



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Mila Muraro de Almeida

**Resistência aos antimicrobianos e diversidade genética de variantes
fenotípicas de *Pseudomonas aeruginosa* não sensíveis aos carbapenêmicos
recuperadas de pacientes com fibrose cística com infecção
pulmonar crônica: uma análise temporal**

Rio de Janeiro

2021

Mila Muraro de Almeida

Resistência aos antimicrobianos e diversidade genética de variantes fenotípicas de *Pseudomonas aeruginosa* não sensíveis aos carbapenêmicos recuperadas de pacientes com fibrose cística com infecção pulmonar crônica: uma análise temporal

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Orientador: Prof. Dr. Robson de Souza Leão

Coorientadora: Prof.^a Dra. Elizabeth de Andrade Marques

Rio de Janeiro

2021

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CBA

A447 Almeida, Mila Muraro de.
Resistência aos antimicrobianos e diversidade genética de variantes fenotípicas de *Pseudomonas aeruginosa* não sensíveis aos carbapenêmicos recuperadas de pacientes com fibrose cística com infecção pulmonar crônica: uma análise temporal / Mila Muraro de Almeida. – 2021.
152 f.

Orientador: Robson de Souza Leão
Coorientadora: Elizabeth de Andrade Marques

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Programa de Pós-graduação em Microbiologia.

1. Fibrose cística – Teses. 2. *Pseudomonas aeruginosa* – Teses. 3. Pulmões – Infecções – Teses. 4. Genoma. 5. Antibacterianos. I. Leão, Robson de Souza. II. Marques, Elizabeth de Andrade. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 616.24

Bibliotecária: Angela da Silva Velho CRB7/4780

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Mila Muraro de Almeida

Resistência aos antimicrobianos e diversidade genética de variantes fenotípicas de *Pseudomonas aeruginosa* não sensíveis aos carbapenêmicos recuperadas de pacientes com fibrose cística com infecção pulmonar crônica: uma análise temporal

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica Humana.

Aprovada em 09 de fevereiro de 2021.

Coorientadora: Prof.^a Dra. Elizabeth de Andrade Marques
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Banca Examinadora: _____

Prof. Dr. Robson de Souza Leão (Orientador)
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.^a Dra. Vânia Lúcia Carreira Merquior
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof.^a Dra. Mônica de Cássia Fírmida
Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Prof.^a Dra. Ana Paula D’Alincourt Carvalho Assef
Fundação Oswaldo Cruz

Prof.^a Dra. Ilana Lopes Baratella da Cunha Camargo
Universidade de São Paulo

Rio de Janeiro

2021

DEDICATÓRIA

A todos e ao Universo, por tornarem possível a realização de tantos sonhos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelos caminhos e caminhadas.

À minha família, pela vida.

Ao meu amor de uma vida inteira: por todo amor, por todas as palavras, por todo apoio, por ser a minha fortaleza; por tudo, muito obrigada!

Aos meus professores, e aos muito queridos Robson Leão, Elizabeth Marques e Gustavo Almeida, e a tantos outros mestres que admiro imensamente, pelo incentivo e colaboração para a minha formação acadêmica e profissional.

Aos meus amigos Fabrina, Márcia Jones, Carla Verônica, Jéssica, Ludmila, Elisa, Edgard, Nicoli e Ingrid, e às minhas irmãs de coração Lara e Eva: por todos os momentos de apoio, carinho, paciência, trabalho e risos.

A todos os funcionários da nossa querida Disciplina de Microbiologia e Imunologia e do Laboratório de Bacteriologia/HUPE, pela colaboração, prestatividade e parceria. Aos colegas dos outros laboratórios do departamento, por tornarem o processo mais leve e alegre. A Jéssica Lima e Patrícia Cruz, pelos plantões mais amenos e divertidos, no HUGG/UNIRIO. À professora Cléo Bento e aos queridos discentes do LIILiT/UNIRIO, pela acolhida, aprendizado e amizade. A todos do IVISA/RJ - Lab. Municipal de Virologia, pela força e incentivo.

À UERJ, instituição pela qual tenho muito carinho, que se tornou a minha segunda casa, me acolheu como família, e me permitiu realizar tantos sonhos.

Às agências de financiamento FAPERJ e CNPQ.

Sem o amor que eu conheci, sem a fé que sempre estive
aqui e sem a Ciência, eu nada seria.

Autor desconhecido

RESUMO

ALMEIDA, Mila Muraro de. **Resistência aos antimicrobianos e diversidade genética de variantes fenotípicas de *Pseudomonas aeruginosa* não sensíveis aos carbapenêmicos recuperadas de pacientes com fibrose cística com infecção pulmonar crônica**: uma análise temporal. 2021. 152 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

Pseudomonas aeruginosa, bactéria ubíqua e versátil, pode se comportar como um patógeno oportunista, com ampla capacidade adaptativa, por múltiplos fatores de virulência e resistência. Como agente patogênico nas infecções pulmonares em pacientes com fibrose cística (FC), é motivo de prognóstico ruim, aumento de hospitalizações e altas taxas de morbimortalidade, sendo quase impossível a sua erradicação, ao evoluírem para a cronicidade. Globalmente, é notável o aumento nos índices de amostras não sensíveis aos carbapenêmicos e a múltiplos antimicrobianos, essenciais à terapêutica. Assim, avaliamos temporalmente a susceptibilidade aos antimicrobianos e a presença de amostras hipermutáveis (HPM) em *P. aeruginosa* de diferentes morfotipos, não sensíveis aos carbapenêmicos (PANSC), obtidas de pacientes FC com infecção pulmonar crônica, acompanhados em dois centros de referência no Rio de Janeiro. De 2007 a 2016, a análise retrospectiva, através dos resultados obtidos no teste de disco-difusão (TDD), permitiu selecionar amostras de PANSC incluídas neste trabalho. Usando os resultados obtidos no TDD, foi definida a susceptibilidade a outros antimicrobianos, bem como os fenótipos de resistência, multi-(MDR), extensivo-(XDR) e pandroga resistentes (PDR). Adicionalmente, determinou-se a concentração inibitória mínima (CIM) para imipenem (IMP), meropenem (MEM), doripenem (DOR) e polimixina (POL). Através de teste fenotípico, foi calculada a frequência de mutação espontânea e as amostras hipermutáveis foram caracterizadas. O sequenciamento de genoma total (SGT) foi realizado em seis amostras de diferentes morfotipos, incluindo uma variante fenotípica rara, a *small colony variant* (SCV). Essas amostras foram recuperadas em dois episódios de exacerbação do paciente. Foram investigadas a clonalidade, resistência a antimicrobianos e virulência. Das 143 amostras, de 18 pacientes (9 pediátricos e 9 adultos), os resultados do TDD apontaram taxas de não susceptibilidade superiores a 44% para gentamicina, ampicacina, tobramicina e ciprofloxacina, e maiores de 30% para POL. Pela determinação da CIM, quase a totalidade (96%) das amostras foram não sensíveis a IMP, seguidos de 56% para MEM e 44% para DOR. Analisando-se a distribuição dos valores da CIM₅₀ e CIM₉₀ nos dois grupos de pacientes, os valores para IMP foram maiores entre as amostras dos pacientes pediátricos, equivalendo a 32 µg/mL e 64 µg/mL, respectivamente. Cerca de 25%, 37% e 6% eram MDR, XDR e PDR, respectivamente. Aproximadamente 12% eram HPM, e mais da metade destas foram XDR. Após o SGT, as seis amostras, recuperadas do caso clínico foram classificadas em um novo *sequence type* (ST2744), com a presença de genes de resistência adquiridos *bla*_{P_{AO}}, *bla*_{OXA-50}, *aph*(3')-Iib, *fosA*, *catB7* e *crpP*, apresentando mutações em genes codificadores de porinas e bombas de efluxo. Entretanto, não foram observados marcadores genéticos clássicos exclusivos para os fenótipos SCV e HPM. Este é o primeiro relato de *P. aeruginosa* SCV na FC, no Brasil. A vigilância epidemiológica de *P. aeruginosa* é crucial para a conduta terapêutica, bem como para o sucesso da resposta do paciente e erradicação da infecção pulmonar, justificando o uso de técnicas fenotípicas e moleculares na detecção dos mecanismos de resistência e virulência desse microrganismo na FC.

Palavras-chave: Fibrose cística. Hipermutabilidade. *Pseudomonas aeruginosa*. Resistência antimicrobiana. Sequenciamento de Genoma Total.

ABSTRACT

ALMEIDA, Mila Muraro de. **Antimicrobial resistance and genetic diversity of phenotypic variants of carbapenem non susceptible *Pseudomonas aeruginosa* recovered from patients with cystic fibrosis with chronic lung infection**: a temporal analysis. 2021. 152 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2021.

Pseudomonas aeruginosa, a ubiquitous and versatile bacterium, can behave as an opportunistic pathogen, with strong adaptive capacity, due to multiple virulence and resistance factors. As a pulmonary infection pathogen in patients with cystic fibrosis (CF), it is related with poor prognosis, increased hospitalizations and high rates of morbidity and mortality, and the eradication is almost impossible, especially after chronicity. The increase rates of isolates non-susceptible to carbapenem and multiple antimicrobials, essentials to therapy, have been observed worldwide. Therefore, we assessed the antimicrobial susceptibility and the presence of hypermutability (HPM) in non-susceptible to carbapenem *P. aeruginosa* (PANSC) isolates from different morphotypes, obtained from CF patients with chronic pulmonary infection, followed at two reference centers in Rio de Janeiro. Using the results obtained by disk-diffusion test (DDT) between 2007 to 2016, we select 143 PANSC and susceptibility to other antimicrobials was defined, as well as the resistance phenotypes, multi- (MDR), extensive- (XDR) and pandrug resistant (PDR). Additionally, the minimum inhibitory concentration (MIC) for imipenem (IPM), meropenem (MEM), doripenem (DOR) and polymyxin (POL) was determined. Hypermutable isolates were characterized by determination of mutation frequency. Whole genome sequencing (WGS) was performed in six morphotypes isolates, including the small colony variant (SCV), a rare variant phenotype. These isolates were recovered in two exacerbation episodes. Clonality, antimicrobial resistance and virulence were investigated. Of the total (143 isolates) isolated from 18 patients (9 pediatric and 9 adults), non-susceptibility rates above than 44% for gentamicin, amikacin, tobramycin and ciprofloxacin, and more than 30% for POL were observed. Almost all (96%) of the isolates were non-susceptible to IPM by MIC determination, followed by 56% for MEM and 44% for DOR. MIC₅₀ (32 µg/mL) and MIC₉₀ (64 µg/mL) rates for IPM were higher among pediatric patient isolates and 25%, 37% and 6% were MDR, XDR and PDR, respectively. 12% of all isolates were classified as HPM and more than half were categorized as XDR. Using WGS, the six isolates recovered from the clinical case, were identified as a new sequence type (ST2744). Acquired resistance genes *bla*_{PAO}, *bla*_{OXA-50}, *aph* (3')-Iib, *fosA*, *catB7* and *crpP* and mutations in encoding genes for porins and efflux pumps, was annotated. None exclusive classic genetic markers related to SCV and HPM phenotypes were not observed. This is the first Brazilian report of *P. aeruginosa* SCV in CF. Our results highlight the importance of epidemiological surveillance in *P. aeruginosa*. The application of phenotypic and molecular techniques to investigate resistance and virulence mechanisms, can contribute to therapeutic success in CF.

Keywords: Antimicrobial resistance. Cystic fibrosis. *Pseudomonas aeruginosa*. Hypermutability. Whole Genome Sequencing.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 –	Categorias e agentes considerados neste estudo para a classificação das amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> como multidroga resistentes, extensivo droga resistentes e pandroga resistentes nos testes de sensibilidade aos antimicrobianos.....	40
Quadro 2 –	Concentrações utilizadas na determinação da concentração inibitória mínima para imipenem, meropenem, doripenem e polimixina, cepa controle utilizada e faixa aceitável do controle de qualidade.....	41
Quadro 3 –	Dados para a diluição e preparo dos antimicrobianos imipenem, meropenem, doripenem e polimixina, para a determinação da concentração inibitória mínima.....	43
Quadro 4 –	Critérios de interpretação da susceptibilidade da concentração inibitória mínima, para as amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Número de amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> não sensíveis aos carbapenêmicos, isoladas de pacientes com fibrose cística ao longo de dez anos.....	50
Tabela 2 –	Distribuição das amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> não sensíveis aos carbapenêmicos, isoladas de pacientes com fibrose cística ao longo do período de estudo.....	51
Tabela 3 –	Distribuição dos percentuais de resistência aos antimicrobianos em amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> não sensíveis aos carbapenêmicos, isoladas de pacientes com fibrose cística.....	53
Tabela 4 –	Distribuição temporal das amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> não sensíveis aos carbapenêmicos, isoladas de pacientes com fibrose cística.....	55
Tabela 5 –	Variação da concentração inibitória mínima (CIM) para carbapenêmicos e polimixina, com suas respectivas CIM ₅₀ e CIM ₉₀ , das 143 amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> não sensíveis aos carbapenêmicos recuperadas de pacientes pediátricos e adultos com fibrose cística.....	57
Tabela 6 –	Distribuição das 143 amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> não sensíveis aos carbapenêmicos, nas diversas faixas que determinam a concentração inibitória mínima para os carbapenêmicos.....	58
Tabela 7 –	Distribuição das 143 amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> não sensíveis aos carbapenêmicos nas diversas faixas que determinam a concentração inibitória mínima para polimixina.....	59
Tabela 8 –	Distribuição temporal de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> não sensíveis a polimixina, isoladas de pacientes com fibrose cística.....	60
Tabela 9 –	Distribuição dos fenótipos MDR, XDR e PDR em relação a morfologia mucoide e não mucoide de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> não sensíveis aos carbapenêmicos.....	62
Tabela 10 –	Distribuição temporal dos fenótipos de resistência de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> não sensíveis aos carbapenêmicos, em ordem cronológica e quantitativa.....	64
Tabela 11 –	Características fenotípicas da resistência em amostras de <i>Pseudomonas</i>	

	<i>aeruginosa</i> não sensíveis a polimixina.....	65
Tabela 12 –	Distribuição amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> hipermutáveis, morfologia colonial, susceptibilidade aos antimicrobianos, fenótipo de resistência a múltiplos antimicrobianos e frequências de mutação.....	68
Tabela 13 –	Perfis de susceptibilidade da população selvagem e subpopulação hipermutável de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> não sensíveis aos carbapenêmicos.....	70
Tabela 14 –	Resultados dos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos das amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa recuperadas</i> em dois momentos de hospitalização de um paciente com fibrose cística.....	72
Tabela 15 –	Classificação e frequência de mutação das amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> mucoides, não mucoides e SCVs.....	73
Tabela 16 –	Visão geral das sequências genômicas anotadas na plataforma <i>Rapid Annotation Subsystem Technology (RAST)</i> dos seis isolados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	74
Tabela 17 –	Descrição dos <i>loci</i> e alelos do novo <i>sequence type</i> , ST 2744, por análise <i>in silico</i> de <i>Multilocus Sequence Typing (MLST)</i> das seis amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> de um paciente com fibrose cística.....	75
Tabela 18 –	Análise das mutações nas sequências de nucleotídeos de porinas e bombas de efluxo nas seis amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	77
Tabela 19 –	Sequências CRISPR e genes <i>cas</i> investigados usando a ferramenta de busca <i>CRISPRCas Finder</i> nas seis amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	81
Tabela 20 –	Comparação das sequências de nucleotídeos dos genes relacionados ao fenótipo <i>small colony variant</i> e à hipermutabilidade, entre as seis amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e a PAO1.....	83
Tabela S1 –	Ilhas genômicas previstas no genoma das seis amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , alinhados com o genoma de referência da PAO1, pelo banco de dados <i>Islandviwer</i> de acordo com <i>IslandPath-DIMOB</i>	84
Tabela S2 –	Comparação dos fatores de virulência entre as seis amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AES	<i>Australian Epidemic Strain</i>
AMI	Amicacina
AmpC	<i>Betalactamase-mediated resistance/ Cephalosporinase</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATM	Aztreonam
BGN-NF	Bacilos Gram negativos não fermentadores
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CAMHB	<i>Cation-Adjusted Mueller Hinton Broth</i>
<i>cas</i>	<i>CRISPR associated genes</i>
CAZ	Ceftazidima
CBc	Complexo <i>Burkholderia cepacia</i>
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i>
CGE	<i>Center of Genomic Epidemiology</i>
CIM	Concentração inibitória mínima
CIP	Ciprofloxacina
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
DNA	Desoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxyribonucleoside triphosphate
DO	Densidade óptica
DOR	Doripenem
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
ESBL	<i>Extended-spectrum Betalactamases</i>
FC	Fibrose cística
FEP	Cefepime
GBEFC	Grupo Brasileiro de Estudos de Fibrose Cística
GEN	Gentamicina
GES	<i>Guiana Extended Spectrum</i>
GN	Gram negativos
GP	Gram positivos

HPM	Hipermutabilidade/ hipermutável
HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto
IFF	Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira
IMP	<i>Imipenemase</i>
IPM	Imipenem
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae carbapenemase</i>
LABACT	Laboratório de Bacteriologia Clínica do HUPE
LES	<i>Liverpool Epidemic Strain</i>
MBL	<i>Metallo-β-lactamase</i>
MDR	multidroga resistência/ multidroga resistente
MEM	Meropenem
MES	<i>Manchester Epidemic Strain</i>
MH	Mueller Hinton
MHA	<i>Mueller Hinton agar</i>
MHB	<i>Mueller Hinton broth</i>
MHARif	Mueller Hinton agar com rifampicina
MiD1	<i>Midland</i>
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
MMR	<i>Mismatch repair system</i>
MNT	Micobactérias não tuberculosas
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
MSSA	<i>Staphylococcus aureus</i> sensível à meticilina
MUC	Mucoide
NDARO	<i>National Database of Antibiotic Resistance Organisms</i>
NDM	<i>New Deli Metallo-β-lactamase</i>
NGS	<i>New generation sequencing</i>
NISf	Frequência de mutação espontânea não aumentada
NM	Não mucoide
NMPDR	<i>National Microbial Pathogen Data Resource</i>
NS	Não sensibilidade/não sensíveis
NSC	Não sensível aos carbapenêmicos
OXA	Oxacilinase

PANSC	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> não sensível aos carbapenêmicos
PSNSP	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> não sensível a polimixina
PATRIC	<i>Applying Pathosystems Resource Integration Center</i>
PBP	<i>Penicillin binding protein/ proteína de ligação à penicilina</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDR	Pandrogia resistência/ pandrogia resistente
PFGE	<i>Pulsed-field Gel Electrophoresis</i>
PHAST	<i>Phage Search Tool</i>
POL	Polimixina
PTZ	Piperacilina+tazobactam
RAST	<i>Rapid Annotation Subsystem Technology</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RND	<i>Resistance Nodulation Division</i>
SCV	<i>Small colony variant</i>
SGT	Sequenciamento de Genoma Total
SISf	Frequência de mutação espontânea fortemente aumentada
ST	<i>Sequence Type</i>
SPM	<i>São Paulo Metallo-β-lactamase</i>
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TDD	Teste de disco-difusão
THG	Transferência horizontal de genes
TIR	Tripsina imunorreativa
TOB	Tobramicina
UFC	Unidade formadora de colônia
UNIPROT	<i>Universal Protein Resource</i>
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Averages</i>
UV	Ultravioleta
VFDB	<i>Virulence Factor Database</i>
VIM	<i>Verona Imipenemase</i>
XDR	<i>Extensively drug resistance</i>
WISf	Frequência de mutação espontânea aumentada

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
×	Multiplicação
>	Maior que
<	Menor que
≥	Maior ou igual
≤	Menor ou igual
g	grama
h	Hora (s)
H ₂ O	Água
Ca	Cálcio
Cl	Cloro
Mg	Magnésio
Na	Sódio
L	Litro (s)
kDa	KiloDalton
min	Minuto
mg	Miligrama (s)
mL	Mililitro (s)
μg	Micrograma (s)
μL	Microlitro (s)
mol	Massa molecular em gramas
Mbp	Megapares de bases
°	Graus Celsius
cm	Centímetro (s)
rpm	Rotações por minuto
®	Marca registrada
s	Segundo (s)
<i>f</i>	Taxa de frequência de mutação

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	17
1	OBJETIVOS	37
1.1	Geral	37
1.2	Específicos	37
2	MATERIAL E MÉTODOS	38
2.1	Pacientes, espécimes clínicos e critério de seleção das amostras bacterianas	38
2.2	Estoque bacteriano	38
2.2.1	<u>Identificação bacteriana</u>	38
2.3	Testes de susceptibilidade aos antimicrobianos	39
2.3.1	<u>Teste de disco-difusão (TDD)</u>	39
2.3.2	<u>Determinações das concentrações inibitórias mínimas (CIMs)</u>	39
2.3.2.1	Preparo da solução padrão de antimicrobiano.....	40
2.3.2.2	Preparo do meio de cultura.....	41
2.3.2.3	Preparo das soluções de antimicrobianos.....	42
2.3.2.4	Preparo da suspensão bacteriana	42
2.3.2.5	Incubação, leitura e determinação dos resultados das CIM.....	42
2.3.3	<u>Classificação das amostras de acordo com fenótipos de resistência: multidroga-resistentes (MDR), extensivo-droga resistentes (XDR) e pandroga-resistentes (PDR)</u>	43
2.4	Hipermutabilidade	44
2.4.1	<u>Preparo dos meios de cultura</u>	44
2.4.2	<u>Preparo da suspensão bacteriana</u>	45
2.4.3	<u>Semeadura e incubação das suspensões bacterianas em meio de cultura com e sem antimicrobiano</u>	45
2.4.4	<u>Cálculo da frequência de mutação</u>	45
2.4.5	<u>Classificação quanto à frequência de mutação</u>	46
2.5	Sequenciamento de Genoma Total (SGT)	46
2.5.1	<u>Extração do DNA bacteriano, montagem e anotação dos genomas</u>	46
2.5.2	<u>Ferramentas de análise do sequenciamento de genoma total</u>	47

3	RESULTADOS	49
3.1	Distribuição temporal de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> não sensíveis aos carbapenêmicos (PANSC) nos pacientes incluídos no estudo	49
3.2	Testes de susceptibilidade aos antimicrobianos	51
3.2.1	<u>Teste de disco-difusão</u>	51
3.2.2	<u>Concentração inibitória mínima</u>	56
3.3	Classificação quanto aos fenótipos de resistência MDR, XDR e PDR	60
3.4	Hipermutabilidade	67
3.5	Relato de caso	71
4	DISCUSSÃO	100
	CONCLUSÕES	116
	REFERÊNCIAS	118
	APÊNDICE – Projetos de <i>Whole Genome Shotgun</i> depositados no <i>DDBJ/ENA/GenBank</i>	141
	ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética.....	147
	ANEXO B - Artigo científico produzido durante o período de doutoramento.....	150
	ANEXO C - Comprovação de submissão do artigo científico à <i>Brazilian Journal of Microbiology</i> (BJMI-S-21-00101).....	151
	ANEXO D - Primeira página da submissão do artigo científico à <i>Brazilian Journal of Microbiology</i> (BJMI-S-21-00101).....	152

INTRODUÇÃO

Fibrose Cística

A fibrose cística (FC), ou mucoviscidose, é a mais comum e letal doença herdável, de cunho autossômico recessivo, na população caucasiana, relatada como uma nova enfermidade por Andersen et al. (1938) e a sua origem genética foi descrita em 1989 (KEREM et al., 1989). Esta condição ocorre por defeitos no gene *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*), localizado no braço longo do cromossomo 7, que é responsável pela codificação de proteínas CFTR (*ibidem*) que funcionam como importantes canais de cloro, bicarbonato e de outros íons, no epitélio exócrino, atingindo a fisiologia humana, levando à hiperviscosidade e acúmulo do muco secretado, nos múltiplos órgãos acometidos (HEIJERMAN et al., 2005; CFF, 2019).

