really are important in *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Future Microbiology**, v. 10, n. 11, p. 1825-1836, 2015.

CRUZ, T. E. E.; TORRES, J. M. O. **Gelatin hydrolysis test protocol**. Washington: Microbial Library American Society for Microbiology, 2012. Disponível em: <<http://www.microbelibrary.org/library/laboratory-test/3776-gelatinhydrolysis-test-protocol>>. Acesso em: 08 jun. 2019.

DI DOMENICO E.G.; FARULLA I.; PRIGNANO G.; GALLO M.T.; VESPAZIANI M.; CAVALLO I.; SPERDUTI I.; PONTONE M.; BORDIGNON V.; CILLI L.; DE SANTIS A.; DI SALVO F.; PIMPINELLI F.; LESNONI LA PAROLA I.; TOMA L.; ENSOLI F. Biofilm is a Major Virulence Determinant in Bacterial Colonization of Chronic Skin Ulcers Independently from the Multidrug Resistant Phenotype. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 5, 2017.

ELLAPPAN K.; BELGODE NARASIMHA H.; KUMAR S. Coexistence of multidrug resistance mechanisms and virulence genes in carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from a tertiary care hospital, South India. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 12, p. 37-43, 2018.

- FADHIL L.; AL-MARZOQI A.H.; ZAHRAA M.A.; SHALAN A.A. Molecular and phenotypic study of virulence genes in a pathogenic strain of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from various clinical origins by PCR: profiles of genes and toxins. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, v. 7, p. 590-598, 2016.
- FARAJI, F.; MAHZOUNIEH, M.; EBRAHIMI, A.; FALLAH, F.; TEYMOURNEJAD, O.; LAJEVARDI, B.; Molecular detection of virulence genes in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from children with Cystic Fibrosis and burn wounds in Iran. **Microbial Pathogenesis**, v. 99, p.1-4, 2016.
- FERREIRA M.L.; DANTAS R.C.; FARIA A.L.S.; GONÇALVES I.R.; BRITO C.S.; QUEIROZ L.L.; GONTIJO P.P.; RIBAS R.M. Molecular epidemiological survey of the quinolone and carbapenem-resistant genotype and its association with the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 64, p. 262–271, 2015.
- GALDINO A.C.M.; VIGANOR L.; ZICCARDI M.; NUNES A.P.F.; SANTOS K.R.N.; BRANQUINHA M.H.; SANTOS A.L.S. Heterogeneous production of proteases from Brazilian clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**. v. 35, n. 7, 2016.
- GEISINGER E.; ISBERG R.R. Interplay Between Antibiotic Resistance and Virulence During Disease Promoted by Multidrug-Resistant Bacteria. **Journal of Infectious Diseases**, v. 215, p. S9-S17, 2017.
- GEORGESCU M.; GHEORGHE I.; CURUTIU C.; LAZAR V.; BLEOTU C.; CHIFIRIUC M. C. Virulence and resistance features of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from chronic leg ulcers. **BMC Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, p. 4-28, 2016.
- GOLOVKINE G.; FAUDRY E.; BOUILLOT S.; VOULHOUX R.; ATTRÉE I.; HUBER P. VE-cadherin cleavage by LasB protease from *Pseudomonas aeruginosa* facilitates type III secretion system toxicity in endothelial cells. **PLOS Pathogens**, v. 10, 2014.
- GONÇALVES I.R.; DANTAS R.C.C.; FERREIRA M.L.; BATISTÃO D.W.F.; GONTIJO-FILHO P.P.; RIBAS R.M. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: association with virulence genes and biofilm formation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 2, p.211-217, 2017.
- GUPTA R.; MALIK A.; RIZVI M., AHMED S.M.; Incidence of multidrug-resistant *Pseudomonas* spp. in ICU patients with special reference to ESBL, AMPC, MBL and biofilm production. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 8, p.25-31, 2016.
- HONG D.J.; BAE I.K.; JANG I.H.; JEONG S.H.; KANG H.K.; LEE K. Epidemiology and Characteristics of Metallo- β -Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa*. **Infection and Chemotherapy**, v. 47, p. 81-97, 2015.
- KAISER S.J.; MUTTERS N.T.; DEROSA A.; EWERS C.; FRANK U.; GÜNTHER F.; Determinants for persistence of *Pseudomonas aeruginosa* in hospitals: interplay between resistance, virulence and biofilm formation. **European Journal Of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 36, n. 2, p.243-253, 2017.

KARIMINIK A.; BASERI-SALEHI M.; KHEIRKHAH B. *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing modulates immune responses: An updated review article. **Immunology Letters**, v. 190, p.1-6, 2017.

KIM S.K.; LEE J.H. Biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Microbiology**, v. 54, p. 71-85, 2016.

KLOCKGETHER J.; TÜMMLER B. Recent advances in understanding *Pseudomonas aeruginosa* as a pathogen. **F1000Res**, v. 6, p. 1261, 2017.

LABARCA J.A.; SALLES M.J.; SEAS C.; GUZMÁN-BLANCO M. Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in the nosocomial setting in Latin America. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 42, p. 276-92, 2016.