Analisando-se a sua distribuição geográfica, a ocorrência dos casos acompanha as variações étnicas regionais, uma vez que a população caucasiana é a mais atingida por essa doença. Na Europa, a prevalência varia de 1 para cada 1700 a 7700 nascimentos (LUBAMBA et al., 2012). No entanto, a incidência mostra-se sujeita a variações loco-regionais, com 1/3.000 nascidos na Bretanha, 1/7.000 na França, 1/17.000 na África e 1/32.000 na Ásia, e 1/3.500 nascidos nos Estados Unidos, distribuída globalmente de forma heterogênea (FARRELL, 2008; PETTIT; FELLNER, 2014; CASTELLANI et al., 2016; STAFLEER et al., 2016).

Ao redor do mundo, há em torno de 70 mil afetados por essa condição genética rara, das quais aproximadamente 30 mil pessoas com FC registradas nos Estados Unidos e 6.900, na França (RFM, 2017; CFF, 2019; FÉREC; SCOTET, 2020).

Ainda sobre dados nacionais, nos quais os número de registros vêm aumentando anualmente, como reportado pelo Grupo Brasileiro de Estudos de Fibrose Cística, através do Relatório do Registro Brasileiro de Fibrose Cística (REBRAFC, 2018), há atualmente cerca de 5.417 pacientes registrados, dos quais 5.073 (93,65%) são casos que têm algum acompanhamento, com 290 registros novos até 31/12/2018. O número de casos em acompanhamento, no Brasil, mais do que triplicou, desde o início dos registros, saltando para 3.359 (REBRAFC, 2018); tal informação não indica necessariamente um aumento no número de nascidos com FC no nosso país, porém poderia ser justificado em parte por mais indivíduos sendo diagnosticados, permanecendo um hiato no número real de afetados.

De acordo com as informações publicadas por esse relatório, os cinco estados brasileiros onde há um maior número de pessoas com FC são, em ordem decrescente: São Paulo, com 1.372 casos (25,4%), Minas Gerais, 626 (11,6%), Rio Grande do Sul, 571 (10,6%), Bahia, 454 (8,4%) e Rio de Janeiro, com 395 casos, representando 7,3% do total nacional (REBRAFC, 2018).

O diagnóstico da FC usualmente decorre da associação da suspeita clínica (teste de triagem neonatal através da detecção e quantificação da tripsina imunorreativa (TIR), história familiar ou sintomas clínicos característicos) associado ao teste do suor alterado para a dosagem de cloro e sódio e/ou identificação de duas variantes no gene *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* - *CFTR* (ATHANAZIO et al., 2017; REBRAFC, 2018; BRASIL. Ministério da Saúde, 2019; CFF, 2019)

Gene e proteína *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (CFTR)

Tendo em vista a etiopatogenia da FC, o principal distúrbio celular é o transporte defeituoso de cloro através da proteína transmembrana CFTR, causando a desidratação das secreções, aumentando a viscosidade do muco e o seu acúmulo no trato respiratório inferior, promovendo assim a obstrução crônica das vias aéreas pela diminuição do *clearance* mucociliar. Consistindo em uma doença multissistêmica, a deterioração da função pulmonar cursa com insuficiência pancreática e má absorção intestinal, alterações gradativas normalmente relacionadas ao tipo de mutação genética envolvida (GIANOTTI et al., 2020).

A hereditariedade dessa condição genética autossômica recessiva está relacionada, até o momento a mais de 2103 mutações no gene codificador da proteína CFTR, dentre as quais as do tipo “*missense*”, que correspondem à troca de um aminoácido na proteína com consequências variadas, dependendo do local acometido, são as mais comuns, com dados atualizados constantemente e disponíveis no *Cystic Fibrosis Mutation Database* (CFMD, 2021); no entanto, cerca de 15% das variantes genéticas não têm relação com a condição clínica da doença (GIANOTTI et al., 2020).

Dados mais recentes, publicado em 31 de julho de 2020, descreveram um total de 442 variantes do gene *CFTR* anotadas, das quais 360 causando fibrose cística, 48 ligada a variantes de consequências clínicas diversas, e 23 variantes não causadoras de FC. Onze dessas variantes possuem significado ainda desconhecido (CFTR2, 2020).

As mutações no gene *CFTR* estão agrupadas em sete classes de acordo com a sua possibilidade de tratamento e com a disfunção da proteína, nas quais a função de secreção

iônica estará comprometida, especialmente de bicarbonato e cloreto, que impactam diretamente no aspecto microbiológico da doença respiratória, ainda que esse número gere contrivérsia, já que se contesta a sétima classe, a única não tratável (De BOECK; AMARAL, 2016; BAREIL; BERGOUGNOUX, 2020).

A evolução do conhecimento da genética molecular oportunizou a criação de tratamentos medicamentosos voltados para a modulação da proteína CFTR, que interferem na matriz geradora da doença, e que podem vir a modificar o seu curso clínico; da mesma forma, estudos buscam a terapia gênica como alternativa na terapêutica da FC (FIRMIDA et al., 2011)

Mutações no gene *CFTR*

Na classe I, a maior parte destas mutações é do tipo *nonsense*, das quais decorre a produção prejudicada desse canal proteico, por conta do aparecimento de um códon de parada prematuro, que leva a degradação do RNA mensageiro (RNAm). Nas mutações de classe II, um evento de deleção de uma trinca de pares de base, e o aminoácido correspondente na proteína, como a fenilalanina ($\Delta F508$), comprometem seu transporte até a membrana, sua retenção no retículo sarcoplasmático e degradação precoce antes de chegar à superfície, dadas as mudanças estruturais que afetam o dobramento da proteína. Na classe III, as mutações nesse gene ocasionam alterações no tempo de abertura da CFTR, ou não alcançam o estágio de abertura, ainda que cheguem à superfície da célula epitelial. As mutações de classe IV estão descritas nas proteínas que funcionam de maneira pouco eficaz e com condutância iônica reduzida, ineficaz no transporte dos ions cloreto e bicarbonato, ainda que tenham sido corretamente enviadas à membrana celular e o canal esteja aberto. Nas de classe V, é notada uma quantidade diminuída desses canais na membrana celular, decorrente de mecanismo de *splicing*, com formação de RNAm funcional e RNAm irregular. Mutações de classe VI se refletem em instabilidade da CFTR na superfície da célula epitelial secretora, por conta do aumento do processo de endocitose ou retorno à membrana. Na classe VII, as mutações são categorizadas como irrecuperáveis, já que o número demasiado grande de deleções inviabiliza o restauro do funcionamento da CFTR, ainda que de forma farmacológica. As mutações genéticas das classes I , II , III são as mais comuns, e associadas com insuficiência pancreática, enquanto que os doentes com as classes menos comuns, IV, V e VI, possuem muitas vezes funcionamento regular pancreático (De BOECK; AMARAL; 2016; ELBORN, 2016; STANKE; TÜMMLER, 2016).

A mutação F508del é a mais comum, possuindo inclusive relação com a frequente infecção pulmonar por *P. aeruginosa*, causa a deleção da fenilalanina na posição 508 da cadeia de aminoácidos da CFTR, e ocorre em cerca de 95 % dos pacientes com FC que têm ao menos um alelo mutado (RATJEN; DÖRING, 2003; FIRMIDA et al., 2011; MENG et al., 2017). Na Alemanha, ela está presente em cerca de 70% dos pacientes FC, mas em apenas ¼ daqueles com origem turca (NAEHRIG et al., 2017; WHO, 2017). Dados europeus reportados recentemente indicaram que, entre 140 pacientes de origem romana, 85% deles tinham a mutação F508del (PETROVA et al., 2019), e um estudo polonês apontou que a F508del representava 54,5% dos índices mais representativos, dentre as demais mutações (ZIEŹKIEWICZ et al., 2014).

Nos Estados Unidos, 15 % dos casos de mutações no *CFTR* são representados pelas variantes G542X e W1282X, enquanto 86% dos norte-americanos com FC genotipados apresentavam a F508del (CFR, 2019; ESTABROOKS; BRODSKY, 2020).

Um estudo recém publicado apontou através de análises do sequenciamento do gene *CFTR* que as mutações mais comuns no Brasil eram as F508del, G542X e 3120+1G→A (NUNES et al., 2017).

Num estudo publicado com dados brasileiros (da SILVA FILHO et al., 2020), apontaram que até o ano de 2017, as informações de 4.654 indivíduos com FC indicavam que 3.104 (66,7%) deles tinham resultado de genotipagem. Um total de 236 variantes foram caracterizadas no Brasil, com a mutação F508del identificada em 46% dos alelos testados. A genotipagem mostrou 2.002 (64,5%) indivíduos positivos, 757 (24,4%) inconclusivos e 345 (11,1%) negativos na busca por mutações, e as categorias de genótipos foi bastante diferente nas regiões brasileiras, com maiores proporções casos negativos no Norte (45%) e Nordeste (26%) do país, talvez relacionados às condições socioeconômicas e acesso deficiente a testes de suor confiáveis.

De acordo com dados atuais do Relatório Anual do Registro Brasileiro de Fibrose Cística (REBRAFC, 2018), cerca de 80% dos pacientes registrados possuem pesquisa de genótipo da mutação no *CFTR*, dos quais 2.879 (65,7%) apresentavam duas variantes causadoras de FC, sendo considerados, portanto, positivos. Naqueles com genotipagem realizada, 51,2% dos indivíduos possuem pelo menos uma cópia da variante F508del.

Expectativa de vida

Nas Américas do Norte e Europa, cerca de um terço dos pacientes FC chega à idade adulta, e podem alcançar idade superior a 30 anos; o aumento da expectativa de vida está ligado ao diagnóstico mais rápido e eficaz, assim como ao avanço das pesquisas, permitindo a aplicação de protocolos multidisciplinares padronizados no seu tratamento (DORING; HOIBY, 2004; RATJEN, 2009; ATHANAZIO et al., 2017).

Há seis décadas, a expectativa de vida dos pacientes FC raramente excedia os 5 anos de idade; no entanto, dados atuais mostram que, nos Estados Unidos, 46,2 anos é a idade média de sobrevivência e pode alcançar os 52,3 anos, no Canadá (CFR, 2019; CFR, 2017).

Infecção pulmonar e fisiopatologia da FC

Mesmo contando com diversos recursos terapêuticos oferecidos pelo acompanhamento ambulatorial e hospitalar, mediado por equipes multiprofissionais, bem como pela disponibilidade de medicações e outros recursos, as infecções pulmonares constituem-se ainda no maior desafio para os pacientes FC, dada a sua quase impossibilidade de erradicação quando da evolução de quadros agudos para o estágio crônico (SMITH et al., 2006; BLANKA et al., 2015).

Embora a FC possa acometer múltiplos órgãos, a deterioração da função pulmonar é o ponto crítico que eleva as taxas de morbimortalidade, estando a gravidade da doença associada à insuficiência pancreática exócrina nesses pacientes (FIRMIDA et al., 2011). O colapso ciliar das vias aéreas, decorrente majoritariamente da diminuição do líquido intersticial na superfície respiratória, causa a redução do *clearance* mucociliar; conseqüentemente, observa-se retenção progressiva do muco hiperviscoso, infecção e inflamação, por conta do acúmulo de microrganismos, levando à insuficiência respiratória e morte (FANEN et al., 2014; CUTTING, 2015).

O mal funcionamento da proteína CFTR reduz a permeabilidade da membrana apical das células epiteliais ao cloreto, assim como ao bicarbonato, trazendo dificuldades ao transporte e à secreção deste íon, fazendo com que a reabsorção de água do muco aumente. Como consequência, ocorre hiperviscosidade da secreção mucosa, pelo aumento da concentração desses íons. Nos diversos órgãos afetados, como os pulmões, pâncreas, intestino, glândulas sudoríparas e vasos deferentes, essa disfunção se manifesta de forma variada (DAVIS, 1938; OCKENGA, 2001).

O microambiente tão particular estabelecido pela condição clínica e pela colonização microbiana, que pode ocorrer por um ou diversos patógenos, tem como consequência exacerbações respiratórias, inflamação grave, aumento de estressores e degeneração da capacidade pulmonar (GOVAN et al., 2007; BHAGIRATH et al., 2016; GOETZ; REN, 2019).

Microbiologia pulmonar na fibrose cística

As infecções pulmonares nesses pacientes são frequentemente polimicrobianas, tanto nos estágios de infecção intermitente como crônico, embora nesse último a tendência seja a infecção monobacteriana; as infecções polimicrobianas são bastante particulares nos pacientes FC, e as interações entre microrganismos e com o próprio hospedeiro parecem estar implicadas na menor eficácia da terapia e nas exacerbações pulmonares (FILKINS; O'TOOLE, 2015; CUTHBERTSON et al., 2020).

Na primeira década de vida, é mais frequente a ocorrência de infecções respiratórias por *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina (MSSA), que se destaca entre os Gram positivos (GP), com relevante predominância de colonização na faixa entre ≤ 5 e 15 anos de idade. No final da adolescência, e início da vida adulta, ocorre uma elevação gradativa do percentual de pacientes colonizados por *P. aeruginosa*, diminuição da frequência do fenótipo de *S. aureus resistente à meticilina* (MRSA), seguidos das espécies do Complexo *Burkholderia cepacia* (CBc), *Stenotrophomonas maltophilia* e outros bastonetes Gram negativos não fermentadores, que tendem à escassez com a progressão da faixa etária (GOSS; MUHLEBACH, 2011; REBRAFC, 2018).

Os bacilos Gram negativos não fermentadores (BGN-NF) são de grande importância nas infecções pulmonares nos pacientes com FC, e, portanto, um constante desafio na rotina de identificação laboratorial pela sua similaridade fenotípica. É relativamente frequente o diagnóstico errôneo, demandando o uso de técnicas cada vez mais especializadas e sensíveis, a exemplo das técnicas moleculares mais atuais, como MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight) e SGT (Sequenciamento de Nova Geração). Algumas espécies são frequentemente recuperadas de secreções respiratórias na FC, como *Stenotrophomonas maltophilia*, Complexo *Burkholderia cepacia* (CBc) *Achromobacter xylosoxidans* (FOLESCU et al., 2015; RODRIGUES et al., 2016; RUTTER et al., 2017; PEREIRA et al., 2017; BRAGA et al., 2020).

Dentre esses BGN-NF, o *Cbc* (constituído por 24 espécies relacionadas filogeneticamente) representa um risco importante para a deterioração da função pulmonar, podendo levar a “síndrome cepacia” (comumente causada por *B. cenocepacia*), com perturbações neurológicas agudas, deterioração pulmonar, bacteremia e pneumonia necrosante, estatisticamente atingindo cerca de 20% dos pacientes com FC (COENYE et al., 2001; KALFERSTOVA et al., 2016; RAGUPATHI; VEERARAGHAVAN, 2019).

Considerados como microbiota transitória, microrganismos como *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. e *Proteus* spp. podem ser identificados, mesmo que raramente, no início da doença pulmonar na FC. Além disso, enterobactérias produtoras de enzimas que conferem resistência aos antimicrobianos, como as betalactamases de espectro estendido (ESBL) e *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (*KPC*) também foram descritas (LEÃO et al., 2010, 2011; LEE et al., 2011; REN et al., 2012).

Nesse contexto, *P. aeruginosa*, se destaca como o patógeno mais prevalente da microbiota das vias aéreas dos pacientes FC, seja em associação ou isoladamente. É o agente etiológico implicado nos quadros respiratórios graves e com grande número de óbitos, especialmente nos casos crônicos

Pseudomonas aeruginosa

P. aeruginosa é um BGN-NF originalmente ambiental, ubíquo e altamente versátil do ponto de vista adaptativo, comportando-se frequentemente como patógeno oportunista, dependente de quantidades mínimas de nutrientes disponíveis, com grande capacidade de adaptação e sobrevivência nos diversos ambientes, naturais ou hospitalares, inclusive onde há pouco oxigênio ou em temperaturas elevadas (RAMSAY et al., 2016). Comumente, é isolado em piscinas e soluções antissépticas, nos mais variados *habitats* e nichos, em ambientes de convívio humano (REMOLD et al., 2011). Nos adolescentes e adultos com FC, é um dos microrganismos mais prevalentes entre as espécies que compõem a microbiota pulmonar, principalmente na população que atingiu a maioridade, sendo extremamente hábil em acumular mecanismos de resistência aos antimicrobianos (ELBORN, 2016; CFF, 2019).

A erradicação da infecção pulmonar por esse microrganismo, em pacientes FC crônicos, é extremamente difícil, na qual é utilizada inicialmente a terapia inalatória com tobramicina; em amostras resistentes ao tratamento inicial, os carbapenêmicos são as drogas de segunda escolha (EMIRAGIOGLU et al., 2016). A antibioticoterapia combativa adotada para evitar a piora clínica, somada a medidas para a redução das taxas de morbidade e

mortalidade em pacientes FC, têm sido empregadas como importantes estratégias preventivas de ascensão ao estágio crônico da doença (ZEMANICK; HOFMAN, 2016; KHAN et al., 2020).

Os pacientes com FC, após a colonização primária por *P. aeruginosa*, podem apresentar diversos episódios agudos, culminando em um quadro de infecção crônica, o que torna crucial a utilização de antimicrobianos antipseudomonais. Estes fármacos podem retardar ou prevenir a cronicidade se empregadas de forma agressiva na fase inicial da infecção, no entanto também podem gerar uma pressão seletiva para a sobrevivência daqueles microrganismos não sensíveis, em se tratando da ocorrência de populações bacterianas heterogêneas (ZEMANICK; HOFMAN, 2016; CUTHBERTSON et al., 2020). É importante ressaltar que os pacientes pediátricos, após atingirem a idade adulta, geralmente são atendidos em centro especializados na atenção e acompanhamento aos indivíduos dessa faixa etária.

A colonização inicial ocorre pelo fenótipo não mucoide e com a progressão da doença pode sofrer transição para fenótipos variados, como o aspecto colonial mucoide, fortemente associado à progressão ao estágio crônico da doença, graças a pressões seletivas como a diminuição na oferta de oxigênio, escassez de nutrientes e exposição demasiada aos antimicrobianos empregados no tratamento das infecções de vias aéreas. A variação fenotípica é uma marca registrada da adaptação da *P. aeruginosa* ao hospedeiro (SHARMA et al., 2014; KHAN et al., 2020).

Resistência a antimicrobianos em *P. aeruginosa*

P. aeruginosa pode se tornar resistente aos antimicrobianos por vários mecanismos, sejam eles extrínsecos ou intrínsecos, como as mutações que induzem alteração da permeabilidade aos antimicrobianos, produção de enzimas, transferência horizontal de genes, além de alterações dos alvos dos fármacos (POOLE et al., 2011; LI et al., 2015; MUSTAFA et al., 2016). Os mecanismos de resistência aos carbapenêmicos mais significativos em *P. aeruginosa*, estão relacionados mormente à alteração da permeabilidade da membrana bacteriana, seguidos da modificação de moléculas-alvo e à aquisição de genes que codificam as enzimas metalo-betalactamases (MBLs), por conta da possível transmissibilidade desses elementos genéticos entre as bactérias (GALES; JONES; SADER, 2011; CIGANA et al., 2016; MARTINEZ et al., 2016).

Os antimicrobianos mais usados no tratamento das exacerbações pulmonares agudas na fibrose cística no Brasil, causadas por *P. aeruginosa* são ciprofloxacina (via oral), e, pela via intravenosa: amicacina, tobramicina, ceftazidima, cefepime, piperacilina+tazobactam, meropenem e aztreonam (ATAHNAZIO et al, 2017)

Os mecanismos bacterianos de resistência que precedem a não susceptibilidade aos carbapenêmicos, são atribuídos com frequência à perda de porinas (especialmente OprD), superexpressão de bombas de efluxo (principalmente os sistemas de efluxo MexCD e MexXY), presença de proteínas de ligação às penicilinas (PBP) com baixa afinidade aos carbapenêmicos, produção aumentada da betalactamase cromossomal AmpC e de outras enzimas com atividade de carbapenemase (a exemplo das imipenemases) (NEVES et al., 2008; NEVES et al., 2011; AGHAZADEH et al., 2014). Na FC, mutações que diminuem a expressão de *OprD* foram descritas como o principal mecanismo de resistência aos carbapenêmicos (COURTOIS.; CASPAR; MAURIN, 2018).

Tais mecanismos favorecem a adaptação de *P. aeruginosa* no ambiente clínico-hospitalar, bem como na sua sobrevivência no trato respiratório, rico em agentes estressores, a exemplo de células e moléculas imunes, medicamentos e outros microrganismos (MUSTAFA et al., 2016).

Em face da problemática da resistência aos antimicrobianos antipseudomonais no tratamento de infecções das vias aéreas na FC, faz-se necessário observar os dados recém-publicados pelo Registro Brasileiro de Fibrose Cística (REBRAFC, 2018), que descreve os percentuais de pacientes FC e o uso de antimicrobianos no tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa*. Foi possível observar que cerca de 32,5 % deles usaram tobramicina inalatória e 39,5% usavam azitromicina (que tem finalidade apenas imunomoduladora, e não como antimicrobiano, neste caso) via oral, e pela via endovenosa, amicacina (12,3%), ceftazidima (12,2%), imipenem/meropenem (6,0%), e menos de 3,0% deles usavam ciprofloxacina, cefepime, tobramicina, piperacilina+tazobactam e colimicina (hidrocortisona+colistina+neomicina).

Os perfis de susceptibilidade em amostras de *P. aeruginosa* descritas num estudo europeu, apontam que no Reino Unido, Bélgica e Alemanha os índices de resistência foram de: 54% para penicilinas (piperacilina e piperacilina+tazobactam), 59% para ceftazidima, 46% para amicacina, 27% para ciprofloxacina e 16% para tobramicina. A resistência a polimixina foi observada em apenas 8% das amostras (MUSTAFA et al., 2016).

Na China, Li et al. (2015) descreveram as taxas de resistência em 217 amostras de *P. aeruginosa* obtidas de pacientes com FC, com 51,6% não sensíveis à ceftazidima e

tobramicina, 44,2% piperacilina+tazobactam, e menos de 30% ao cefepime, amicacina, ciprofloxacina e gentamicina, e valores de CIMs reduzidos, em relação aos pontos de corte, para o imipenem.

Historicamente, as amostras de *P. aeruginosa* de pacientes com FC no Brasil mostravam-se mais susceptíveis aos antimicrobianos usualmente empregados na terapia, incluindo os carbapenêmicos, quando comparados as taxas de não sensibilidade (NS) descritas na Europa e Estados Unidos (GASPAR et al., 2013; LUTZ et al., 2013; FERREIRA et al., 2015; LÓPEZ-CAUSAPÉ et al., 2017; MUSTAFA et al., 2017; CFF, 2019). Entretanto, dados publicados mais recentemente pelo nosso grupo apontaram taxas de resistência mais elevadas, além de índices de amostras MDR aumentados, em relação ao que tem sido observado na última década no nosso país (ALMEIDA et al., 2021-ANEXO C).

O tratamento de infecções crônicas de pacientes colonizados por *P. aeruginosa* não sensíveis aos carbapenêmicos ou multidroga resistentes é uma importante questão clínica e de saúde pública em pacientes FC (GASPAR et al., 2013; ATHANAZIO et al., 2017). A susceptibilidade reduzida aos carbapenêmicos, considerados como última opção de tratamento para esses indivíduos deixa pouquíssimos antimicrobianos como alternativa para tratar infecções por bactérias Gram negativas (IDSA et al., 2011; PARKINS; SOMAYAJI; WATERS, 2018). A detecção de *P. aeruginosa* produtora de carbapenemase nos laboratórios clínicos em culturas microbianas é de suma importância para a determinação de um esquema de tratamento apropriado e para a implementação de medidas de controle das infecções respiratórias (MIRIAGOU et al., 2010; DORTET; POIREL; NORDMANN, 2012).

Diante da disponibilidade dos antimicrobianos antipseudomonais empregadas no tratamento da infecção pulmonar dos pacientes com FC, a exemplo dos aminoglicosídeos e das fluoroquinolonas, os carbapenêmicos são importantes opções para tratamento das infecções nosocomiais resistentes causadas por *P. aeruginosa*, em contrapartida com um número crescente de relatos de diminuição da susceptibilidade desta bactéria frente aos medicamentos disponíveis (PARKINS; SOMAYAJI; WATERS, 2018).

Crianças tendem a apresentar infecções mais graves do que os adultos; a taxa de mortalidade se eleva nesse grupo etário, e aquelas que sobrevivem se tornam os adultos que geralmente têm melhores condições clínicas. Pacientes adultos com FC são mais expostos a antibioticoterapia, o que pode melhorar a função pulmonar, assim como minimizar o número de exacerbações, que são a causa de aproximadamente 50% do declínio da função respiratória (PEIXOTO, 2019). Entretanto, a terapia com múltiplos antimicrobianos pode gerar grandes

desafios, pelo aumento ou seleção das amostras MDR, levando a falhas nesses esquemas de tratamento nas infecções pulmonares por *P. aeruginosa* (BLOCK et al. 2006; CFF, 2019).

Os padrões de resistência de *P. aeruginosa* a múltiplas ou a todas as classes de antimicrobianos vêm sendo reportados cada vez mais em todo o mundo (KOUDA et al., 2009; MAHMOUD et al., 2013; DING et al., 2016; SUBEDI et al., 2018) e frequentemente relacionados à circulação de clones epidêmicos de *P. aeruginosa* pertencentes a complexos clonais ou a *Sequence Types* (STs) (CURRAN et al., 2004; LISTER, WOLTER; HANSON, 2009; OLIVER et al., 2015; RADÓ et al., 2018). As amostras apresentando resistência a múltiplos antimicrobianos, simultaneamente, têm sido submetidas a classificações de acordo com as classes ou grupos de fármacos aos quais apresentam susceptibilidade reduzida, como multidroga-resistentes (MDR, extensivo-droga resistentes (XDR) e pandroga resistentes (PDR) (MUSTAFA et al., 2012)

Mecanismos de resistência aos antimicrobianos

Os carbapenêmicos são uma categoria de antimicrobianos com grande importância nos estudos de resistência microbiana pois são os antimicrobianos de escolha quando já não há opção terapêutica para os pacientes crônicos FC, com infecção pulmonar por *P. aeruginosa* não sensível àqueles de primeira linha, como os aminoglicosídeos (GASPAR et al., 2013).

A resistência aos antimicrobianos em amostras de *P. aeruginosa* é considerado um problema de saúde pública global sendo um fator crítico e prioritário para o desenvolvimento de novos medicamentos, e se torna motivo de maior atenção quando ocorre diminuição de susceptibilidade aos carbapenêmicos (WHO, 2017). A resistência a esta classe de antimicrobianos é mediada principalmente por carbapenemases em infecções por *P. aeruginosa* não-FC, além de outros mecanismos como mutações que alteram a expressão de porinas, ou superexpressão de sistemas de efluxo (CASTANHEIRA et al., 2014; BRETONNIÈRE et al., 2016).

As carbapenemases mais comuns em *P. aeruginosa* são as metalo-betalactamases IMP, VIM e SPM, além de outras betalactamases a exemplo das GES, NDM e KPC (QUEENAN; BUSH, 2007; ROBLEDO, AQUINO; VÁZQUEZ, 2011; VIAU et al., 2016). Geralmente, a resistência aos carbapenêmicos em *P. aeruginosa* na FC se deve a mecanismos não enzimáticos, como a ausência de expressão de porinas, regulação positiva de sistemas de efluxo, ocorrendo de maneira diferente de acordo com a região geográfica, podendo-se citar

os Estados Unidos e a Europa nos quais é mais comum a resistência por mutações que levam à perda da expressão de OprD (HONG et al., 2015).

As porinas são as estruturas bacterianas mais relevantes relacionadas à resistência intrínseca, em *P. aeruginosa*, principalmente aquelas pertencentes à família OprD, que permitem a entrada dos carbapenêmicos de maneira seletiva (especialmente imipenem), e não de outros betalactâmicos, sendo primordialmente um canal para a captação de aminoácidos. A redução em sua expressão é frequentemente observada em amostras de PANSC da FC (NEVES et al., 2011; AGHAZADEH et al., 2014).

Características estruturais apontam que a maior parte das porinas de *P. aeruginosa* têm massa molecular variando de 45,4 kDa a 53 kDa, exceto as menores: OprF (37,6 kDa), OprG (25,2kDa) e OprH (21,6 kDa) (CHEVALIER et al., 2017). A família de porinas OprD/Occ abrange 19 membros divididos em duas subfamílias: OccD, com 8 componentes, que têm um poro menor e possuem um canal que pode ser fechado ou aberto, e OccK, com 11 componentes, com maior poro e um canal mais rígido (TAMBER; OCHS; HANCOCK, 2006; EREN et al., 2012, 2013).

Amostras não sensíveis aos carbapenêmicos (NSC) têm sido reportadas em vários tipos de infecções comunitárias e nosocomiais no Brasil, como aquelas oculares, queimaduras e em associação a dispositivos ventilatórios de longa duração; no entanto, é ainda fato raro naquelas causadoras de infecção nas vias aéreas de indivíduos com FC, em nosso país. A resistência a múltiplos antimicrobianos, quando não se detecta a circulação de genes codificadores de carbapenemases, está comumente associada a mutações nos genes ligados às porinas e a bombas de efluxo, como *oprF* (OCAMPO-SOSA et al., 2012) e *mexR* (YORDANOV, 2009), respectivamente, com susceptibilidade reduzida das amostras a imipenem e meropenem (OCAMPO-SOSA, et al 2012; SANTOS; NOGUEIRA; MENDONÇA, 2015).

De acordo com um estudo publicado por Richardot et al. (2015), a perda de OprD em *P. aeruginosa* colonizando pulmões com FC, pode resultar de mutações que regulam negativamente a expressão ou interrompem o gene *oprD*, mas também de mutações que geram substituições de aminoácidos, deletérias para a porina, promovendo a circulação de amostras resistentes aos carbapenêmicos e piora clínica da condição respiratória dos pacientes.

Alguns estudos apontam que amostras de *P. aeruginosa* apresentando mutações em *oprD* são selecionados positivamente, uma vez estabelecido o tratamento com imipenem, exibindo baixa afinidade e transporte reduzido desse antimicrobiano; esse mecanismo parece

estar intimamente ligado à expressão reduzida da porina, à elevação da concentração inibitória mínima (CIM) para essa droga, e com a multidroga resistência. A não susceptibilidade ao meropenem está ligada à mutação do gene codificador da OprD, e à superexpressão de bombas de efluxo, que usam este antimicrobiano como substrato, com CIMs mais baixas (YONEYAMA et al., 1995; KÖHLER et al., 1999; LIVERMORE et al., 2001; KOS; MACLAUGHLIN; GARDNER, 2016).

Como dito acima, a susceptibilidade diminuída de amostras *P. aeruginosa* nos pacientes com FC também pode estar relacionada a expressão aumentada de bombas de efluxo, comumente relacionadas a mutações em genes reguladores, intrincados sistemas responsáveis pela expulsão de materiais intracelulares e antimicrobianos. Essas estruturas presentes na membrana conferem permeabilidade seletiva à célula, operando para exportar substâncias tóxicas como os medicamentos antipseudomonais, produtos com finalidade desinfetante ou metabólitos secundários, além da excreção de moléculas sinalizadoras da comunicação celular (PEARSON et al., 1999; KRIENGKAUYKIAT et al., 2005; NEVES et al., 2011).

Foram descritos por Li, Plésiat e Nikaido (2015), quatro sistemas de efluxo em *P. aeruginosa*, MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN e MexXY-OprM, chamando atenção por serem frequentemente superexpressos em amostras clínicas. Em *P. aeruginosa*, bombas de efluxo de antimicrobianos são importantes determinantes de resistência, especialmente aqueles pertencentes à família *Resistance Nodulation Division* (RND), a exemplo da MexEF-OprD (POOLE, 2007, 2011; DREIER; RUGGERONE, 2015). Esta bomba de efluxo em amostras MDR é regulada por MexT, um ativador transcricional (MASEDA et al., 2000; OLIVARES et al., 2012), que tem a sua ativação atrelada à superexpressão de *mexEF-oprD*, com consequente aumento na resistência a antibióticos em ambientes hospitalares (ANDERSSON; HUGHES, 2010; MARTINEZ et al., 2011).

Enzimas associadas à resistência intrínseca, a exemplo de algumas betalactamases e enzimas inativadoras de aminoglicosídeos, são alguns dos principais mecanismos bacterianos para degradar ou modificar os antimicrobianos. Em *P. aeruginosa*, o gene indutível *ampC*, é capaz de inativar os betalactâmicos quando expressa a ampicilinase, um aparato responsável pela susceptibilidade reduzida a diversos antimicrobianos usados no tratamento de indivíduos com doença respiratória obstrutiva crônica, como a decorrente da FC (WRIGHT, 2005; YORDANOV, 2009; SANTOS; NOGUEIRA; MENDONÇA, 2015; PANG et al., 2019). Em *P. aeruginosa*, muitos mecanismos de resistência adquiridos aos betalactâmicos foram bem caracterizados por mutações que levam à superprodução de AmpC e AmpC de espectro

estendido (que inativam cefalosporinas de amplo espectro, inclusive carbapenêmicos), além de genes adquiridos para a expressão de betalactamases de espectro estendido (ESBLs) ou de carbapenemases (COURTOIS; CASPAR; MAURIN, 2018).

Frequentemente, em *P. aeruginosa* a susceptibilidade reduzida aos carbapenêmicos está relacionada à presença ou aquisição de genes codificadores de carbapenemases, adquiridos por transferência horizontal de genes (THG); eles podem estar localizados em plasmídeos, elementos genéticos móveis que permitem a sua aquisição ou dispersão, representando o meio mais comum de resistência extrínseca (POIREL; PITOUT; NORDMANN, 2007, 2012; QIU; KULASEKARA; LORY, 2009). O sistema de classificação das carbapenemases, conforme as classes de Ambler, as diferencia baseando-se na comparação de suas sequências de aminoácidos, de acordo com o percentual de semelhança entre elas, e todas as classes já foram descritas em *P. aeruginosa* (GNIADEK; CARROLL; SIMNER, 2016).

Quando se observa a sua distribuição geográfica e sua efetividade enzimática, as carbapenemases mais relevantes e mais comuns em *P. aeruginosa* são as metalo-betalactamases (MBL), como IMP e VIM, seguidas de outras betalactamases, como a GES, NDM, KPC e OXA-48 (DORTET; POIREL; NORDMANN, 2012). Na FC, genes como *bla_{SPM-1}*, *bla_{IMP-1}* e *bla_{VIM-2}* já foram detectados em amostras de *P. aeruginosa* com susceptibilidade reduzida aos carbapenêmicos (LUTZ et al., 2013).

A resistência extrínseca também pode ser representada por outros elementos genéticos móveis, representados por um conjunto diverso de estruturas adquiridas designado mobiloma, a exemplo dos plasmídeos, fagos e ilhas genômicas, detectáveis por técnicas de sequenciamento de genoma total (SGT) bacteriano.

Mobiloma em *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa possui um genoma grande e intrincado, com percentuais relevantes (cerca de 20%) de elementos móveis transferíveis associados ao rápido aumento da resistência antimicrobiana (SUBEDI et al., 2018). Ainda na questão da resistência, o mobiloma é composto por sequências de inserção (SIs), plasmídeos, integrons, fagos e outros elementos móveis, como ilhas de patogenicidade (IPAs), também chamadas de ilhas genômicas (IGs) relacionadas à virulência microbiana, resistência e patogenicidade, que podem ser portadoras de fatores de regulação da transcrição, enzimas, bombas de efluxo e porinas (AZAM; KHAN, 2019).

Bacteriófagos, ou vírus bacterianos, podem exibir ciclo de vida lítico, invadindo e lisando as células hospedeiras, ou lisogênico, no qual os fagos temperados entram na célula e integram seu ácido nucleico ao genoma, ali residindo como profagos, até iniciar um ciclo lítico, como os demais vírus da natureza, (CLOKIE et al., 2011; AMBROA et al., 2020). A patogenicidade de *P. aeruginosa* pode ser relacionada a uma combinação de diversos fatores de virulência, dentre os quais já foram objeto de estudo os bacteriófagos, que podem carrear genes de virulência microbianos entre espécies bacterianas, inclusive nas infecções pulmonares crônicas na FC (LEE; ZHANG, 2015).

A cepa epidêmica de *P. aeruginosa* LES, geneticamente denominada LESB58, é sabidamente mais resistente aos antimicrobianos do que outras isoladas de pacientes com FC, e a análise genômica apontou que profagos aumentam a possibilidade de colonização bem-sucedida, já que sua inserção como genoma acessório certamente contribuiu para a patogenicidade desse microrganismo (WINSTANLEY et al., 2009; DAVIES et al., 2017).

A patogenicidade bacteriana, através da resistência adquirida, ocorre usualmente por meio da THG de elementos genéticos, à medida que a localização desses determinantes de resistência em plasmídeos, bem como em outros componentes do mobiloma, aumenta deveras a sua mobilidade (MCCALLUM; BERGER-BACCHI; SENN, 2010; KOONIN; WOLF, 2012; SHARMA et al., 2014). Esses elementos extracromossômicos podem ser responsáveis pela grande diversidade interclonal do genoma de *P. aeruginosa* em FC, assim como carregam determinantes de virulência, resistência ou persistência microbianos, intra ou interespecies (KLOCKGETHER et al., 2011; ZANKARI et al., 2012; BIANCONI et al., 2015).

Os elementos genéticos que compõem o genoma acessório podem contribuir para a adaptação específica nos nichos que *P. aeruginosa* ocupa, a exemplo do tão particular microambiente pulmonar da FC (MATHEE et al., 2008; BIANCONI et al., 2015). As sequências genéticas chamadas de ilhas genômicas (IGs) compõem parte do mosaico que é o cromossomo de *P. aeruginosa*, exibindo um genoma central conservado, interrompido por partes inseridas do genoma acessório. As ilhas de patogenicidade, aglomerados de genes obtidos por transferência lateral de genes, estão frequentemente associadas à produção de toxinas, virulência, adesão e invasão de uma célula hospedada, além de melhorar a aptidão bacteriana, são fragmentos genômicos exógenos gigantes frequentemente relacionados à sobrevivência em condições contrárias, especialmente associados à resistência antimicrobiana (SCOTT et al., 2010; LU; LEONG, 2016).

A presença de grandes ilhas genômicas em *P. aeruginosa* isoladas de FC, como importantes elementos móveis, impactam fortemente na competitividade entre amostras de infecção crônica, contribuindo para o sucesso da sua colonização, bem como sendo um fator fundamental que confere aumento e plasticidade ao genoma, revelando-se um ponto crítico na virulência e patogenicidade microbianas (SHARMA et al., 2014; BIANCONI et al., 2015; WILLIAMS et al., 2015; JANI; MATHEE; AZAD, 2016; SUBEDI et al., 2018).

Fatores de virulência, que agem como promotores de infecção, correlacionados com a resistência microbiana e desintoxicação, muitos deles associados ao *quorum sensing*, podem regular a persistência microbiana e a ocorrência de infecções intermitentes, tornando-se um novo alvo para a terapia (ABBY et al., 2016).

CRISPR e a imunidade bacteriana a material genético exógeno

Um intrincado sistema molecular que confere imunidade às células bacterianas contra material genético invasor, introduzido via bacteriófagos ou por plasmídeos: as pequenas sequências repetitivas de DNA inseridas no genoma bacteriano compõem o sistema CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat*), compostas por grandes montantes de genes associados à virulência e resistência, em clones epidêmicos de *P. aeruginosa*, sendo também possíveis responsáveis por conferir o fenótipo MDR em algumas espécies bacterianas (SANTOS et al., 2020; SILVEIRA et al., 2020).

O sistema CRISPR e os genes associados a CRISPR (*cas*) são elementos que conferem imunidade bacteriana, importantes para a modulação dos genomas acessórios (McGINN; MARRAFFINI, 2019). Em certos genótipos clínicos de *P. aeruginosa*, a presença desse aparato de defesa pode tornar essas amostras mais prevalentes e virulentas (van BELKUM et al., 2015; MARRAFFINI, 2015). Na FC, alguns estudos indicam que a análise da circulação e tipagem dessas sequências curtas repetitivas possibilita a análise de amostras epidêmicas patogênicas, permitindo a identificação por elementos CRISPRs relacionados entre os pacientes, bem como sua contribuição na disseminação e coevolução de *P. aeruginosa* e seus bacteriófagos, sendo mais um fator que colabora com a gravidade da doença nesse grupo de pacientes (MARVIG et al., 2015; ENGLAND; KIM; WHITAKER, 2018).

Hipermutabilidade

Outra relevante característica adaptativa observada em *P. aeruginosa* na FC é a hipermutabilidade (HPM), decorrente de frequência de mutação espontânea aumentada no cromossomo bacteriano (LANDERSDORFER et al., 2018). Está principalmente associado a um acúmulo de mutações no sistema de reparo do DNA (*Mismatch Repair System/MMR*), que monitora a constância e correção dos processos de replicação e recombinação pela DNA polimerase, ajustando os possíveis erros atrelados a esses (FISHEL, 1998; SMANIA et al., 2004).

As amostras de *P. aeruginosa* HPM podem apresentar-se, portanto, mais virulentas e resistentes aos antimicrobianos, uma vez que os defeitos genéticos abundantes e acumulados podem afetar genes que, por exemplo, controlam a produção de enzimas ou mesmo de estruturas de membrana que afetam a permeabilidade da célula bacteriana (SMANIA et al., 2004; COLQUE et al., 2020). Amostras HPM tendem a mostrar-se mais virulentas, com maior capacidade de invasão e sucesso na colonização por sobrevivência num ambiente rico em estressores, piora clínica e alta mortalidade dos pacientes FC (MENA et al., 2008; FELIZIANI et al., 2010).

O MMR atua reparando nucleotídeos que tenham sido introduzidos de forma imprecisa durante a replicação do DNA, além de promover a manutenção estrutural do ácido nucleico, e/ou reduz as chances recombinação por transferência horizontal de genes (DENAMUR; MATIC, 2006; LANDERSDORFER et al., 2018). O grupo de genes que fazem parte desse sistema são *mutS*, *mutL*, *mutH*, *urvD* (*mutU*), e é sabido que a inativação de algum desses genes pode levar ao aumento da taxa de mutação. O MutS reconhece e se liga à base mal pareada, o MutL se liga ao MutS e ativa a endonuclease MutH que cliva a fita não metilada na sequência GATC. A helicase II (UrvD) desenrola a dupla fita permitindo que a excisão ocorra tanto na direção 5' ou 3' (OLIVER et al., 2000; OLIVER; BAQUERO; BLÁZQUEZ, 2002; MACIÁ et al., 2004, 2005; MENA et al., 2008).

Em *P. aeruginosa* proveniente de pacientes com FC, largas inversões cromossômicas no *mutS* (KRESSE et al., 2003), gene mais frequentemente afetado e relacionado à HPM, além de mutações no sistema de genes 7,8-dihidro-8-oxo-deoxiguanosina (8-oxodG ou GO), nomeados *mutT*, *mutY* e *mutM*, quando inativados individualmente *in vitro*, podem elevar as frequências de mutação espontâneas em mais de 1000 vezes quando comparadas às amostras do tipo selvagem (MACIÁ et al., 2005; MANDSBERG et al., 2009; LUTZ et al. 2013; REES et al., 2019).

Curiosamente, em *P. aeruginosa* HPM as mutações podem ser mediadoras dos mecanismos mais comuns de resistência aos antimicrobianos, como a superexpressão de bombas de efluxo, produção de betalactamases e redução na expressão de porinas (LOMOVSKAYA et al., 2001; POOLE; SRIKUMAR, 2001; REES et al. 2019 *apud* BLUMBERG; STROMINGER, 1974).

Já foi descrita a ocorrência de presença de amostras HPM associadas a uma piora da condição pulmonar, especialmente em pacientes crônicos. Em um estudo conduzido por nosso grupo com 179 *P. aeruginosa* de FC, 43 (24%) das amostras foram classificadas como HPM, e as subpopulações exibiram maiores percentuais de resistência aos antimicrobianos (LEÃO, 2009).

As amostras de *P. aeruginosa* HPM apresentam aumento relativo na frequência de mutação espontânea, e têm-se mostrado menos susceptíveis aos carbapenêmicos em pacientes crônicos com FC (OLIVER et al., 2000; MACIÁ et al., 2004; MACIÁ et al., 2005). Esse fenótipo é largamente observado em surtos de piora clínica, em todo o mundo, mostrando uma relação entre a hipermutabilidade e resistência aumentada aos antimicrobianos, inclusive multidroga-resistência, empregados na erradicação de infecções pulmonares (FELIZIANI et al. 2014, REES et al., 2019). No Brasil, em um trabalho realizado com amostras de pacientes assistidos em dois centros hospitalares, os percentuais de amostras HPM (27,5%) estariam impactando diretamente na piora da função pulmonar (LUTZ et al., 2013).