LANOTTE P.; WATT S.; MEREGHETTI L.; DARTIGUELONGUE N.; RASTEGAR-LARI A.; GOUDEAU A.; QUENTIN R. 2004. Genetic features of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients compared with those of isolates from other origins. **Journal of Medical Microbiology**, v. 53, p. 73-81, 2004.

MAGIORAKOS A.P.; SRINIVASAN A.; CAREY R.B.; CARMELI Y.; FALAGAS M.E.; GISKE C.G.; HARBARTH S.; HINDLER J.F.; KAHLMETER G.; OLSSON-LILJEQUIST B.; PATERSON D.L.; RICE L.B.; STELLING J.; STRUELENS M.J.; VATOPOULOS A.; WEBER J.T.; MONNET D.L. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 3, p. 268- 281, 2012.

MERADJI S.; BARGUIGUA A.; BENTAKOUK M.C.; NAYME K.; ZEROUALI K.; MAZOUZ D.; CHETTIBI H.; TIMINOUNI M. Epidemiology and virulence of VIM-4 metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients in eastern Algeria. **Burns**, v. 42, n. 4, p. 906-918, 2016.

MITOV I.; STRATEVA T.; MARKOVA B. Prevalence of virulence genes among Bulgarian nosocomial and cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 588-595, 2010.

MORADALI M.F.; GHODS S.; REHM B.H. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. 39, 2017.

MOREIRA M.R.; GUIMARÃES M.P.; RODRIGUES A.A.A.; GONTIJO P.P. Antimicrobial use, incidence, etiology and resistance patterns in bacteria causing ventilator-associated pneumonia in a clinical-surgical intensive care unit. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 46, p. 39–44, 2013.

NEWMAN J.W.; FLOYD R.V.; FOTHERGILL J.L. The contribution of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors and host factors in the establishment of urinary tract infections. **FEMS Microbiology Letters**, v. 364, n. 5, 2017.

NIKBIN V.S.; ASLANI M.M.; SHARAFI Z.; HASHEMIPOUR M.; SHAHCHERAGHI F.; EBRAHIMIPOUR G.H. Molecular identification and detection of virulence genes among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from different infectious origins. **Iranian Journal of Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 118-123, 2012.

PEREIRA S.M.S.G. *Pseudomonas aeruginosa* em ambiente termal Prevalência e determinantes de patogenicidade. 2013. 176 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, Coimbra, 2013.

POBIEGA M.; MACIAG J.; POMORSKA-WESOLOWSKA M.; CHMIELARCZYK A.; ROMANISZYN D.; ZIOLKOWSKI G.; HECZKO P.; WOJKOWSKA-MACH J.; BULANDA M. Urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* among children in Southern Poland: Virulence factors and antibiotic resistance. **Journal of Pediatric Urology**, v. 12, n. 1, p.36.1-36.6, 2016.

RASAMIRAVAKA T.; JAZIRI M.E. Quorum-Sensing Mechanisms and Bacterial Response to Antibiotics in *P. aeruginosa*. **Current Microbiology**, v. 73, n. 5, p. 747-753, 2016.

SABHARWAL N.; DHALL S.; CHHIBBER S.; HARJAI K. Molecular detection of virulence genes as markers in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from urinary tract infections. **International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics**, v. 5, n. 3, p. 125-134, 2015.

SADEGHIFARD N.V.H.; TABATABAEI R.R.; MALEKI A. A study on the frequency of toxin a, alginate genes, and of clinical *Pseudomonas aeruginosa* strains. **Ilam University of Medical Sciences**. v. 20, n. 1, p. 58-64, 2012.

SAFREN S.R.; RACHMAN A.R.; KQUEEN C.Y.; ZAKARIA Z.A.; SUHAILI Z.; TAIB N.M.; DESA M.N.M. Comparative Phenotypic and Genotypic Properties of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Clinical and Environmental Sources. **Environmental and Occupational Health Journal**, v. 1, n. 1, p. 54-61, 2015.

SILVA L.V.; GALDINO A.C.M.; NUNES A.P.F.; SANTOS K.R.N.; MOREIRA B.M.; CACCI L.C.; SODRÉ C.L.; ZICCARDI M.; BRANQUINHA M.H.; SANTOS A.L.S.; Virulence attributes in Brazilian clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **International Journal Of Medical Microbiology**, v. 304, n. 8, p.990-1000, 2014.

SINGH G.; KULHARIA M. Insights from the analysis of alginate lyase protein model from *Pseudomonas fluorescens* towards the understanding of mucoid biofilm disruption. **Bioinformation**, v. 13, n. 9, p. 318, 2017.

SOKOL P.A.; OHMAN D.E.; IGLEWSKI B.H. A More Sensitive Plate Assay for Detection of Protease Production by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 9, n. 4, p. 538-540, 1979.

SPIPKER T.; COENYE T.; VANDAMME P.; LIPUMA J.J. PCR-Based assay for differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* species recovered from cystic fibrosis patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 2074-2079, 2004.

STEPANOVIC S.; VUKOVIC D.; DAKIC I.; SAVIC B.; SVABIC-VLAHOVIC M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 40, p. 175-179, 2000.