A ocorrência de amostras com elevada frequência de mutação tem sido relatada também na variante fenotípica de *P. aeruginosa*, denominada *small colony variant* (SCV), tendo sido notadas associações com perda de sensibilidade progressiva a fármacos antipseudomonais, com baixa ou nula resposta aos regimes terapêuticos, colaborando, portanto, para a diminuição da expectativa de vida desses indivíduos (MENA et al., 2008; FUKUI, 2010; MALONE, 2015).

***Small colony variant* (SCV)**

O comportamento fenotípico SCV é uma variação da morfologia colonial bacteriana, com aspecto autoagregativo, de crescimento lento, perda da motilidade bacteriana, formação aumentada de biofilme e tamanho muito reduzido das colônias, bem como susceptibilidade reduzida aos antimicrobianos e/ou multidroga resistência. Na FC, esse fenótipo foi descrito em amostras de *P. aeruginosa* recuperadas de pacientes em estágio crônico, colaborando para a persistência da infecção (SABRA, HADDAD; ZENG, 2014), e tem sido associado

frequentemente a mutações nos genes *yfiN*, *yfiR*, *rsmA*, *wspF*, *mutS*, *fleQ* e *accBC* (MALONE, 2015).

A emergência desse fenótipo já foi descrita como ligada a mutações nos genes relacionados ao sistema de sinalização c-di-GMP (3', 5'-*cyclic-di-guanosine monophosphate*), colaborando para o tamanho diminuto das colônias, produção aumentada de exopolissacarídeos (EPS) e formação do biofilme, com outros constituintes genéticos envolvidos como *wspF*, *accBC*, *rsmA* e *fleQ*, que quando mutados já foram descritos como relacionados à formação das SCV (von GÖTZ et al., 2004; HICKMAN; TIFREA; HARWOOD, 2005; STARKEY et al., 2009; BLANKA, 2015).

Observando-se a atuação de cada um dos componentes desse sistema de sinalização, a diguanilato ciclase YfiN, proteína expressa constitutivamente em mutantes SCV coletados nas vias aéreas de FC, supostamente perde sua função nesses microrganismos (MALONE, 2015). Mutações nos genes *wspF*, *fleQ* e *accBC*, respectivamente uma metilesterase, um regulador transcricional e um *operon* relacionado à biossíntese de ácidos graxos, também foram associadas ao processo de desenvolvimento de cepas com características SCV (SMITH et al., 2006; BLANKA et al., 2015).

Outro regulador transcricional denominado RsmA, relacionado à virulência, modificação nos sistemas de efluxo, motilidade bacteriana e transição para a cronicidade, foi descrito por mutações possivelmente ligadas ao morfotipo SCV *in vitro* (BURROWES et al., 2006; IRIE et al., 2010).

A alta frequência de mutação espontânea no gene *mutS*, em *P. aeruginosa* recuperadas de pacientes FC, foi relacionada à persistência, hipermutabilidade, evolução para a infecção crônica e formação de SCV (OLIVER et al., 2000; SMANIA et al., 2004; MENA et al., 2007; HOGARDT; HEESEMANN, 2010; LUJÁN et al., 2011).

Algumas alterações genéticas, como deleções e substituições, além de grandes inversões cromossômicas, estão implicadas como fatores críticos na geração dessas variantes fenotípicas, além de colaborarem para a persistência e impossibilidade de erradicação das infecções por *P. aeruginosa* no ambiente pulmonar na FC (SMITH et al., 2006; BLANKA et al., 2015).

Justificativa

O sequenciamento do genoma completo tem se mostrado como uma importante ferramenta na investigação de mudanças genômicas envolvidas na evolução de cepas dos

diferentes fenótipos de *P. aeruginosa* considerando a análise de genes de resistência, virulência e persistência bacteriana, sendo atualmente utilizada em estudos de epidemiologia molecular e desenvolvimento de novas terapias em FC.

Quando observadas características peculiares de *P. aeruginosa* nas infecções pulmonares em FC, migração da fase aguda para a cronicidade, há uma evidente alteração dos fatores de virulência e patogenicidade, parte do intrincado mecanismo de adaptação ao ambiente das vias aéreas (SMITH et al., 2006; HOGARDT; HEESEMANN, 2010 e 2013).

O presente trabalho analisou, por métodos fenotípicos e moleculares, as amostras de *Pseudomonas aeruginosa* não sensíveis aos carbapenêmicos (PANSC) obtidas longitudinalmente de pacientes FC com infecção crônica assistidos em dois centros de referência na cidade do Rio de Janeiro, caracterizando nas diferentes apresentações morfológicas a evolução da resistência aos antimicrobianos.

Tais investigações justificam-se diante da indigência de monitoramento dessas amostras, dada a possibilidade de disseminação de mecanismos de resistência bacterianos, diminuição da susceptibilidade aos antimicrobianos antipseudomonais, capacidade de dispersão de clones epidêmicos entre os pacientes e sua implicação direta no aumento das taxas de morbidade e mortalidade, fortemente associados à infecção crônica por *P. aeruginosa*.

1 OBJETIVOS

1.1 Geral

Avaliar, temporalmente, a susceptibilidade aos antimicrobianos e a presença de amostras hipermutáveis de *Pseudomonas aeruginosa* não sensíveis aos carbapenêmicos obtidas de pacientes com fibrose cística com infecção pulmonar crônica.

1.2 Específicos

- 1) Determinar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos;
- 2) Determinar a ocorrência de perfis de multidroga resistentes, extensivo droga resistentes ou pandroga resistentes e sua distribuição temporal;
- 3) Determinar a Concentração Inibitória Mínima para os antimicrobianos: imipenem, meropenem, doripenem e polimixina;
- 4) Determinar as taxas de frequência de mutação espontânea;
- 5) Investigar a circulação de amostras hipermutáveis e sua correlação com a susceptibilidade aos antimicrobianos;
- 6) Realizar o sequenciamento do genoma completo e analisar por diferentes ferramentas de bioinformática amostras de diferentes fenótipos de *P. aeruginosa* recuperados de um caso clínico.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Pacientes, espécimes clínicos e critério de seleção das amostras bacterianas

As 143 amostras de *P. aeruginosa* não sensíveis aos carbapenêmicos (PANSC) incluídas neste estudo foram obtidas de 18 pacientes pediátricos (nove) e adultos (nove), com diagnóstico de FC, no período de 2007 a 2016. Todos os pacientes apresentavam infecção pulmonar crônica por *P. aeruginosa* [ocorrência de *P. aeruginosa* persistente em culturas microbiológicas por pelo menos seis meses consecutivos] (LEE et al., 2005). Os pacientes eram atendidos no Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira da Fundação Oswaldo Cruz (IFF-FIOCRUZ) e no Departamento de Doenças do Tórax, setor Pneumologia/ Policlínica Piquet Carneiro/Hospital Universitário Pedro Ernesto/ Universidade do Estado do Rio de Janeiro (HUPE-UERJ), dois centros de referência no Rio de Janeiro, ambos responsáveis pelo acompanhamento dos pacientes pediátricos e adultos com FC, respectivamente.

O acompanhamento microbiológico regular, em ambos os centros, foi realizado no Laboratório de Bacteriologia Clínica do HUPE (LABACT-HUPE). Os espécimes respiratórios foram processados e os patógenos isolados foram identificados por metodologias fenotípicas e moleculares, e submetidos aos testes de susceptibilidade a antimicrobianos, quando aplicável (MILLER et al., 2018). Em seguida, as amostras foram direcionadas para o Laboratório de Microbiologia da Fibrose Cística (LabMiFC), da Disciplina de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Ciências Médicas da UERJ onde foram catalogadas e estocadas.

2.2 Estoque bacteriano

Todas as amostras de *P. aeruginosa* foram estocadas em solução de leite desnatado a 10% (Skin Milk; Difco Laboratories, Detroit, Michigan, EUA) contendo glicerol a 10% e mantidas a -20°C, até a realização dos testes.

2.2.1 Identificação bacteriana

As amostras, recuperadas a partir da coleção bacteriológica do LabMiFC foram previamente identificadas no LABACT/HUPE, através de provas fenotípicas, como a

avaliação do metabolismo oxidativo da glicose (não-fermentadora), detecção da produção de oxidase (positiva), descarboxilação da arginina (positiva), e fisiológicas, como o crescimento a 42°C (positiva) e teste de mobilidade (*motility*) (Miller et al., 2018).

Os morfotipos não mucoide (NM), mucoide (MUC) e *small colony variant* (SCV) foram estabelecidos pela verificação visual da morfologia colonial (BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2013).

2.3 Testes de susceptibilidade aos antimicrobianos

2.3.1. Teste de disco-difusão (TDD)

Foram realizados os testes de susceptibilidade aos antimicrobianos com os seguintes discos: piperacilina/tazobactam 10 µg (PTZ), ceftazidima 30 µg (CAZ), cefepime 30 µg (FEP), imipenem 10 µg (IPM), aztreonam 30µg (ATM), gentamicina 10 µg (GEN), ampicilina 30 µg (AMI), meropenem 10 µg (MEM), ciprofloxacina 5 µg (CIP) e tobramicina 10 µg (TOB) e doripenem 10 µg (DOR) (Becton, Dickinson and Company, BD, Sparks, Estados Unidos), pelo método de disco-difusão em ágar, seguindo as recomendações de execução e os critérios de leitura, descritos no *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI a e c, 2020). Como controle de qualidade, foi utilizada a cepa *P. aeruginosa* ATCC® 27853.

2.3.2 Determinações das concentrações inibitórias mínimas (CIMs)

Foram determinadas as CIMs, pelo método de microdiluição em caldo, para os antimicrobianos IPM, MEM, DOR e polimixina (POL) (Sigma, St. Louis, EUA), nas amostras de *P. aeruginosa*, conforme recomendações descritas nos documentos CLSI b e c (2020).

Foram testadas as amostras, por essa técnica, sempre em duplicata. Deste modo, foi considerada a CIM aquela concentração observada nas duplicatas. Havendo discordância entre as determinações, procedeu-se à repetição do método. Como controle de qualidade, foi utilizada a cepa *P. aeruginosa* ATCC® 27853.

2.3.2.1 Preparo da solução padrão de antimicrobiano

Foi utilizada a equação abaixo, para preparo das soluções-padrão dos agentes antimicrobianos utilizados:

$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{Volume (mL)} \times \text{Concentração } (\mu\text{g/mL})}{\text{Potência } (\mu\text{g/mL})}$$

Foram estabelecidas as maiores concentrações a serem testadas para cada agente antimicrobiano e as soluções padrão foram preparadas na concentração de 10 mg/mL, equivalente a 10.000 $\mu\text{g/mL}$, para todos os antimicrobianos (Quadro 1).

Quadro 1 - Concentrações utilizadas na determinação da concentração inibitória mínima para imipenem, meropenem, doripenem e polimixina, cepa controle utilizada e faixa aceitável do controle de qualidade

Antimicrobiano	Concentrações testadas ($\mu\text{g/mL}$)	Cepa de referência para controle de qualidade	Faixa aceitável ($\mu\text{g/mL}$)
Imipenem	256; 128; 64; 32; 16; 8; 4; 2; 1; 0,5 e 0,25	<i>P. aeruginosa</i> ATCC® 27853	1 - 4
Meropenem	64; 32; 16; 8; 4; 2; 1; 0,5, 0,25, 0,125 e 0,065	<i>P. aeruginosa</i> ATCC® 27853	0,12 – 1
Doripenem	32; 16; 8; 4; 2; 1; 0,5, 0,25, 0,125, 0,065 e 0,0325	<i>P. aeruginosa</i> ATCC® 27853	0,12- 0,5
Polimixina	128; 64; 32; 16; 8; 4; 2; 1; 0,5, 0,25 e 0,125	<i>P. aeruginosa</i> ATCC® 27853	0,5 - 2

Fonte: CLSI b e c (2020).

A potência e a quantidade de antimicrobiano pesada, assim como o solvente utilizado para cada agente estão discriminadas no quadro 2.

Quadro 2 - Dados para a diluição e preparo dos antimicrobianos imipenem, meropenem, doripenem e polimixina, para a determinação da concentração inibitória mínima

Antimicrobiano	Potência (µg/mg)	Quantidade pesada (g)	Solvente (s)	Diluyente
Imipenem	1000	0,0100	Tampão fosfato pH 7,2 a 0,01 mol/L	Tampão fosfato pH 7,2 a 0,01mol/L
Meropenem	1000	0,0100	Água	Água
Doripenem	1000	0,0100	Solução salina	Solução salina
Polimixina	1000	0,0100	Água	Água

Fonte: CLSI b (2020).

2.3.2.2 Preparo do meio de cultura

Para o teste de microdiluição em caldo, o meio utilizado foi o caldo *Mueller Hinton* (MH) (BD[®], Heidelberg, Alemanha), com ajuste prévio das concentrações dos cátions divalentes cálcio e magnésio (*Cation-Adjusted Mueller Hinton Broth* – CAMHB). Para o ajuste, tornou-se necessária a preparação de soluções-padrão contendo os referidos cátions. Para o preparo da solução padrão de cálcio, 3,68g de CaCl₂.2H₂O foram dissolvidos em 100 mL de água deionizada. Esta solução continha 10 mg de Ca⁺⁺/mL. Para o preparo da solução padrão de magnésio, 8,36g de MgCl₂.6H₂O foram dissolvidos em 100 mL de água deionizada. Essa solução continha 10 mg de Mg⁺⁺/mL. As soluções padrão foram esterilizadas por filtração através de membrana e armazenadas a temperatura de 2 a 8°C.

Foi feito o ajuste das concentrações dos cátions, no caldo CAMHB, apenas no momento da utilização do meio de cultura. Adicionou-se 0,20 e 0,1 mL solução padrão de cada cátion, respectivamente (20 a 25mg de Ca⁺⁺/L e 10 a 12,5mg de Mg⁺⁺/L), para cada litro de CAMHB (CLSI b).

2.3.2.3 Preparo das soluções de antimicrobianos

A solução de antimicrobiano padrão, ou “solução de uso”, continha a maior concentração dentre as outras, na determinação da CIM para cada antibiótico testado. Assim, para cada amostra bacteriana, foram necessários 12 poços de uma placa de microtitulação, com fundo em “U”. No primeiro poço, foram adicionados 200 µL da solução de uso, contendo a maior concentração da faixa escolhida. Nos 11 poços restantes, foram adicionados 100 µL de CAMHB. Partiu-se, então, à diluição seriada, recolhendo-se 100 µL do primeiro poço aos demais. Chegando ao décimo primeiro poço, os 100 µL recolhidos por ocasião da diluição seriada, foram descartados, de forma que o último poço permaneceu sem a adição de agente antimicrobiano, servindo então como controle de crescimento. Para o teste ser considerado válido, foi necessária a observação de crescimento bacteriano no poço de controle (CLSI b, 2020).

2.3.2.4 Preparo da suspensão bacteriana

O método usado foi o da suspensão direta de colônias bacterianas, para o preparo do inóculo. Partiu-se de uma cultura bacteriana recente, da qual foi realizada uma suspensão em solução salina (NaCl 0,9%), de forma que fosse obtida uma turbidez correspondente ao padrão 0,5 de McFarland (1×10^8 UFC/mL). Essa suspensão foi então diluída 1:10 para obtermos uma diluição de 10^7 UFC/mL. Desse modo, 5µL dessa suspensão foram inoculados nos 100µL de CAMHB previamente dispensados em cada poço da placa de microtitulação, resultando em uma concentração final de bactérias de aproximadamente 5×10^4 UFC/poço (CLSI b, 2020).

2.3.2.5 Incubação, leitura e determinação dos resultados das CIM

As placas de microtitulação, depois de inoculadas as suspensões bacterianas, foram incubadas a $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, por 24 h, em estufa, em aerobiose. A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração de antimicrobianos capaz de inibir o crescimento bacteriano, conforme detectado visualmente (CLSI b, 2020), e os critérios de interpretação de susceptibilidade dos microrganismos testados estão dispostos no quadro 3 (CLSI c, 2020).

Quadro 3 - Critérios de interpretação da susceptibilidade da concentração inibitória mínima, para as amostras de *Pseudomonas aeruginosa*

Antimicrobiano	Sensível	Intermediário	Resistente
Imipenem	$\leq 2 \mu\text{g/mL}$	$4 \mu\text{g/mL}$	$\geq 8 \mu\text{g/mL}$
Meropenem	$\leq 2 \mu\text{g/mL}$	$4 \mu\text{g/mL}$	$\geq 8 \mu\text{g/mL}$
Doripenem	$\leq 2 \mu\text{g/mL}$	$4 \mu\text{g/mL}$	$\geq 8 \mu\text{g/mL}$
Polimixina	$\leq 2 \mu\text{g/mL}$	$4 \mu\text{g/mL}$	$\geq 8 \mu\text{g/mL}$

Fonte: CLSI c (2020).

Foi avaliada a ocorrência dos fenótipos de MDR, XDR e PDR dentre as 143 amostras e, para tanto, foram utilizados os resultados do TDD (para a maioria dos antimicrobianos testados), e da CIM para POL.

2.3.3 Classificação das amostras de acordo com fenótipos de resistência: multidroga-resistentes (MDR), extensivo-droga resistentes (XDR) e pandroga-resistentes (PDR)

Foram adotados critérios adaptados à partir daqueles estabelecidos por Magiorakos et al. (2012), considerando-se o número de classes de antimicrobianos avaliados no presente estudo, para alcançar a classificação das amostras de *P. aeruginosa* como: MDR, amostra não sensível a um ou mais agentes, em três ou mais categorias de antimicrobianos testados; XDR, amostra não sensível a pelo menos 80% das categorias dos antimicrobianos testados; e, PDR, não sensível a todos os agentes testados (Quadro 4). Foram consideradas sete categorias de antimicrobianos: cefalosporinas antipseudomonais (CAZ e FEP), penicilinas antipseudomonais e inibidores de betalactamases (PTZ), monobactâmicos (ATM), carbapenêmicos antipseudomonais (IPM, MEM e DOR), aminoglicosídeos (GEN, AMI e TOB), fluoroquinolonas antipseudomonais (CIP) e polimixina (POL), a fim de se estabelecerem os perfis de susceptibilidade e o escalonamento das amostras MDR, XDR e PDR.

Quadro 4 - Categorias e agentes considerados neste estudo para a classificação das amostras de *Pseudomonas aeruginosa* como multidroga resistentes, extensivo droga resistentes e pandroga resistentes, nos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos

Categorias dos antimicrobianos	Agentes antimicrobianos
Aminoglicosídeos	Gentamicina, Amicacina e Tobramicina
Carbapenêmicos antipseudomonais	Imipenem, Meropenem e Doripenem
Cefalosporinas	Ceftazidima e Cefepime
Fluoroquinolonas antipseudomonais	Ciprofloxacina
Penicilinas antipseudomonais + inibidores de betalactamases	Piperacillin-tazobactam
Monobactâmicos	Aztreonam
Polimixinas	Polimixina B

Fonte: Adaptado de Magiorakos et al., 2012.

2.4 Hipermutabilidade

A frequência de mutação de cada amostra foi obtida pela comparação do número de colônias que cresceram após a semeadura em meio de cultura com base de ágar *Mueller Hinton* (MHA), com e sem o antimicrobiano rifampicina.

2.4.1 Preparo dos meios de cultura

Para a determinação da frequência de mutação das amostras incluídas nesse estudo, foi preparado caldo *Mueller Hinton* (MHB) para crescimento bacteriano (BD[®], Heidelberg, Alemanha), assim como placas de ágar *Mueller Hinton* (BD[®], Heidelberg, Alemanha) sem e com adição do antimicrobiano rifampicina (Sigma, St. Louis, EUA) [300mg/ml] (MHARif).

2.4.2 Preparo da suspensão bacteriana

Com o auxílio de uma alça bacteriológica, foram coletadas de uma a cinco colônias isoladas de uma placa de MHA, a partir de cultura recente, e feita uma suspensão bacteriana em 10mL de MHB e incubada à $35\pm 2^\circ\text{C}$ por 18 a 24h, sob agitação. Após essa etapa, a suspensão foi centrifugada a 3.000 rpm por 5 minutos, desprezado o sobrenadante e o precipitado ressuspendido em 1mL de MHB fresco. Em seguida, foram feitas diluições seriadas de base 10, de 10^{-1} a 10^{-8} .

2.4.3 Semeadura e incubação das suspensões bacterianas em meio de cultura com e sem antimicrobiano

Nas placas de MHA, foram inoculados e semeados volumes de 10 μL , obtidos da diluição seriada de base 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-8} , enquanto 100 μL foram dispostos sobre as placas de MHARif, com as diluições de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} . As placas foram incubadas, e os resultados lidos após 36h, a $35\pm 2^\circ\text{C}$, em aerobiose.

2.4.4 Cálculo da frequência de mutação espontânea

A frequência de mutação foi calculada avaliando o número de colônias que cresceram no meio com rifampicina em relação àquelas que cresceram no meio sem a adição deste antimicrobiano. As amostras hipermutáveis foram assim classificadas quando a sua frequência de mutação calculada apresentou taxa igual ou superior a 20 vezes a frequência de mutação da cepa PAO1 (OLIVER et al., 2000; MACIÁ et al., 2004), utilizada como controle negativo.

Frequência de mutação (f) :
$$\frac{\text{n}^\circ \text{ de colônias que cresceram no meio com rifampicina}}{\text{n}^\circ \text{ de colônias que cresceram no meio sem rifampicina}}$$

A partir desse teste, foi gerada a subpopulação mutante (resistente a rifampicina), que foi coletada e estocada, sendo realizados para essas amostras os testes de disco-difusão e determinada a CIM para os carbapenêmicos e polimixina. a população selvagem.

2.4.5 Classificação quanto à frequência de mutação

As taxas de frequência de mutação (f), como proposto por Ciofu et al. (2005), foram categorizadas em três grupos: frequência de mutação espontânea fortemente aumentada (SIS f), quando f fosse $\geq 2 \times 10^{-7}$, frequência de mutação espontânea aumentada (WIS f) quando f fosse $< 2 \times 10^{-7}$ e $\geq 2 \times 10^{-8}$, e frequência de mutação espontânea não aumentada (NIS f) quando f fosse $< 2 \times 10^{-8}$.

2.5 Sequenciamento de Genoma Total (SGT)

Em abril de 2017, mesmo já encerrado o período de obtenção de dados clínicos e inclusão de amostras bacterianas no nosso estudo, os resultados microbiológicos de um paciente, chamaram a nossa atenção.

O paciente se encontrava em exacerbação do quadro respiratório, com piora da função pulmonar e houve a necessidade de internação hospitalar. Uma cultura de escarro foi realizada e foi possível detectar três morfotipos de *P. aeruginosa*: um mucoide, outro não mucoide e um terceiro *small colony variant* (SCV). Dois meses depois da alta hospitalar, uma segunda internação fez-se necessária, e o mesmo padrão microbiológico foi observado em uma nova cultura de escarro.

Dada a ausência de relatos de fenótipo denominado SCV em *P. aeruginosa* em pacientes com FC, no Brasil, realizamos o SGT das seis amostras obtidas nesse período (ANEXO C).

2.5.1 Extração do DNA bacteriano, montagem e anotação dos genomas

O DNA de cada amostra bacteriana foi purificado a partir de cultura recente usando o kit de purificação *Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel band Purification* (GE Healthcare) e extraído pelo kit de extração em coluna *PureLink® Genomic Elution Buffer* (Invitrogen™). As bibliotecas foram criadas usando Nextera XT e sequenciadas com a tecnologia *Illumina* (*Illumina Inc*, USA) no equipamento MiSeq System com cobertura de 40 x, e os *reads* não montados foram disponibilizados em *Sequence Reads Archives* (PRJNA580445,

PRJNA580449, PRJNA580450, PRJNA580453, PRJNA580455 and PRJNA580457). Os resultados do sequenciamento dos *reads* foram ajustados e montados *de novo* com o montador de genoma *Spades 3.5* (BANKEVICH et al., 2012). A qualidade do sequenciamento do genoma foi determinada pelo uso do *FASTQ toolkit* (Illumina Inc, USA). Os projetos de *Whole Genome Shotgun* foram depositados no *DDBJ/ENA/GenBank* sob os números de acesso WUTK00000000, WUTL00000000, WUTM00000000, WUTN00000000, WUTO00000000 e WUTP00000000 (APÊNDICE).

2.5.2 Ferramentas de análise do sequenciamento de genoma total

A partir do sequenciamento dos genomas, os *contigs* gerados foram submetidos à anotação no serviço de anotação automática de genomas de procariotos *Rapid Annotation Subsystem Technology* (RAST), *National Microbial Pathogen Data Resource* (NMPDR), *SEED-based* (rast.nmpdr.org/).

A ferramenta de busca *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=MicrobialGenomes) foi usada para a investigação de sequências de nucleotídeos e aminoácidos, usando através da consulta pelos programas de alinhamento BLAST n (nucleotídeos) e BLAST p (proteínas).

Na identificação de genes associados à resistência aos antimicrobianos, a ferramenta de busca *ResFinder* (cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder), associada à plataforma *Center of Genomic Epidemiology* (CGE) (genomicepidemiology.org/), foi utilizada a fim de detectar genes de resistência extrínsecos e a plataforma *Applying Pathosystems Resource Integration Center* (PATRIC) (patricbr.org/), para genes de resistência intrínsecos (*Nacional Database of Antibiotic Resistance Organisms/NDARO*) e fatores de virulência (*Virulence Factor Database/VFDB*).

A base de dados *PubMLST* (pubmlst.org/) foi empregada para a identificação e tipagem molecular do *sequence type* (ST), bem como para a avaliação da diversidade genômica microbiana.

Na caracterização do mobiloma das amostras, investigou-se a ocorrência de elementos como fagos, ilhas de patogenicidade e sequências de inserção. e com a finalidade de encontrar sequências de fagos, foi consultada a base de dados *Phaster* (phaster.ca). O programa *online Islandviewer* (pathogenomics.sfu.ca/islandviewer) foi usado na busca e identificação de ilhas de patogenicidade, em comparação com a cepa de referência selvagem PAO1. Sequências de

inserção foram classificadas de acordo com análise via BLAST, interfaciado pela base de dados *IS Finder* (is.biotoul.fr).

O *Universal Protein Resource (UniProt)* foi utilizado na proposição e investigação de proteínas e seus dados de anotação (uniprot.org).

Para a checagem das sequências de nucleotídeos e aminoácidos de interesse, o programa *BioEdit* (mbio.ncsu.edu/BioEdit/) foi aplicado para analisar as dissimilaridades entre os genes, de maneira comparativa, entre as seis amostras.

Na busca por identificação e quantificação das sequências associados ao mecanismo de defesa bacteriano, sequências de *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (CRISPR) e genes *Cas*, foi usado o programa online *CRISPRCas finder* (crispr.i2bc.paris-saclay.fr/Server/).

3 RESULTADOS

3.1 Distribuição temporal de *Pseudomonas aeruginosa* não sensíveis aos carbapenêmicos

Foram analisados os resultados de culturas respiratórias de pacientes FC com infecção pulmonar crônica que apresentavam crescimento de *P. aeruginosa* não sensíveis aos carbapenêmicos (PANSC), ao longo de dez anos (2007 a 2016). Foram incluídas no estudo 143 amostras de PANSC, provenientes de 18 pacientes. Nove pediátricos (P) com 77 amostras (53,9%) e nove adultos (A) com 66 amostras (46,1%). O número de amostras obtidas por paciente variou de uma a 29 para os adultos, e de duas a 23, para os pediátricos. Os pacientes que apresentaram os maiores números de amostras recuperadas no período foram: 8 A (n= 29/ 20,3%), 17 P (n= 23/ 16,1%), 14 A (n= 18/ 12,6%), 16 P (n= 16/ 11,2%) e 4 P (n= 16/ 11,2%) (Tabela 1).

Tabela 1 – Número de amostras de *Pseudomonas aeruginosa* não sensíveis aos carbapenêmicos, isoladas de pacientes com fibrose cística ao longo de dez anos

Paciente	Data de nascimento	<i>P. aeruginosa</i> (n=143) n (%)	Clínica
1 P	*	2 (1,4)	IFF
2 A	20/09/1983	5 (3,5)	PPC
3 A	02/05/1981	8 (5,6)	PPC
4 P	23/09/1999	16 (11,2)	IFF
5 P	*	8 (5,6)	IFF
6 A	04/02/1991	1 (0,7)	PPC
7 A	15/09/1986	1 (0,7)	PPC
8 A	10/08/1987	29 (20,2)	PPC
9 P	15/09/1999	4 (2,8)	IFF
10 P	*	2 (1,4)	IFF
11 P	09/09/2001	4 (2,8)	IFF
12 A	07/06/1982	1 (0,7)	PPC
13 A	15/12/1988	2(1,4)	PPC
14 A	21/06/1981	18 (12,6)	PPC
15 P	02/05/1997	2 (1,4)	IFF
16 P	03/07/2009	16 (11,2)	IFF
17 P	28/11/2000	23 (16,1)	IFF
18 A	*	1 (0,7)	PPC

Legenda: IFF: Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernando Figueiras/FIOCRUZ; PPC: Policlínica Piquet Carneiro/UERJ. * = data de nascimento não localizada.
A: paciente adulto; P: paciente pediátrico. n: número de amostras; %: percentual de amostras.
Fonte: A autora.

O período entre o primeiro e o último isolamento de PANSC variou de 1 a 8 anos entre os 18 pacientes. O paciente 14A foi o que apresentou o maior intervalo entre a primeira e a última coleta (primeira amostra em 2008 e última amostra em 2016). Quando os dados foram analisados temporalmente, os anos em que houve um maior número de PANSC foram 2016 (38 amostras), 2014 (26 amostras), 2013 (18 amostras) e 2012 (17 amostras) (Tabela 2).

Os indivíduos que apresentaram uma maior ocorrência de PANSC ao longo dos anos, foram os pacientes: 14A (8 anos = 2008, 2009, 2010, 2012, 2013, 2014, 2015 e 2016); 4P (7 anos = 2008, 2009, 2011, 2012, 2014, 2015 e 2016) e 8A (7 anos =2007, 2008, 2010, 2011, 2012, 2013 e 2014). Por outro lado, em 22,2 % dos pacientes uma única amostra de PANSC

foi recuperada (6A, 7A, 12A e 18A). O paciente 17P foi o que exibiu o maior número de amostras (n=18) concentradas em um mesmo ano (2016) (Tabela 2).

Tabela 2: Distribuição das amostras de *Pseudomonas aeruginosa* não sensíveis aos carbapenêmicos, isoladas de pacientes com fibrose cística ao longo do período de estudo

Paciente	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
1P (n=2)						1			1	
2A (n=5)					1		1	1		2
3A (n=8)				1	2	2	2	1		
4P (n=16)		3	2		2	1		3	2	3
5P (n=8)				2	2					4
6A (n=1)				1						
7A (n=1)								1		
8A (n=29)	1	1		5	4	7	3	8		
9P (n=4)				1		2		1		
10P (n=2)						1				1
11P (n=4)									1	3
12A (n=1)										1
13A (n=2)										2
14A (n=18)		2	1	1		2	7	1	2	2
15P (n=2)										2
16P (n=16)				1	1		5	9		
17P (n=23)								1	4	18
18A (n=1)						1				
Total	1	6	3	12	12	17	18	26	10	38

Legenda: A: paciente adulto; P: paciente pediátrico. n: número absoluto de amostras de *Pseudomonas aeruginosa* não sensíveis aos carbapenêmicos.

Fonte: A autora.

3.2 Testes de susceptibilidade aos antimicrobianos

3.2.1 Disco-difusão

Das 143 amostras de PNSC, 137 (95,8%), 86 (60,1%) e 57 (39,9%) foram exclusivamente não sensíveis a IPM, MEM e DOR, respectivamente, e 81 (56,6%), 51

(35,7%), 38 (26,6%) e 33 (23,1%) foram NS concomitantemente a IPM+MEM, IPM+DOR, MEM+DOR e IPM+MEM+DOR, nesta sequência.

Avaliando-se o total de amostras, e excluindo-se os antimicrobianos do grupo dos carbapenêmicos, os maiores percentuais de não susceptibilidade foram observados para GEN (51,7%), AMI (50,3%), TOB (44,7%) e CIP (44,1%). As amostras recuperadas de pacientes pediátricos eram mais resistentes aos antimicrobianos GEN, AMI, TOB E CIP (acima de 60%), enquanto as recuperadas de paciente adultos mostraram resistência acima de 50% a ATM, CAZ e FEP (Tabela 3).

Tabela 3: Distribuição dos percentuais de resistência aos antimicrobianos em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* não sensíveis aos carbapenêmicos, isoladas de pacientes com fibrose cística

	PTZ	ATM	CAZ	FEP	IPM	MEM	DOR	GEN	AMI	TOB	CIP
	n (%)										
Total (n= 143)	41 (28,7)	57 (39,9)	49 (34,3)	52 (36,0)	137 (95,8)	86 (60,1)	57 (39,9)	74 (51,7)	72 (50,3)	64 (44,7)	63 (44,1)
Amostras P (n=77)	26 (33,8)	25 (32,5)	21 (27,3)	26 (33,8)	75 (54,7)	44 (51,2)	35 (61,4)	46 (62,2)	44 (61,1)	40 (62,5)	41 (65,1)
Amostras A (n=66)	15 (36,6)	32 (56,1)	28 (57,1)	26 (50)	62 (45,3)	42 (48,8)	22 (38,6)	28 (37,8)	28 (38,9)	24 (37,5)	22 (34,9)
1P (n=2)					2			2	2	2	1
2A (n=5)		1			5	1	2	2	1	1	
3A (n=8)		2			8	1			3	2	
4P (n=16)	7	5	5	6	16	12	7	9	10	8	4
5P (n=8)	3	4	2	2	8	1	2	2	3	3	6
6A (n=1)					1						
7A (n=1)	1	1	1	1	1	1		1	1	1	
8A (n=29)	13	23	21	19	26	26	14	15	17	11	14
9P (n=4)	2	1	2	2	3	3	2	2	1	1	
10P (n=2)					1	1	2				
11P (n=4)	2	2	1	2	4	1	3	1	1	1	3
12A (n=1)					1	1	1	1	1	1	1
13A (n=2)		1			2			2		2	
14A (n=18)	1	4	6	6	17	12	5	6	4	6	7
15P (n=2)		1		1	2	1	1	1			1
16P (n=16)	6	6	5	8	16	11	9	13	13	14	14
17P (n=23)	6	6	6	5	23	14	9	16	14	11	12
18A (n=1)					1			1	1		

Legenda: n: número absoluto de amostras de *Pseudomonas aeruginosa* não sensíveis aos carbapenêmicos. PTZ: piperacilina + tazobactam; ATM: aztreonam; CAZ: ceftazidima; FEP: cefepime; IPM: imipenem; MEM: meropenem; DOR: doripenem; GEN: gentamicina; AMI: ampicilina; TOB: tobramicina; CIP: ciprofloxacina. Amostras P: amostras de pacientes pediátricos; Amostras A: amostras de pacientes adultos. P: pacientes pediátricos; A: pacientes adultos.

Fonte: A autora.

Pôde-se observar, ao longo dos dez anos, um aumento no número de amostras resistentes aos antimicrobianos. O ano de 2016 destacou-se pelo elevado número de amostras não sensíveis entre os pacientes pediátricos. Para os pacientes adultos, houve uma distribuição mais irregular (Tabela 4).

Avaliando-se cada antimicrobiano, ano a ano, as amostras recuperadas de pacientes pediátricos começaram a mostrar-se menos sensíveis à CIP a partir de 2011, e à GEN, AMI e TOB a partir de 2013. No grupo daquelas obtidas de pacientes adultos, o número de amostras não sensíveis ao FEP, ATM e CAZ aumentou gradualmente a partir de 2012 (Tabela 4).

Tabela 4: Distribuição temporal das amostras de *Pseudomonas aeruginosa* não sensíveis aos carbapenêmicos, isoladas de pacientes com fibrose cística

Ano	2007		2008		2009		2010		2011		2012		2013		2014		2015		2016	
ATB*	P (n)	A (n)																		
PTZ (n=41)	-	1	1	1	2	-	-	1	3	-	2	3	2	3	5	6	1	-	10	-
ATM (n=57)	-	1	1	2	2	-	-	3	3	4	2	8	2	6	4	7	2	-	9	1
CAZ (n=49)	1	1	1	1	-	-	1	1	3	2	1	8	2	6	3	7	3	2	6	-
FEP (n=52)	-	1	1	2	2	-	-	2	3	3	2	6	2	5	7	6	2	-	7	1
IPM (n=137)	-	1	3	3	2	1	4	8	5	7	4	11	5	12	13	10	9	2	30	7
MEM (n=86)	-	1	2	2	2	1	2	5	1	6	3	7	5	8	11	8	5	1	13	3
DOR (n=57)	-	-	2	-	-	1	-	-	1	3	3	3	3	5	9	9	3	-	14	1
GEN (n=74)	-	1	2	2	2	-	-	2	4	3	3	6	5	4	11	5	7	1	12	4
AMI (n=72)	-	-	2	1	2	-	1	2	2	4	3	8	5	4	10	6	5	1	14	2
TOB (n=64)	-	1	2	2	2	-	-	2	4	3	3	3	5	2	10	5	4	2	10	4
CIP (n=63)	-	-	1	-	-	-	2	2	4	1	1	5	5	8	9	4	3	-	16	2
Total	1	8	18	16	16	3	10	28	33	36	27	68	41	63	92	73	44	9	141	25

Legenda: ATB: antimicrobiano testado. n: número absoluto de amostras de *Pseudomonas aeruginosa* não sensíveis ao antimicrobiano. PTZ: piperacilina + tazobactam; ATM: aztreonam; CAZ: ceftazidima; FEP: cefepime; IPM: imipenem; MEM: meropenem; DOR: doripenem; GEN: gentamicina; AMI: amicacina; TOB: tobramicina; CIP: ciprofloxacina. A: paciente adulto; P: paciente pediátrico. -: ausência de amostra não sensível ao antimicrobiano. Sombreado em rosa: período em que foi identificado um aumento no número de amostras não sensíveis ao antimicrobiano.

Fonte: A autora.

3.2.2 Concentração inibitória mínima

Foi determinada a CIM para IPM, MEM, DOR e POL nas 143 amostras de *P. aeruginosa*. Os valores de CIM variaram de 0,5 a 128 µg/mL, 0,125 a 64 µg/mL, 0,25 a 32 µg/mL e 0,25 a 16 µg/mL para IPM, MEM, DOR e POL, respectivamente. Analisando-se estes resultados, 133 (93%) das amostras foram não sensíveis a IPM, 80 (56%) a MEM e 63 (44%) a DOR (Tabela 5).

Analisando-se a distribuição dos valores da CIM₅₀ e CIM₉₀ nos dois grupos de pacientes, os valores para IPM foram maiores entre as amostras dos pacientes pediátricos, equivalendo a 32 µg/mL e 64 µg/mL, respectivamente. (Tabela 5).

No grupo das amostras dos pacientes adultos os valores para CIM₅₀ e CIM₉₀ foram de 8 e 32 µg/mL. Para o MEM, a CIM₅₀ foi 4 µg/mL, nos dois grupos, e a CIM₉₀, 16 µg/mL e 8 µg/mL, amostras de pacientes pediátricos e adultos, respectivamente. Para DOR, o valor da CIM₅₀ foi de 2 µg/mL, em ambos os grupos de amostras, e a CIM₉₀, 32 µg/mL e 8 µg/mL, para as amostras de pacientes pediátricos e de adultos, respectivamente. Para o antimicrobiano POL, o valor da CIM₅₀ foi de 2 µg/mL e a CIM₉₀ foi 4 µg/mL, nas amostras de pacientes pediátricos e adultos, respectivamente (Tabela 5).

Considerando a distribuição das faixas de CIM por paciente, nota-se que o menor valor para IPM foi de 0,5 µg/mL, observado em uma única amostra do paciente 14A, e a maior foi de 128 µg/mL observada em 8 amostras distribuídas entre os pacientes 3A (n=1), 4P (n=2), 5P (n=2), 11P (n=1) e 17P (n=2). Para o antimicrobiano MEM, a menor CIM foi de 0,125 µg/mL para as amostras recuperadas dos pacientes 3A (n=2), 4P (n=1) e 14A (n=1), e a maior faixa foi 64 µg/mL, com 4 amostras pertencentes aos pacientes 3A, 4P, 8A e 9P. A menor CIM para DOR foi de 0,25 µg/mL, observadas 8 amostras dos pacientes 14A (n=2), 15P (n=1), 16P (n=1) e 17P (n=4), enquanto que a maior faixa da CIM, 32 µg/mL, foram identificadas em 18 amostras dos pacientes 3A (n=1), 4P (n=5), 5P (n=1), 8A (n=3), 12A (n=1), 15P (n=1), 16P (n=1) e 17P (n=5) (Tabela 6).

Quarenta e cinco amostras (31,5%) foram classificadas como não sensíveis a polimixina (PANSP), com CIM que variaram de 4 a 16 µg/mL. Essas amostras foram observadas em 14 (78%) pacientes (Tabela 7). O menor e maior valores observados para POL, foi de 0,25 e 16 µg/mL, ambos em uma única amostra dos pacientes 8A e 14A (Tabela 7).

Tabela 5: Variação da concentração inibitória mínima (CIM) para carbapenêmicos e polimixina, com suas respectivas CIM₅₀ e CIM₉₀, das 143 amostras de *Pseudomonas aeruginosa* não sensíveis aos carbapenêmicos recuperadas de pacientes pediátricos e adultos com fibrose cística

	CIM ₅₀ (µg/mL)				CIM ₉₀ (µg/mL)				Variação da CIM (µg/mL)			
	IPM	MEM	DOR	POL	IPM	MEM	DOR	POL	IPM	MEM	DOR	POL
Amostras P (n=77)	32	4	2	2	64	16	32	4	1-128	0,125-64	0,25-32	0,5-8
Amostras A (n=66)	8	4	2	2	32	8	8	4	0,5-128	0,125-64	0,25-32	0,25-16
Total (n=143)	8	4	2	2	64	16	32	4	0,5-128	0,125-64	0,25-32	0,25-16

Legenda: Amostras P: amostras de pacientes pediátricos; Amostras A: amostras de pacientes adultos. CIM: concentração inibitória mínima. IPM: imipenem; MEM: meropenem; DOR: doripenem; POL: polimixina.

Fonte: A autora

Tabela 6: Distribuição das 143 amostras de *Pseudomonas aeruginosa* não sensíveis aos carbapenêmicos, nas diversas faixas que determinam a concentração inibitória mínima para os carbapenêmicos

CIM (µg/mL)	1P (n=2) (I/M/D)	2A (n=5) (I/M/D)	3A (n=8) (I/M/D)	4P (n=16) (I/M/D)	5P (n=8) (I/M/D)	6A (n=1) (I/M/D)	7A (n=1) (I/M/D)	8A (n=29) (I/M/D)	9P (n=4) (I/M/D)	10P (n=2) (I/M/D)	11P (n=4) (I/M/D)	12A (n=1) (I/M/D)	13A (n=2) (I/M/D)	14A (n=18) (I/M/D)	15P (n=2) (I/M/D)	16P (n=16) (I/M/D)	17P (n=23) (I/M/D)	18A (n=1) (I/M/D)
0,125			*/2/*	*/1/*				*/*/1						*/1/*				
0,25	*/2/*	*/3/*		*/1/*	*/2/*						*/3/*		*/2/*	*/*/2	*/*/1	*/*/1	*/*/4	*/1/*
0,5			*/2/*	*/*/1	*/3/2	*/1/*	1/*/*	*/4/12	*/1/1	*/1/1	*/*/1		*/*/1	1/4/3	*/1/*	*/*/3	*/6/6	
1	*/*/1	*/*/1	1/2/4	1/2/4	1/2/4			1/*/*	1/*/*					1/2/*		*/7/*	1/3/1	*/*/1
2	*/*/1	*/1/1	*/1/2	*/*/2		*/*/1	*/*/1	2/1/2	*/*/1				*/*/1	*/1/7		*/*/3	*/*/2	
4		2/1/3	3/*/1	5/8/3	1/1/*		*/1/*	8/16/8	1/2/1	1/*/*	*/1/1			7/6/5		2/4/3	6/8/2	1/*/*
8		3/*/*	1/*/*	2/*/*	1/*/*			1*/5/3	1/*/1				*/1/*	6/3/*		*/4/4	2/3/2	
16			1/*/*	1*/1	2*/1	1/*/*		4/2/*		*/1/1	*/*/2		1/*/*	1*/1	1/*/*	2/1/1	1/2/1	
32	1/*/*		*/*/1	2/3/5	1*/1			3*/3			1/*/*	1*/1	1/*/*	1/1/*	1/1/1	8*/1	5/1/5	
64	1/*/*		1/1/*	3/1/*				1/1/*	1/1/*	1/*/*	2/*/*		1/*/*	1/*/*		4/*/*	6/*/*	
128			1/*/*	2/*/*	2/*/*							1/*/*					2/*/*	

Legenda: *: nenhuma amostra para essa concentração. P: pacientes pediátricos; A: pacientes adultos. CIM: concentração inibitória mínima. I: imipenem; M: meropenem; D: doripenem. Números em negrito (coluna à esquerda): indicam as faixas das CIM's a partir das quais as amostras foram consideradas não sensíveis. Sombreado em cinza: quantidade de amostras em cada faixa de CIM, concomitantemente não sensíveis ao imipenem, meropenem e doripenem.

Fonte: A autora.

Tabela 7: Distribuição das 143 amostras de *Pseudomonas aeruginosa* não sensíveis aos carbapenêmicos nas diversas faixas que determinam a concentração inibitória mínima para polimixina

CIM ($\mu\text{g/mL}$)	1P (n=2)	2A (n=5)	3A (n=8)	4P (n=16)	5P (n=8)	6A (n=1)	7A (n=1)	8A (n=29)	9P (n=4)	10P (n=2)	11P (n=4)	12A (n=1)	13A (n=2)	14A (n=18)	15P (n=2)	16P (n=16)	17P (n=23)	18A (n=1)
0,25								1						1				
0,5			2	2							1			3		1	2	
1	1	2	3	7	4			11		1		1	1	6	1	2	9	1
2		2	2	4	2			5	3		1		1	3	1	3	8	
4		1	1	1	2	1	1	8	1	1				2		8	3	
8	1			2				3			2			2		2	1	
16								1						1				

Legenda: n= número absoluto de amostras. P: pacientes pediátricos; A: pacientes adultos. CIM: concentração inibitória mínima. N: número absoluto de amostras. Números em negrito (coluna à esquerda): indicam as faixas das CIM's a partir das quais as amostras foram consideradas não sensíveis. Sombreado em cinza: quantidade de amostras em cada faixa de CIM, não sensíveis a polimixina.

Fonte: A autora.

Analisando a ocorrência de PANSP na amostragem geral, independente da população de pacientes, a primeira amostra foi recuperada no ano de 2008, sendo as demais detectadas em todos os anos subsequentes do estudo (2009/n=1; 2010/n=7; 2011/n=5; 2012/n=6; 2013/n=5; 2014/n=10; 2015/n=3; 2016/n=7) (Tabela 8).

Do total de amostras NSP (n=45), 24 (53%) foram recuperadas de pacientes pediátricos (1P, 4P, 5P, 9P, 10P, 11P, 16P e 17P), sendo a primeira amostra nesse grupo isolada em 2010 e aproximadamente metade das amostras PANSP foram encontradas no paciente 16P (n=10). Entre os pacientes adultos foram obtidas 21 amostras NSP (2A, 3A, 6A, 7A, 8A e 14A), e à semelhança do observado entre os pacientes pediátricos, perto da metade das amostras NSP estavam relacionadas a um único paciente (8A, n=12) (Tabela 8).

Tabela 8: Distribuição temporal de *Pseudomonas aeruginosa* não sensíveis a polimixina, isoladas de pacientes com fibrose cística

Ano	Paciente ^x (n=24)	Paciente ^x (n=21)
2007 (n=0)	-	-
2008 (n=1)	-	8A ¹
2009 (n=1)	-	14A ¹
2010 (n=7)	5P ¹ , 16P ¹	6A ¹ , 8A ⁴
2011 (n=5)	4P ¹ , 16P ¹	2A ¹ , 3A ¹ , 8A ¹
2012 (n=6)	1P ¹ , 10P ¹	8A ³ , 14A ¹
2013 (n=5)	16P ³	8A ¹ , 14A ¹
2014 (n=10)	9P ¹ , 16P ⁵ , 17P ¹	7A ¹ , 8A ²
2015 (n=3)	4P ¹ , 17P ¹	14A ¹
2016 (n=7)	4P ¹ , 5P ¹ , 11P ² , 17P ²	14A ¹

Legenda: -: nenhuma amostra. P: pacientes pediátricos; A: pacientes adultos. ^x: número de amostras não sensíveis a polimixina. PANSP: *Pseudomonas aeruginosa* não sensíveis a polimixina.

Fonte: A autora.

3.3 Classificação quanto aos fenótipos de resistência MDR, XDR e PDR

Do total de 143 *P. aeruginosa*, 36 (25,2%) foram classificados como MDR, 53 (37,1%) XDR, e 9 (6,3%) PDR, a partir das análises dos resultados do TDD e da CIM para polimixina. Entre as amostras classificadas como MDR, 55,6% e 44,4% foram obtidas de seis

pacientes pediátricos (1P, 4P, 5P, 11P, 16P e 17P) e de cinco adultos (3A, 8A, 12A, 13A e 14A), respectivamente. Para aquelas com perfil XDR, 52,8% (4P, 5P, 9P, 11P, 15P, 16P e 17P) e 47,2% (2A, 7A, 8A e 14A), e PDR, com 66,7% (11P e 16P) e 33,3% (8A), foram recuperadas de pacientes pediátricos e adultos.

Aproximadamente metade (n=75) das amostras exibia o fenótipo mucoide, distribuídas em 12 dos 18 pacientes. Entre essas amostras, 39 (52%) foram recuperadas de pacientes pediátricos, e 36 (48%), de pacientes adultos.

Entre as amostras com fenótipo mucoide (n=75), 17 foram classificadas como MDR (10 e 7 amostras de pacientes pediátricos e adultos, respectivamente); 29 eram XDR (15 e 14 amostras de pacientes pediátricos e adultos, respectivamente); e, 5 eram PDR (3 e 2 amostras de pacientes pediátricos e adultos, respectivamente) (Tabela 9).

Dentre as amostras que exibiam o fenótipo não mucoide (n=68), 19 foram classificadas como MDR (10 e 9 amostras de pacientes pediátricos e adultos, respectivamente); 24 eram XDR (13 e 11 amostras de pacientes pediátricos e adultos, respectivamente); e 4 eram PDR (3 e 1 amostras de pacientes pediátricos e adultos, respectivamente) (Tabela 9).

Tabela 9 – Distribuição dos fenótipos MDR, XDR e PDR em relação a morfologia mucoide e não mucoide de *Pseudomonas aeruginosa* não sensíveis aos carbapenêmicos

Paciente	Clínica	MUC (n)	NM (n)	Fenótipo de resistência (número de amostras - morfotipo)
1P	IFF	0	2	MDR ^{2-NM}
2A	PPC	3	2	XDR ^{1-MUC}
3A	IFF	6	2	MDR ^{1-NM}
4P	IFF	11	5	MDR ^{2-MUC} , XDR ^{5-MUC} , XDR ^{2-NM}
5P	IFF	4	4	MDR ^{1-MUC} , XDR ^{2-MUC} , MDR ^{2-NM} , XDR ^{1-NM}
6A	PPC	0	1	-
7A	PPC	1	0	XDR ^{1-MUC}
8A	PPC	16	13	MDR ^{5-MUC} , XDR ^{10-MUC} , PDR ^{2-MUC} , MDR ^{2-NM} , XDR ^{8-NM} , PDR ^{1-NM}
9P	IFF	0	4	XDR ^{2-NM}
10P	IFF	1	1	-
11P	IFF	2	2	MDR ^{1-MUC} , XDR ^{1-NM} , PDR ^{1-NM}
12A	PPC	0	1	MDR ^{1-NM}
13A	PPC	0	2	MDR ^{1-NM}
14A	PPC	9	9	MDR ^{3-MUC} , XDR ^{2-MUC} , MDR ^{3-NM} , XDR ^{3-NM}
15P	IFF	0	2	XDR ^{1-NM}
16P	IFF	8	8	MDR ^{1-MUC} , XDR ^{4-MUC} , PDR ^{3-MUC} , MDR ^{2-NM} , XDR ^{2-NM} , PDR ^{2-NM}
17P	IFF	13	10	MDR ^{5-MUC} , XDR ^{4-MUC} , MDR ^{3-NM} , XDR ^{4-NM}
18A	PPC	1	0	-

Legenda: P: pacientes pediátricos; A: pacientes adultos. IFF: Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueiras; PPC: Policlínica Piquet Carneiro. MUC: isolado mucoide; NM: isolado não mucoide. MDR: multidroga resistente; XDR: extensivo droga resistente; PDR: pandroga resistente. -: ausência dos fenótipos MDR, XDR e/ou PDR. n: número absoluto de amostras. P: paciente pediátrico; A: paciente adulto.

Fonte: A autora.

Os dados relativos à classificação, evolução, concomitância e manutenção das amostras apresentando os fenótipos MDR, XDR e PDR no período de 2007 a 2016, estão demonstrados na Tabela 10. Pôde-se notar que alguns pacientes foram colonizados com amostras apresentando fenótipos de resistência distintos de forma intermitentemente e outros com perfis persistentes (Tabela 10).

As duas únicas amostras recuperadas do paciente 1P (2012 e 2015), e as únicas dos pacientes 3A (2013), 12A (2016) e 13A (2016), foram classificadas como MDR, todas não sensíveis ao imipenem, exceto a amostra do paciente 13A.

O isolamento exclusivo de amostras com o fenótipo XDR, foi observado nos pacientes 2A, 7A, 9P e 15P. Todas as amostras foram não sensíveis a pelo menos dois carbapenêmicos, concomitantemente.

Os fenótipos XDR e MDR, ocorrendo concomitantemente no período de 10 anos, foi observado nas amostras obtidas dos pacientes 4P, 5P, 14A e 17P, todas as amostras eram NS a pelo menos um carbapenêmicos testado. A presença dos fenótipos XDR+MDR no mesmo ano, foi observada nos pacientes 4P (2011), 5P (2016), 14A (2013 e 2015) e 17P (2015 e 2016).

A presença dos fenótipos XDR+MDR+PDR em um mesmo ano, foi observado nos pacientes com a seguinte distribuição, 8A (2011), 11P (2016) e 16P (2013 e 2014). Todas as combinações possíveis de NS aos carbapenêmicos ocorreram nas amostras desses pacientes.

A ausência dos perfis de resistência MDR, XDR ou PDR foi observada nos pacientes 6A, 10P e 18A (Tabela 10).

Em relação as 45 amostras não sensíveis à polimixina, 37 foram classificadas como MDR, XDR ou PDR. Onze amostras (24%) foram classificadas como MDR (pacientes 1P, 4P, 5P, 8A, 11P, 14A e 17P), 17 (38%) como XDR (pacientes 2A, 4P, 5P, 7A, 8A, 9P, 14A e 16P) e 9 (20%) como PDR (pacientes 8A, 11P e 16P) (Tabela 11).

Analisando-se longitudinalmente os resultados da CIM para polimixina, das 37 amostras de PANSP, a maioria foi recuperada de dois pacientes. No paciente 8A, das 12 amostras não sensíveis a polimixina, três foram MDR, 6 XDR e 3 PDR, com ocorrência entre os anos de 2008 e 2014; e no paciente 16P, 10 de 16 amostras foram PANSP, das quais três eram XDR e cinco eram PDR, no período de 2010 a 2014 (Tabela 11).

Tabela 11: Características fenotípicas da resistência em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* não sensíveis a polimixina (continua)

Paciente	DATA	Clínica	CIM	Fenótipo
1P	01/03/2012	IFF	8 µg/mL	MDR
2A	02/05/2011	PPC	4 µg/mL	XDR
3P	16/02/2011	IFF	4 µg/mL	-
4P	28/04/2011	IFF	4 µg/mL	MDR
4P	30/07/2015	IFF	8 µg/mL	XDR
4P	03/03/2016	IFF	8 µg/mL	MDR
5P	27/01/2010	IFF	4 µg/mL	MDR
5P	15/09/2016	IFF	4 µg/mL	XDR
6A	04/02/2010	PPC	4 µg/mL	-
7A	13/06/2014	PPC	4 µg/mL	XDR
8A	06/10/2008	PPC	4 µg/mL	XDR
8A	18/03/2010	PPC	4 µg/mL	XDR
8A	24/09/2010	PPC	4 µg/mL	MDR
8A	03/12/2010	PPC	8 µg/mL	MDR
8A	07/12/2010	PPC	4 µg/mL	XDR
8A	18/11/2011	PPC	4 µg/mL	PDR
8A	23/02/2012	PPC	4 µg/mL	PDR
8A	13/12/2012	PPC	4 µg/mL	XDR

Tabela 11: Características fenotípicas da resistência em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* não sensíveis a polimixina (conclusão)

Paciente	DATA	Clínica	CIM	Fenótipo
8A	14/12/2012	PPC	16 µg/mL	PDR
8A	02/12/2013	PPC	8 µg/mL	MDR
8A	21/05/2014	PPC	4 µg/mL	XDR
8A	10/03/2014	PPC	8 µg/mL	XDR
9P	24/04/2014	IFF	4 µg/mL	XDR
10P	05/01/2012	IFF	4 µg/mL	-
11P	25/08/2016	IFF	8 µg/mL	MDR
11P	25/08/2016	IFF	8 µg/mL	PDR
14A	09/02/2009	PPC	8 µg/mL	-
14A	19/10/2012	PPC	16 µg/mL	XDR
14A	06/12/2013	PPC	4 µg/mL	MDR
14A	16/09/2016	PPC	8 µg/mL	XDR
14A	14/08/2015	PPC	4 µg/mL	XDR
16P	16/08/2010	IFF	4 µg/mL	-
16P	16/03/2011	IFF	4 µg/mL	-
16P	18/09/2013	IFF	4 µg/mL	XDR
16P	01/07/2013	IFF	4 µg/mL	PDR
16P	12/11/2013	IFF	4 µg/mL	PDR
16P	07/04/2014	IFF	4 µg/mL	PDR
16P	17/02/2014	IFF	4 µg/mL	PDR
16P	10/03/2014	IFF	8 µg/mL	XDR
16P	31/03/2014	IFF	8 µg/mL	PDR
16P	07/01/2014	IFF	4 µg/mL	XDR
17P	28/08/2014	IFF	8 µg/mL	MDR
17P	26/02/2015	IFF	4 µg/mL	MDR
17P	22/06/2016	IFF	4 µg/mL	XDR
17P	04/10/2016	IFF	4 µg/mL	MDR

Legenda: IFF: Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueiras; PPC: Policlínica Piquet Carneiro. POL: polimixina. R: resistente; I: intermediária. MDR: multidroga resistente; XDR: extensivo droga resistente; PDR: pandroga resistente. -: ausência dos fenótipos MDR, XDR ou PDR. P: pacientes pediátricos; A: pacientes adultos. CIM: concentração inibitória mínima.

Fonte: A autora

3.4 Hipermutabilidade

Das 143 amostras de *P. aeruginosa* NSC, 112 (78,3%) apresentaram frequência de mutação espontânea não aumentada (NISf); 13 (9,1%) exibiram frequência de mutação espontânea fracamente aumentada (WISf), e 18 (12,3%) possuíam frequência de mutação espontânea fortemente aumentada (SISf), sendo, portanto, classificadas como hipermutáveis. Dos 18 pacientes, a maioria (7 pacientes pediátricos e 4 pacientes adultos) tinha ao menos uma amostra de *P. aeruginosa* HPM. Do total de 18 amostras hipermutáveis, classificadas como (SISf), 13 (72,2%) foram recuperadas de pacientes pediátricos (Tabela 12).

Nos pacientes 1P, 4P, 8A, 11P, 16P e 17P, as amostras HPM foram detectadas repetidamente, com intervalos variando de meses até anos entre as detecções desse fenômeno.

Observando-se o perfil de susceptibilidade das amostras HPM, nove (50%) amostras foram classificadas como XDR (6 amostras de pacientes pediátricos), e cinco, como MDR (4 amostras de pacientes pediátricos) (Tabela 12). Seis amostras, recuperadas dos pacientes 1P, 4P, 8A (n=2), 14A e 16P, eram não sensíveis a polimixina.

Tabela 12 – Distribuição amostras de *Pseudomonas aeruginosa* hipermutáveis, morfologia colonial, susceptibilidade aos antimicrobianos, fenótipo de resistência a múltiplos antimicrobianos e frequências de mutação

Paciente	Data	Morfologia	Fenótipo	CIM POL	<i>f</i>
1P	01/03/2012	NM	MDR	8 µg/mL*	165 x 10 ⁻⁷
1P	05/03/2015	NM	MDR	1 µg/mL	9 x 10 ⁻⁶
2A	10/01/2013	MUC	-	2 µg/mL	7,7 x 10 ⁻⁷
4P	21/02/2008	NM	XDR	0,5 µg/mL	14,5 x 10 ⁻⁷
4P	05/11/2014	MUC	-	1 µg/mL	2 x 10 ⁻⁶
4P	03/03/2016	MUC	MDR	8 µg/mL*	2,5 x 10 ⁻⁷
8A	06/10/2008	NM	XDR	4 µg/mL*	23 x 10 ⁻⁷
8A	13/12/2012	NM	XDR	4 µg/mL*	76 x 10 ⁻⁷
9 P	25/10/2012	NM	-	2 µg/mL	3,2 x 10 ⁻⁶
11P	30/04/2015	MUC	-	2 µg/mL	11 x 10 ⁻⁶
11P	09/09/2016	NM	XDR	0,5 µg/mL	1,1 x 10 ⁻⁶
12A	26/09/2016	NM	MDR	1 µg/mL	1,1 x 10 ⁻⁶
14A	16/09/2016	NM	XDR	8 µg/mL*	0,3 x 10 ⁻⁶
15P	04/04/2016	NM	XDR	2 µg/mL	1 X 10 ⁻⁶
16P	18/09/2013	MUC	XDR	4 µg/mL*	58 x 10 ⁻⁷
16P	31/03/2014	NM	XDR	2 µg/mL	7,5 X 10 ⁻⁵
17P	12/02/2016	NM	MDR	1 µg/mL	2 X 10 ⁻⁶
17P	04/10/2016	NM	XDR	1 µg/mL	5,6 x 10 ⁻⁶

Legenda: NM: não mucoide; MUC: mucoide. MDR: multidroga resistente; XDR: extensivo droga resistente. *f*: frequência de mutação. P: pacientes pediátricos; A: pacientes adultos. CIM: concentração inibitória mínima. POL: polimixina. *: amostra não sensível a polimixina. -: ausência do fenótipo de resistência MDR, XDR ou PDR.

Fonte: A autora.

A partir da subpopulação mutante (resistente a rifampicina) obtida na determinação da frequência de mutação, foram realizados TDD para todos os antimicrobianos e determinada a CIM para polimixina. Os resultados foram comparados com os observados na população selvagem. Das 18 amostras classificadas como HPM, 12 (66,7%) pertencentes a 9 pacientes (1P, 2A, 4P, 8A, 9P, 11P, 15P, 16P e 17P) apresentaram alteração da categorização de sensível para não sensível a pelo menos um antimicrobiano. Essa alteração de categoria foi observada em todos os antimicrobianos testados, exceto para o carbapenêmico IPM. A

maioria dos casos com alterações de categoria foi para os antimicrobianos CIP (6/12) e DOR (5/12) (Tabela 13).

Não houve variações nos resultados das CIM's para polimixina, quando comparadas as duas populações.

Tabela 13: Perfis de susceptibilidade da população selvagem e subpopulação hipermutável de *Pseudomonas aeruginosa* não sensíveis aos carbapenêmicos

Paciente	Período		PTZ	ATM	CAZ	FEP	IPM	MEM	DOR	GEN	AMI	TOB	CIP
1P	01/03/2012	PS	S	S	S	S	NS	S	S	NS	NS	NS	S
		SUB	S	S	S	S	NS	S	S	NS	NS	NS	NS
1P	05/03/2015	PS	S	S	S	S	NS	S	S	NS	NS	NS	NS
		SUB	S	S	S	S	NS	S	NS	NS	NS	NS	NS
2A	10/01/2013	PS	S	S	S	S	NS	S	S	S	S	S	S
		SUB	S	NS	S	S	NS	S	S	S	S	S	S
4P	05/11/2014	PS	S	S	S	S	NS	NS	NS	S	S	S	S
		SUB	NS	S	NS	NS	NS	NS	NS	S	S	S	NS
8A	06/10/2008	PS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	S	NS	S	NS	S
		SUB	NS	S	NS	NS	NS	S	S	S	S	S	NS
8A	13/12/2012	PS	S	NS	NS	NS	NS	NS	S	NS	NS	NS	S
		SUB	S	S	NS	NS	NS	S	NS	S	NS	NS	NS
9P	25/10/2012	PS	S	S	S	S	NS	S	S	S	S	S	S
		SUB	S	S	S	S	NS	S	S	S	S	S	NS
11P	30/04/2015	PS	S	S	S	S	NS	S	S	NS	S	S	S
		SUB	S	S	S	S	NS	S	NS	NS	NS	NS	NS
11P	09/09/2016	PS	NS	NS	S	NS	NS	S	NS	S	NS	S	NS
		SUB	NS	NS	S	NS	NS	S	NS	NS	S	S	NS
15P	04/04/2016	PS	S	NS	S	S	NS	NS	S	NS	S	S	NS
		SUB	NS										
16P	31/03/2014	PS	S	S	S	S	NS	NS	S	NS	NS	NS	NS
		SUB	NS	NS	NS	S	NS	S	S	NS	NS	NS	NS
17P	04/10/2016	PS	NS										
		SUB	NS	NS	NS	NS	NS	NS	S	NS	NS	NS	NS

Legenda: SISf: frequência de mutação espontânea fortemente aumentada. PTZ: piperacilina + tazobactam; ATM: aztreonam; CAZ: ceftazidima; FEP: cefepime; IPM: imipenem; MEM: meropenem; DOR: doripenem; GEN: gentamicina; AMI: amicacina; TOB: tobramicina; CIP: ciprofloxacina. P: pacientes pediátricos; A: pacientes adultos. PS: população selvagem; SUB: subpopulação hipermutável. S: sensível; NS: não sensível. Sombreamento em cinza: divergências entre a susceptibilidade da população selvagem e a subpopulação.

Fonte: A autora

3.5 Relato de caso

No ano seguinte ao encerramento da coleta de amostras, o paciente 17P (F508del/Y913X) apresentou um quadro de exacerbação pulmonar que culminou com a sua hospitalização (abril de 2017). Nesse momento, foram recuperadas três amostras de *P. aeruginosa* com três fenótipos ocorrendo simultaneamente: não mucoide (21114), mucoide (21113) e *small colony variant* (SCV) (21107). Tal fato se repetiu dois meses depois, quando ele sofreu novo quadro de exacerbação sendo necessário mais uma internação, quando foram isoladas as amostras 21167^{NM}, 21168^{MUC} e 21169^{SCV}.

Dado a ausência de relatos do fenótipo SCV em *P. aeruginosa* em pacientes com FC, no Brasil, realizamos o SGT das seis amostras, a fim de comparar a diversidade genômica, bem como a presença de genes relacionados à resistência antimicrobiana, fatores de virulência e persistência que possivelmente estariam associados aos fenótipos variantes. Os dados originaram o artigo a ser submetido ao *Brazilian Journal of Microbiology* (ANEXO C).

Quatro das seis amostras recuperadas nos dois momentos da internação, mostraram um perfil MDR, exceto aquelas com fenótipo mucoide, que foram sensíveis à maior parte dos antimicrobianos testados. Todas as amostras eram sensíveis a polimixina, exceto a 21169^{SCV}, recuperadas na segunda internação (CIM = 4 µg/mL) e foi classificada como PDR (Tabela 14).

Tabela 14: Resultados dos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos das amostras de *Pseudomonas aeruginosa* recuperadas em dois momentos de hospitalização de um paciente com fibrose cística

Amostra/ fenótipo	Data	AMI	TOB	CIP	DOR	PTZ	CAZ	FEP	ATM	IPM	MEM	GEN	POL*
21114 ^{NM}	6/4/17	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	S (2µg/mL)
21113 ^{MUC}	6/4/17	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S (2µg/mL)
21107 ^{SCV}	6/4/17	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S (2µg/mL)
21167 ^{NM}	5/6/17	R	S	I	R	S	R	R	R	R	S	R	S (2µg/mL)
21168 ^{MUC}	5/6/17	S	S	I	S	S	R	S	S	S	S	S	S (2µg/mL)
21169 ^{SCV}	5/6/17	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I (4µg/mL)

Legenda: AMI: amicacina; TOB: tobramicina; CIP: ciprofloxacina; DOR: doripenem; PTZ: piperacilina + tazobactam; CAZ: ceftazidima; FEP: cefepime; ATM: aztreonam; IPM: imipenem; MEM: meropenem; e, GEN: gentamicina; POL*: polimixina (testada por microdiluição, de acordo com as recomendações do CLSI 2020); MUC: mucoide; NM: não mucoide; SCV: *small colony variant*. R: resistente; I: intermediário; S: sensível.

Fonte: A autora.

Das seis amostras incluídas na descrição do caso clínico, duas foram classificadas como normomutáveis, isso é, frequência de mutação (f) $< 2 \times 10^{-8}$. Quatro delas foram classificadas como hipermutáveis, incluindo as SCV, com frequência de mutação espontânea fortemente aumentada ($SISf$), ou seja, quando $f \geq 2 \times 10^{-7}$ (Tabela 15).

Tabela 15: Classificação e frequência de mutação das amostras de *Pseudomonas aeruginosa* mucoides, não mucoides e SCVs

Amostras	Frequência de mutação	Classificação (<i>f</i>)
21114 ^{NM}	$3,3 \times 10^{-6}$	SIS <i>f</i>
21113 ^{MUC}	$1,0 \times 10^{-10}$	NIS <i>f</i>
21107 ^{SCV}	$2,4 \times 10^{-6}$	SIS <i>f</i>
21167 ^{NM}	270×10^{-6}	SIS <i>f</i>
21168 ^{MUC}	0	NIS <i>f</i>
21169 ^{SCV}	$2,5 \times 10^{-6}$	SIS <i>f</i>

Legenda: Taxas de frequência de mutação (*f*): frequência de mutação espontânea fortemente aumentada (SIS*f*) quando $f \geq 2 \times 10^{-7}$, frequência de mutação espontânea fracamente aumentada (WIS*f*), quando $f < 2 \times 10^{-7}$ e $\geq 2 \times 10^{-8}$, e frequência de mutação espontânea não aumentada (NIS*f*), quando $f < 2 \times 10^{-8}$. MUC: mucoide; NM: não mucoide; SCV: *small colony variant*.

Fonte: A autora.

Após o sequenciamento do genoma, todas as amostras apresentaram conteúdo G-C de 66,4%, com mais de 6×10^6 pares de bases (pb) e cerca de 6.000 genes, incluindo genes de RNAr e RNAt, o que é consistente com amostras de *P. aeruginosa* previamente sequenciadas, de acordo com a anotação no RAST. As seis amostras de *P. aeruginosa* mostraram diferentes tamanhos de genomas (6.384.973 pb a 6.392.517 pb), com diferenças que variaram de 1.352 a 7.544 pb. O número de fatores de virulência (variando de 228 a 230), resistência a antibióticos (variando de 122 a 125), *contigs* e sequências codificadoras também mostraram divergências quantitativas (Tabela 16).

As sequências foram depositadas no *DDBJ/ENA/GenBank* sob os números de acesso: WUTK00000000, WUTL00000000, WUTM00000000, WUTN00000000, WUTO00000000 e WUTP00000000.

Tabela 16: Visão geral das sequências genômicas anotadas na plataforma *Rapid Annotation Subsystem Technology* das seis amostras de *Pseudomonas aeruginosa*

	21114 ^{NM}	21113 ^{MUC}	21107 ^{SCV}	21167 ^{NM}	21168 ^{MUC}	21169 ^{SCV}
Características dos genomas						
Número de acesso no <i>NCBI</i>	NA580450	NA580449	NA580445	NA580453	NA580455	NA580457
Tamanho do genoma (pb)	6.390,267	6.391,355	6.384,973	6.386,325	6.392,517	6.386,368
Conteúdo G-C	66,4	66,4	66,4	66,4	66,4	66,4
Número de <i>Contigs</i>	46	52	51	55	45	50
Número de Subsistemas	564	566	567	567	566	565
Número de Sequências Codificadoras	5986	5987	6010	6009	5992	6004
Número de RNAs	65	65	65	65	65	65
Resistência aos antibióticos e compostos tóxicos	122	122	125	125	122	123
Número de fatores de virulência	228	229	229	230	228	230

Legenda: Conteúdo G-C: percentual de Guanina-Citosina. NA: número de acesso. MUC: mucoide; NM: não mucoide; SCV: *small colony variant*. RNA: ribonucleic acid. *NCBI*: National Center for Biotechnology Information. pb: pares de base.

Fonte: *Rapid Annotation Subsystem Technology* (RAST).

Na tentativa de se esclarecer relações filogenéticas entre os isolados, e eventualmente atribuir a sua correlação com um complexo clonal (CC) epidêmico, a busca pelo *sequence type* (ST) foi feita com base nos dados publicados no *PubMLST*, e nenhuma das seis amostras coincidiu com a base de dados disponível dos ST's já catalogados para *P. aeruginosa* (Tabela 17).

Portanto, foi considerado um novo *sequence type* (ST2744), descrito a primeira vez pelo presente estudo. Esse novo ST não apresentou relação com nenhum complexo clonal já descrito.

Tabela 17: Descrição dos *loci* e alelos do novo *sequence type*, ST 2744, por análise *in silico* de *Multilocus Sequence Typing* (MLST) das seis amostras de *Pseudomonas aeruginosa* de um paciente com fibrose cística

	<i>Loci</i>	Identidade	Tamanho do alelo (pb)	Alelos
	<i>acs</i>	100%	390	<i>acs_11</i>
	<i>aro</i>	100%	498	<i>aro_5</i>
ST 2744	<i>gua</i>	100%	373	<i>gua_17</i>
	<i>mut</i>	100%	442	<i>mut_2</i>
	<i>nuo</i>	100%	366	<i>nuo_74</i>
	<i>pps</i>	100%	370	<i>pps_15</i>
	<i>trp</i>	100%	443	<i>trp_2</i>

Legenda: pb: pares de base.

Fonte: <https://pubmlst.org/>

Usando as bases de dados disponíveis, *ResFinder* e a plataforma PATRIC, vários genes de resistência adquiridos por transferência horizontal foram examinados. Ao todo, cinco tipos de genes de resistência adquirida foram detectados, incluindo dois genes de resistência aos betalactâmicos (*bla_{PAO}* e *bla_{OXA-50}*), e um de cada para aminoglicosídeos (*aph (3') - IIb*), fosfomicina (*fosA*), clorafenicol (*catB7*) e ciprofloxacina (*crpP*), presentes em todas as amostras. Nenhum gene para carbapenemase foi detectado por essas ferramentas de buscas. O gene *mcr-I*, associado com a susceptibilidade diminuída a polimixina, não foi detectado por essas ferramentas analíticas.

A alteração da permeabilidade da membrana externa, em *P. aeruginosa*, é um dos mais significativos sistemas que conferem resistência aos antimicrobianos, especialmente aos carbapenêmicos, mediada por diminuição ou ausência na expressão de porinas. Genes codificadores desses canais proteicos foram detectados pela plataforma PATRIC e do banco de dados RAST, e a ferramenta BioEdit foi utilizada para alinhar as sequências de nucleotídeos das amostras incluídas neste estudo.

Genes codificadores de porinas, como *opdD*, *opdO*, *opdK* e *oprD* foram investigados. Analisando-se de forma comparativa as seis amostras, a sequência de nucleotídeos de *oprD* exibiu as seguintes alterações: as amostras 21107^{SCV}, 21167^{NM} e 21169^{SCV} apresentaram 87

substituições e 54 deleções, quando comparadas à PAO1; e, as amostras 21113^{MUC}, 21114^{NM} e 21168^{MUC}, quando comparadas à PAO1, mostraram em suas sequências 95 substituições e 18 deleções; neste caso, estes isolados exibiam uma alteração específica na cadeia de aminoácidos, com uma importante substituição (S → A) na posição 319, já que esse gene com tal mutação parece estar implicado na mutagênese bacteriana (Tabela 18).

Todas as amostras demonstraram pelo menos 98% de identidade para os genes *opdK*, *opdO* e *opdD*, quando comparadas as suas sequências de nucleotídeos às da PAO1. A amostra 21107^{SCV} exibiu uma substituição exclusiva no gene *oprF*; entretanto, todas as outras amostras compartilharam pelo menos 99% de identidade com a cepa de referência e diferentes substituições (Tabela 18).

Um segundo mecanismo importante componente da resistência intrínseca são os sistemas de efluxo, compostos por bombas formadas por proteínas encarregadas de fazerem a expulsão de compostos intracelulares e antimicrobianos, e os quatro sistemas detectados através da plataforma PATRIC e do banco de dados RAST nas seis amostras foram: MexAB-OprM (genes *mexA*, *mexB*, *mexR*, *nalC* e *nalD*), MexCD-OprJ (genes *mexC*, *mexD* e *nfxB*), MexEF-OprN (genes *mexE*, *mexF* e *mexS*) e MexXY-OprM (genes *mexX*, *mexY* e *mexZ*).

Comparando-se as sequências de nucleotídeos de todos esses genes, entre as seis amostras com as da PAO1, com o auxílio da ferramenta *BioEdit*, foi observada identidade de 100% exclusivamente para o repressor *nalD*, um regulador transcricional da bomba de efluxo MexAB-OprM. Toda as amostras exibiram 99% de identidade com a PAO1, quando foram analisadas as sequências dos outros genes codificadores das bombas de efluxo, e apenas substituições foram observadas, variando de 1 a 8 nucleotídeos (Tabela 18).

Verificada a ocorrência de mutações exclusivas, foram detectadas substituições no gene *mexD* (na amostra 21167^{NM}) e nos genes *mexD*, repressor *nfxB* de MexCD-OprJ and repressor *mexY* do operon *mexXY* (na amostra 21169^{SCV}). Foram detectadas substituições em todas as seis amostras nos genes *nalC*, *nfxB*, *mexS* e *mexZ*, descritos como repressores ou reguladores de bombas de efluxo, e mutações nesses grupos de genes parecem ter um papel determinante na condição de multidroga resistência (Tabela 18).

Tabela 18: Análise das mutações nas sequências de nucleotídeos de porinas e bombas de efluxo nas seis amostras de *Pseudomonas aeruginosa* (continua)

		Categoria e função	Número de acesso	Peso (pb)	Percentual de identidade com a PAO1
Porinas	Família OprD	OccD1/ <i>oprD</i> - captação de aminoácidos básicos e carbapenêmicos	PA0958	1332	21107 ^{SCV} , 21167 ^{NM} e 21169 ^{SCV} X PAO1 = 89.4 % / (<i>subs</i> : 87 n e <i>dels</i> : 54 n) / 21113 ^{MUC} , 21114 ^{NM} e 21168 ^{MUC} X PAO1 = 91.5 % (<i>subs</i> : 95 n e <i>dels</i> : 18 n)
		OccK1/ <i>opdK</i> - captação de benzoato/histidina, carbenicillina e cefoxitina	PA4898	1254	Todas as amostras X PAO1 = 99 % (<i>subs</i> : 2 n)
		OccK3/ <i>opdO</i> - captação de piroglutamato e cefotaxima	PA2113	1230	Todas as amostras X PAO1 = 99 % (<i>subs</i> : 8 n) / 21167 ^{NM} X demais amostras = 99 % (<i>subs</i> : 1 n)
		OccK7/ <i>opdD</i> captação de meropenem	PA14_51070	1251	Todas as amostras X PAO1 = 98 % (<i>subs</i> : 15 n) / 21167 ^{NM} X demais amostras = 99 % (<i>subs</i> : 1 n)
		Proteína estrutural de membrana externa OprF – captação de betalactâmicos	PA1777	1053	Todas as amostras X PAO1 = 99 % (<i>subs</i> : 1 n) / 21107 ^{SCV} X demais amostras = 99,99% (<i>subs</i> : 1 n)
Sistemas de Efluxo	MexAB-OprM	Sistema de efluxo multidroga <i>mexA</i>	PA0425	1152	Todas as amostras X PAO1 = 99 % (<i>subs</i> : 2 n)
		Sistema de efluxo multidroga <i>mexB</i>	PA0426	3141	Todas as amostras X PAO1 = 99 % (<i>subs</i> : 5 n)
		Repressor do operon de multidroga resistência <i>mexR</i>	PA0424	444	Todas as amostras X PAO1 = 99 % (<i>subs</i> : 5 n)
		Regulador transcricional <i>nalC</i> com propriedade de resistência ao aztreonam; modulação gênica do efluxo de antimicrobianos, repressor	PA3721	642	Todas as amostras X PAO1 = 99 % (<i>subs</i> : 2 n)
		Regulador transcricional <i>nalD</i> com propriedade de resistência ao aztreonam; modulação gênica do efluxo de antimicrobianos, repressor	PA3574	639	100% com a PAO1

Tabela 18: Análise das mutações nas sequências de nucleotídeos de porinas e bombas de efluxo nas seis amostras de *Pseudomonas aeruginosa* (conclusão)

		Categoria e função	Número de acesso	Peso (pb)	Percentual de identidade com a PAO1
Sistemas de Efluxo	MexCD-OprJ	Sistema de efluxo multidroga <i>mexC</i>	PA4599	1065	Todas as amostras X PAO1 = 99 % (<i>subs</i> : 2 n)
		Sistema de efluxo multidroga <i>mexD</i>	PA4598	3132	Todas as amostras X PAO1 = 99 % (<i>subs</i> : 8 n) / 21167 ^{NM} X demais amostras = 99 % (<i>subs</i> : 1 n) / 21169 ^{SCV} X demais amostras = 99 % (<i>subs</i> : 1 n)
		Regulador transcricional <i>nfxB</i> ; conferindo resistência a antimicrobianos; modulação gênica do efluxo de antimicrobianos, repressor	PA4600	564	Todas as amostras X PAO1 = 99 % (<i>subs</i> : 1 n) / 21169 ^{SCV} X demais amostras = 99 % (<i>subs</i> : 1 n)
	MexEF-OprN	Sistema de efluxo multidroga <i>mexE</i>	PA2493	1245	Todas as amostras X PAO1 = 99 % (<i>subs</i> : 4 n)
		Sistema de efluxo multidroga <i>mexF</i>	PA2494	3189	Todas as amostras X PAO1 = 99 % (<i>subs</i> : 5 n)
		Putativa oxirredutase <i>mexS</i> conferindo resistência a antimicrobianos; modulação gênica do efluxo de antimicrobianos, repressor	E7DZ84	1020	Todas as amostras X PAO1 = 99 % (<i>subs</i> : 4 n)
	MexXY-OprM	Sistema de efluxo multidroga <i>mexX</i>	A0A2U2XK45	1191	Todas as amostras X PAO1 = 99 % (<i>subs</i> : 6 n)
		Sistema de efluxo multidroga <i>mexY</i>	Q9ZNG8	3138	Todas as amostras X PAO1 = 99 % (<i>subs</i> : 6 n) / 21169 ^{SCV} X demais amostras = 99 % (<i>subs</i> : 1 n)
		Repressor transcricional <i>mexZ</i> do operon <i>mexXY</i>	A0A2R4KMH2	633	Todas as amostras X PAO1 = 99 % (<i>subs</i> : 2 n)

Legenda: *subs*: substituições; *ins*: inserções; *dels*: deleções. n: nucleotídeo; A = adenina; C = citosina; T = timina; G = guanina. MUC: mucoide; NM: não mucoide; SCV: *small colony variant*. pb: pares de base.

Elementos genéticos móveis, que compõem parte do genoma acessório, são relevantes mecanismos bacterianos associados à resistência e virulência, podendo ser compartilhados intra- ou interespecies, a exemplo dos fagos, ilhas genômicas (IG), sequências de inserção (SI) e plasmídeos, foram investigados nas seis amostras de *P. aeruginosa*.

Na investigação da presença e caracterização dos profagos presentes nessas amostras, usando a base de dados *Phaster*, apenas aqueles considerados intactos e com regiões completas foram levados em consideração, e todas carregavam o mesmo fago de *P. aeruginosa* YMC11/02/R656 (NC_028657).

Na predição das ilhas genômicas, através da ferramenta *online* Islandviewer, e baseado na anotação e comparação com a PAO1, nove IG foram preditas, três delas eram comuns às seis amostras de *P. aeruginosa*, e apenas foram anotadas aqui aquelas que apresentavam *e-value* de 0,0, e similaridade igual ou superior a 95%. Uma IG específica (com o seu tamanho variando de 12.734 a 15.658 pb, e diversas posições de início-fim nos genomas), abrigando importantes fatores de virulência como a exotoxina A e a piocina, foi detectada em todos os genomas, exceto no primeira *P. aeruginosa* SCV isolada, 21107^{SCV} (Tabela suplementar 1).

As sequências de inserção foram detectadas usando a base de dados *IS Finder*, e cinco SI (*ISPa2*, *ISPa6*, *ISPa32*, *ISPa57* e *IS222*) foram observadas em todas as amostras, com 100 % de sua origem relacionada *Pseudomonas aeruginosa*. A *IS222* foi a única detectada repetidamente em dois ou três *contigs*, em todas as seis amostras.

Na busca por plasmídios, foram utilizadas as análises disponíveis no RAST, PATRIC and BLASTn, e nenhum elemento plasmidial foi encontrado.

A fim de examinar-se a presença ou ausência de genes relacionados à virulência e patogenicidade das amostras, fatores de virulência (FV) na base de dados *VFDB* foram investigados. O número total de FV anotados variou de 228 a 230 nas amostras, estando associados a aderência, sistemas de secreção tipos III e VI, resistência ao soro, danos à membrana mobilidade, fatores antifagocitose, sideróforos, biosurfactantes, produção de protease, regulação de toxinas e *quorum sensing*, quando a curadoria foi mediada pelo *VFDB* nas buscas realizadas pelo BLAST. Foi possível notar algumas variações no número de cópias desses genes de virulência anotados, como também naqueles envolvidos na aderência, evasão da resposta imune do hospedeiro, sistemas de secreção, produção/regulação de alginato, síntese de fenazina e toxinas bacterianas. Todo o painel de FV foi comum aos genomas das seis (Tabela suplementar 2).

Interessantemente, diferenças quantitativas de genes de virulência puderam ser vistas nos seguintes casos: gene *algB*, associado à produção/regulação de alginato, estava presente

em duas cópias nas amostras 21107^{SCV}, 21167^{NM} e 21169^{SCV}, e em uma única cópia nas demais amostras.

Os genes *phzA1* e *phzB1*, relacionados à produção de fenazina, também mostraram variações numéricas: na amostra 21107^{SCV}, foram detectadas três e uma cópia de cada um destes genes; na amostra 21113^{MUC}, três cópias de cada gene; e nas outras amostras, duas e três cópias de cada gene, respectivamente (Tabela suplementar 2).

O denominado sistema imune bacteriano, desenvolvido a partir da incorporação de sequências palindrômicas curtas de material genético exógeno ao genoma bacteriano, permite o reconhecimento e a excisão de ácidos nucleicos, normalmente inserido por bacteriófagos. As pequenas sequências intituladas CRISPR são geralmente subprodutos da identificação produzida pelo programa *CRISPR Finder*, e que podem não ser CRISPR verdadeiros. Portanto, esses elementos são classificados de acordo com um nível de evidência, que varia de 1 a 4, e que inclui CRISPR pequenos (com 3 ou menos espaçadores) e 2 a 4, classificados com base na similaridade da repetição e espaçadores.

Foi encontrado um total de três pequenos CRISPR e três regiões *DR* (*Direct Repeats*), através da aplicação do *CRISPRCas Finder*. Além disso, nenhuma sequência relacionada ao gene para a nuclease Cas3, que participa ativamente na clivagem do DNA exógeno, foi identificado por esse instrumento de busca *online* (Tabela 19).

Tabela 19: Sequências CRISPR e genes *cas* investigados usando a ferramenta de busca *CRISPRCas Finder* nas seis amostras de *Pseudomonas aeruginosa*

Posição de início- fim	Peso (pb)	CRISPR - <i>Direct Repeats</i> <i>consensus</i>	Sequências <i>cas</i>	Número de sequências analisadas					
				21114 ^{NM}	21113 ^{MUC}	21107 ^{SCV}	21167 ^{NM}	21168 ^{MUC}	21169 ^{SCV}
130 – 222	273	GCCGACAACGGCAGCGAGCAGACC	0	+	+	+	+	+	+
136 - 239	1728	GACCTGGGCACTCCGGCCAGTCTCGA	0	+	+	+	+	+	+
310 - 380	1149	TCCAGACAGTGTCTGGGAAATT	0	+	+	+	+	+	+

Legenda: A = adenina; C = citosina; T = timina; G = guanina. MUC: mucoide; NM: não mucoide; SCV: *small colony variant*. pb: pares de base. *cas*: genes associados ao CRISPR.

Fonte: *CRISPRCas Finder*.

A detecção de colônias com morfologia variante, como aquelas que apresentam crescimento lento e aspecto autoagregativo, é grande motivo de atenção uma vez que são indicativas de persistência e susceptibilidade reduzida aos antimicrobianos, em amostras de *P. aeruginosa* de pacientes com FC. No presente estudo, o achado de colônias SCV até então jamais descrito no Brasil nestas condições, e a condição de gravidade clínica em que o paciente se encontrava, levou com que analisássemos as mutações em genes já descritos como possivelmente associados à emergência desse fenótipo. Para tanto, foram utilizados RAST e PATRIC para a localização desses alvos mutacionais, e o programa *BioEdit*, a fim de analisar as alterações nas sequências de nucleotídeos, caracterizando as mutações em cada gene.

Comparando-se as sequências das seis amostras com as da PAO1, para apenas um gene (*yfiR*) observou-se 100 % de identidade com a cepa referência. Na análise dos genes *rsmA*, *yfiN*, *fleQ* e *accBC*, as sequências mostraram 99 % de identidade, e o número de substituições de nucleotídeos variando de três até treze. Para o gene *wspF*, foi possível notar a existência de eventos de deleção e de substituição nas amostras 21167^{NM} and 21168^{MUC}, quando comparadas as suas sequências de nucleotídeos com as demais amostras e com a PAO1. As análises apontaram que 21107^{SCV}, 21167^{NM} e 21169^{SCV} exibiam as mesmas mutações no gene *mutS*, representadas por uma deleção, dez substituições e dez inserções, quando comparadas à PAO1 e às outras amostras; estas, em contrapartida, apresentaram apenas substituições, diferentes daquelas observadas nas amostras previamente mencionadas (Tabela 20).

O fenômeno da hipermutabilidade, já bem descrito por ser decorrente de mutações no sistema de reparo do DNA bacteriano, está também implicado na adaptação e resistência microbiana, seja ao peculiar ambiente pulmonar, aos antimicrobianos usados na terapia de erradicação de infecções respiratórias ou mesmo às respostas imunes do hospedeiro com FC. Através das análises das sequências de nucleotídeos usando RAST, PATRIC e *BioEdit*, foram avaliados os genes principalmente associados ao fenômeno HPM (*mutL*, *mutT*, *mutS*, *mutM* e *uvrD*) e comparadas com a PAO1. Os genes *mutL*, *mutT* e *uvrD* revelaram 99% de identidade quando comparadas as sequências de nucleotídeos das seis amostras e a cepa de referência, com o número de substituições nas variando de três a vinte e dois. No entanto, analisando-se o gene *mutM*, pôde-se notar 100% de identidade quando comparadas as amostras à PAO1. As análises apontaram que 21107^{SCV}, 21167^{NM} e 21169^{SCV} exibiam as mesmas mutações no gene *mutS*, representadas por uma deleção, dez substituições e dez inserções, quando comparadas à PAO1 e às outras amostras; estas, em contrapartida, apresentaram apenas substituições, diferentes daquelas observadas nas amostras previamente mencionadas (Tabela 20).

Tabela 20: Comparação das sequências de nucleotídeos dos genes relacionados ao fenótipo *small colony variant* e à hipermutabilidade, entre as seis amostras de *Pseudomonas aeruginosa* e a PAO1

	Gene	Número de acesso	Peso (pb)	21114 ^{NM}	21113 ^{MUC}	21107 ^{SCV}	21167 ^{NM}	21168 ^{MUC}	21169 ^{SCV}	Identidade X PAO1
Small Colony Variant	<i>rsmA</i>	PA0592	807	<i>subs</i> : 7 n	<i>subs</i> : 7 n	<i>subs</i> : 7 n	<i>subs</i> : 7 n	<i>subs</i> : 7 n	<i>subs</i> : 7 n	99% id
	<i>yfiN</i>	PA1120	1308	<i>subs</i> : 3 n	<i>subs</i> : 3 n	<i>subs</i> : 3 n	<i>subs</i> : 3 n	<i>subs</i> : 3 n	<i>subs</i> : 3 n	99% id
	<i>yfiR</i>	PA1121	573	-	-	-	-	-	-	100 %
	<i>fleQ</i>	PA1097	1473	<i>subs</i> : 13 n	<i>subs</i> : 13 n	<i>subs</i> : 13 n	<i>subs</i> : 13 n	<i>subs</i> : 13 n	<i>subs</i> : 13 n	99% id
	<i>wspF</i> (<i>cheB</i>)	PA0173	1050	-	-	-	Δ 21 n <i>subs</i> : 6 n	Δ 6 n <i>subs</i> : 3 n	-	21167 = 97 % id 21168 = 99 % id
	<i>accBC</i>	PA4847	1350	<i>subs</i> : 4 n	<i>subs</i> : 4 n	<i>subs</i> : 4 n	<i>subs</i> : 4 n	<i>subs</i> : 4 n	<i>subs</i> : 4 n	99 % id
SCV/HPM	<i>mutS</i>	PA3620	2568	<i>subs</i> : 10 n	<i>subs</i> : 10 n	Δ 1 n <i>subs</i> : 10 n <i>ins</i> :10 n	Δ 1 n <i>subs</i> : 10 n <i>ins</i> :10 n	<i>subs</i> : 10 n	Δ 1 n <i>subs</i> : 10 n <i>ins</i> :10 n	99 % id
Hipermutabilidade	<i>mutL</i>	PA4946	1902	<i>subs</i> : 22 n	<i>subs</i> : 22 n	<i>subs</i> : 22 n	<i>subs</i> : 22 n	<i>subs</i> : 22 n	<i>subs</i> : 22 n	99 % id
	<i>mutT</i>	PA4400	<i>mutT1</i> . 555 <i>mutT2</i> . 438	<i>subs</i> : 3 n <i>subs</i> : 4 n	<i>subs</i> : 3 n <i>subs</i> : 4 n	<i>subs</i> : 3 n <i>subs</i> : 4 n	<i>subs</i> : 3 n <i>subs</i> : 4 n	<i>subs</i> : 3 n <i>subs</i> : 4 n	<i>subs</i> : 3 n <i>subs</i> : 4 n	99 % id
	<i>mutM</i>	PA0357	813	-	-	-	-	-	-	100 % id
	<i>uvrD</i>	PA5443	2187	<i>subs</i> : 6 n	<i>subs</i> : 6 n	<i>subs</i> : 6 n	<i>subs</i> : 6 n	<i>subs</i> : 6 n	<i>subs</i> : 6 n	99 % id

Legenda: id = percentual (%) de identidade. n: nucleotídeos; Δ : deleção; *subs*: substituição, *ins*: inserção. MUC: mucoide; NM: não mucoide. SCV: *small colony variant*. HPM: hipermutabilidade. pb: pares de bases.

Fonte: A autora.

Tabela suplementar 1 (S1): Ilhas genômicas previstas no genoma das seis amostras de *Pseudomonas aeruginosa*, alinhados com o genoma de referência da PAO1, pelo banco de dados *Islandviwer* de acordo com *IslandPath-DIMOB*

Predicted Genomic Island	21114 ^{NM}	21113 ^{MUC}	21107 ^{SCV}	21167 ^{NM}	21168 ^{MUC}	21169 ^{SCV}
1. Antranilato sintase e fosforibosiltransferase, indol-3-glicerol fosfato sintase, regulador da transcrição Vfr / proteína do receptor de AMP cíclico e proteína da família OsmC / Ohr.	-	-	+	+	-	-
2. Metiltransferase dependente de SAM PA0798 (UbiE paralog), proteína de absorção de ferro, oxidoredutase, família aldo / ceto redutase, N-acetilmuramoil-L-alanina amidase, proteína Mlr3950, proteína de transporte de manganês MntH, cisteína dessulfurase, família yjgF, reguladores transcricionais família LysR, família TetR e família MerR, proteína de resistência à glioxalase / bleomicina / dioxigenase.	+	+	+	+	+	-
3. Cisteína dioxigenase, sulfurtransferase relacionada ao rodanês, fago e proteínas líticas, gp7 e gp8.	+	+	+	+	+	+
4. 3-desmetilubiquinona-9 3-metiltransferase, proteína semelhante a Gfa, proteína ClpB, ribonucleotídeo redutase de classe III (anaeróbio), proteína de ativação, helicases e subunidades de helicase de DNA e RNA da superfamília I, proteína putativa de choque térmico, serina fosfatase RsbU, regulador da subunidade Sigma, endonuclease de reparo de incompatibilidade de <i>patch</i> muito curta (específico para G-T), DNA citosina metiltransferase M.NgoMIII e proteína de exclusão de fago T7.	+	+	+	+	+	+
5. Proteína hipotética no <i>cluster</i> semelhante a PFGI-1, proteína associada a nucleóide, helicase de DNA replicativo em <i>cluster</i> semelhante a PFGI-1 e proteína com domínio de nuclease semelhante a ParB em <i>cluster</i> semelhante a PFGI-1.	+	+	+	+	+	+
6. Fagos e proteína hipotética.	+	+	+	-	+	+
7. Precursor da exotoxina A, proteína piocina e proteína imunitária piocina S2, antirepressor profago, transposase e derivados inativados e ribonucleotídeo redutase de classe Ia (aeróbio) - subunidade beta.	+	+	-	+	+	+
8. Proteína de translocação da arginona-cintilada TatC, provável glicosiltransferase e adenilil sulfato quinase.	+	+	-	+	+	+
9. Proteína terminase agente de transferência de genes.	-	-	-	+	-	-

Legenda: +: ilha genômica presente; -: ilha genômica ausente. MUC: mucoide; NM: não-mucoide; SCV: *small colony variant*.

Fonte: *Islandviwer/ IslandPath-DIMOB*.

Tabela suplementar 2 (S2): Comparação dos fatores de virulência entre as seis amostras de *Pseudomonas aeruginosa* (continua)

Gene	Produto	Classificação	21114 ^{NM}	21113 ^{MUC}	21107 ^{SCV}	21167 ^{NM}	21168 ^{MUC}	21169 ^{SCV}
<i>pilO</i>	Proteína PilO da biogênese do <i>pilus</i> tipo IV	Aderência e motilidade	+	+	+	+	+	+
<i>fhaI</i>	Proteína InpI / VasC de domínio associado a T6SS	Sistema de secreção do tipo VI	+	+	+	+	+	+
<i>pscN</i>	ATP sintase citoplasmática de secreção tipo III (YscN, SpaL, MxiB, HrcN, EscN)	Sistema de secreção do tipo III	+	+	+	+	+	+
<i>tagS</i>	Sistema de transporte de peptídeo antimicrobiano tipo ABC, componente de permease	Sistema de secreção do tipo VI	+	+	+	+	+	+
<i>exsE</i>	Proteína hipotética	Sistema de secreção do tipo III	+	+	+	+	+	+
<i>xcpA/pilD</i>	Peptidase líder (prepilina peptidase) / N-metiltransferase	Aderência e motilidade	+	+	+	+	+	+
<i>pvcB</i>	Proteína PvcB, relacionada a enzimas oxidantes de aminoácidos		+	+	+	+	+	+
<i>xcpV</i>	Proteína I da via de secreção geral	Sistema de secreção do tipo II	+	+	+	+	+	+
<i>pcrV</i>	Inibidor de LcrG citoplasmático de secreção de tipo III (LcrV, proteína de controle de secreção e direcionamento, antígeno V)	Sistema de secreção do tipo III	+	+	+	+	+	+
<i>phzA1</i>	Proteína de biossíntese de fenazina (PhzA)		+	+	+	+	+	+
<i>xcpZ</i>	Proteína M da via de secreção geral	Sistema de secreção do tipo II	+	+	+	+	+	+
<i>pvdH</i>	Proteína de biossíntese de pioverdina PvdH, L-2,4-diaminobutirato: 2-oxoglutarato aminotransferase		+	+	+	+	+	+
<i>motD</i>	Proteína de rotação do motor flagelar (MotB)		+	+	+	+	+	+
<i>pilF</i>	Proteína PilF da biogênese do <i>pilus</i> tipo IV	Aderência e motilidade	+	+	+	+	+	+
<i>algI</i>	Provável poli (beta-D-manuronato) O-acetilase	Antifagocitose e resistência ao soro	+	+	+	+	+	+

Tabela suplementar 2 (S2): Comparação dos fatores de virulência entre as seis amostras de *Pseudomonas aeruginosa* (continua)

Gene	Produto	Classificação	21114 ^{NM}	21113 ^{MUC}	21107 ^{SCV}	21167 ^{NM}	21168 ^{MUC}	21169 ^{SCV}
<i>chpB</i>	Proteína-glutamato metilesterase CheB do regulador da resposta à quimiotaxia	Aderência e motilidade	+	+	+	+	+	+
<i>flgA</i>	Proteína de formação de anel P de corpo basal flagelar (FlgA)		+	+	+	+	+	+
<i>pcrR</i>	Proteína de resposta de diminuição de cálcio com secreção de tipo III (LcrR)	Sistema de secreção do tipo III	+	+	+	+	+	+
<i>pchA</i>	Isocorismato sintase / Isocorismato sintase [pioquelina] de sideróforo / Isocorismato sintase da biossíntese de sideróforo	Sideróforo	+	+	+	+	+	+
<i>fliN</i>	Proteína de <i>switch</i> do motor flagelar (FliN)	Aderência e motilidade	+	+	+	+	+	+
<i>flgG</i>	Proteína de bastonete de corpo basal flagelar (FlagG)	Aderência e motilidade	+	+	+	+	+	+
<i>pilX</i>	Proteína da biogênese fimbrial tipo IV (PilX)	Aderência e motilidade	+	+	+	+	+	+
<i>pppA</i>	Proteína serina T6SS / treonina fosfatase (PppA)	Sistema de secreção do tipo VI	+	+	+	+	+	+
<i>mbtH-like</i>	Chaperona NRPS MbtH-like		+	+	+	+	+	+
<i>algB</i>	Regulador de resposta do sistema de dois-componentes da biossíntese de alginato (AlgB)	Antifagocitose e resistência ao soro	+	+	+	+	+	+
<i>exsA</i>	Proteína termorreguladora de secreção Tipo III (LcrF, VirF, regulação da transcrição do plasmídeo de virulência)	Sistema de secreção do tipo III	+	+	+	+	+	+
<i>pcrI</i>	Regulador negativo da secreção da membrana externa do sistema de secreção do tipo III (TyeA)	Sistema de secreção do tipo III	+	+	+	+	+	+
<i>pscH</i>	Proteína efetora de secreção tipo III (YopR, codificada por YscH)	Sistema de secreção do tipo III	+	+	+	+	+	+
<i>pilM</i>	Proteína PilM da biogênese do <i>pilus</i> tipo IV	Aderência e motilidade	+	+	+	+	+	+
<i>fptA</i>	Receptor de membrana externa para FptA férrico-pioquelina / Receptor de membrana externa para sideróforo férrico	Sideróforo	+	+	+	+	+	+

Tabela suplementar 2 (S2): Comparação dos fatores de virulência entre as seis amostras de *Pseudomonas aeruginosa* (continua)

Gene	Produto	Classificação	21114 ^{NM}	21113 ^{MUC}	21107 ^{SCV}	21167 ^{NM}	21168 ^{MUC}	21169 ^{SCV}
<i>motY</i>	Proteína putativa da membrana externa		+	+	+	+	+	+
<i>fliK</i>	Proteína de controle de comprimento de gancho flagelar (FliK)		+	+	+	+	+	+
<i>lasA</i>	Precursor de protease (LasA)	Protease	+	+	+	+	+	+
<i>mucA</i>	Fator Sigma RpoE, proteína reguladora negativa (RseA)	Antifagocitose e resistência ao soro	+	+	+	+	+	+
<i>pcrG</i>	Proteína <i>plug</i> citoplasmática de secreção tipo III (LcrG)	Sistema de secreção do tipo III	+	+	+	+	+	+
<i>mucB</i>	Precursor da proteína reguladora negativa do fator RpoE do Sigma (RseB)	Antifagocitose e resistência ao soro	+	+	+	+	+	+
<i>fliR</i>	Proteína de biossíntese flagelar (FliR)	Aderência e motilidade	+	+	+	+	+	+
<i>motC</i>	Proteína de rotação motora flagelar (MotA)		+	+	+	+	+	+
<i>pscL</i>	Proteína citoplasmática de secreção tipo III (YscL)	Sistema de secreção do tipo III	+	+	+	+	+	+
<i>pilW</i>	Proteína da biogênese fimbrial tipo IV (PilW)	Aderência e motilidade	+	+	+	+	+	+
<i>vgrG1b</i>	Proteína VgrG		+	+	+	+	+	+
<i>phzC1</i>	2-ceto-3-desoxi-D-arabino-heptulosonato-7-fosfato sintase II (PhzC)		+	+	+	+	+	+
<i>pvdF</i>	Pioverdina sintetase PvdF, N5-hidroxiornitina formiltransferase		+	+	+	+	+	+
<i>popN</i>	Proteína de detecção de contato da membrana externa de secreção tipo III (YopN, Yop4b, LcrE)	Sistema de secreção do tipo III	+	+	+	+	+	+
<i>exoY</i>	Adenilato ciclase (ExoY)	Toxina	+	+	+	+	+	+
<i>hsiB1/vipA</i>	TssB Componente do T6SS (ImpB/VipA)	Sistema de secreção do tipo VI	+	+	+	+	+	+
<i>pscJ</i>	Ponte de secreção tipo III entre a lipoproteína da membrana interna e externa (YscJ, HrcJ, EscJ, PscJ)	Sistema de secreção do tipo III	+	+	+	+	+	+

Tabela suplementar 2 (S2): Comparação dos fatores de virulência entre as seis amostras de *Pseudomonas aeruginosa* (continua)

Gene	Produto	Classificação	21114 ^{NM}	21113 ^{MUC}	21107 ^{SCV}	21167 ^{NM}	21168 ^{MUC}	21169 ^{SCV}
<i>pvdI</i>	Cadeia lateral de peptídeo pioverdina sintetase não-ribossomal PvdI / Módulos de peptídeo sintetase não ribossomal da biossíntese de sideróforo		+	+	+	+	+	+
<i>pilT</i>	Proteína de motilidade de <i>twitching</i> (PilT)	Aderência e motilidade	+	+	+	+	+	+
<i>pilG</i>	Proteína de motilidade de <i>twitching</i> (PilG)	Aderência e motilidade	+	+	+	+	+	+
<i>pscG</i>	Proteína do envelope bacteriano que ancora o sistema de secreção do tipo III (YscG)	Sistema de secreção do tipo III	+	+	+	+	+	+
<i>pilR</i>	Proteína reguladora da expressão de fímbrias tipo IV (PilR)	Aderência e motilidade	+	+	+	+	+	+
<i>flgD</i>	Proteína de modificação de bastão do corpo basal flagelar (FlgD)	Aderência e motilidade	+	+	+	+	+	+
<i>exsD</i>	Regulador negativo do sistema de secreção tipo III (LscZ)	Sistema de secreção do tipo III	+	+	+	+	+	+
<i>waaG</i>	UDP-glicose: (heptosil) LPS alfa1,3-glicosiltransferase WaaG	Aderência e endotoxina	+	+	+	+	+	+
<i>xcpX</i>	Proteína K da via de secreção geral	Sistema de secreção do tipo II	+	+	+	+	+	+
<i>tagR</i>	Proteína hipotética	Sistema de secreção do tipo VI	+	+	+	+	+	+
<i>algL</i>	Alginato liase (AlgL)	Antifagocitose e resistência ao soro	+	+	+	+	+	+
<i>algB</i>	Regulador de resposta do sistema de dois-componentes da biossíntese de alginato (AlgB)	Antifagocitose e resistência ao soro	+	+	+	+	+	+
<i>popD</i>	Injeção do sistema de secreção tipo III no hospedeiro e proteína reguladora negativa (YopD)	Sistema de secreção do tipo III	+	+	+	+	+	+
<i>pvcD</i>	Proteína PvcD, relacionada a monooxigenases dependentes de dinucleotídeo de flavina adenina de dois-componentes		+	+	+	+	+	+

Tabela suplementar 2 (S2): Comparação dos fatores de virulência entre as seis amostras de *Pseudomonas aeruginosa* (continua)

Gene	Produto	Classificação	21114 ^{NM}	21113 ^{MUC}	21107 ^{SCV}	21167 ^{NM}	21168 ^{MUC}	21169 ^{SCV}
<i>hsiF1</i>	Componente TssE do T6SS semelhante à lisozima	Sistema de secreção do tipo VI	+	+	+	+	+	+
<i>pscF</i>	Proteína citoplasmática do sistema de secreção do tipo III (YscF)	Sistema de secreção do tipo III	+	+	+	+	+	+
<i>fimU</i>	Proteína da biogênese fimbrial tipo 4 (FimU)	Aderência e motilidade	+	+	+	+	+	+
<i>motA</i>	Proteína de rotação motora flagelar (MotA)		+	+	+	+	+	+
<i>fimT</i>	Proteína da biogênese fimbrial tipo IV (FimT)	Aderência e motilidade	+	+	+	+	+	+
<i>pilV</i>	Proteína da biogênese fimbrial tipo IV (PilV)	Aderência e motilidade	+	+	+	+	+	+
<i>algA</i>	Manose-1-fosfato guanililtransferase / Manose-6-fosfato isomerase	Antifagocitose e resistência ao soro	+	+	+	+	+	+
<i>flgK</i>	Proteína associada a gancho flagelar (FlgK)	Aderência e motilidade	+	+	+	+	+	+
<i>tagT</i>	Transportador ABC, proteína de ligação de ATP	Sistema de secreção do tipo VI	+	+	+	+	+	+
<i>flgF</i>	Proteína do bastonete flagelar do corpo basal (FlgF)	Aderência e motilidade	+	+	+	+	+	+
<i>fleN</i>	Regulador de síntese flagelar (FleN)	Aderência e motilidade	+	+	+	+	+	+
<i>phzH</i>	Proteína modificadora da fenazina (PhzH) / Asparagina sintetase [hidrólise de glutamina]		+	+	+	+	+	+
<i>vgrG1b</i>	Proteína VgrG		+	+	+	+	+	+
<i>algX</i>	Alginato O-acetiltransferase periplasmática (AlgX)	Antifagocitose e resistência ao soro	+	+	+	+	+	+
<i>pilN</i>	Proteína da biogênese do <i>pilus</i> tipo IV (PilN)	Aderência e motilidade	+	+	+	+	+	+
<i>pscT</i>	Proteína de membrana interna do sistema de secreção de tipo III (YscT, HrcT, SpaR, EscT, EpaR1, homóloga aos componentes de exportação flagelar)	Sistema de secreção do tipo III	+	+	+	+	+	+

Tabela suplementar 2 (S2): Comparação dos fatores de virulência entre as seis amostras de *Pseudomonas aeruginosa* (continua)

Gene	Produto	Classificação	21114 ^{NM}	21113 ^{MUC}	21107 ^{SCV}	21167 ^{NM}	21168 ^{MUC}	21169 ^{SCV}
<i>pscD</i>	Proteína da membrana interna do sistema de secreção tipo III (YscD, homóloga aos componentes de exportação flagelar)	Sistema de secreção do tipo III	+	+	+	+	+	+
<i>flhA</i>	Proteína da biossíntese flagelar (FlhA)	Aderência e motilidade	+	+	+	+	+	+
<i>pscO</i>	Proteína do envelope bacteriano que ancora o sistema de secreção do tipo III (YscO)	Sistema de secreção do tipo III	+	+	+	+	+	+
<i>xcpP</i>	Proteína C da via de secreção geral	Sistema de secreção do tipo II	+	+	+	+	+	+
<i>pscS</i>	Proteína de membrana interna do Sistema de secreção do tipo III (YscS, homóloga aos componentes de exportação flagelar)	Sistema de secreção do tipo III	+	+	+	+	+	+
<i>pilE</i>	Proteína da biogênese do <i>pilus</i> tipo IV (PilE)	Aderência e motilidade	+	+	+	+	+	+
<i>pchE</i>	PchE Diidroaeruginoato sintetase, módulos de peptídeo sintetase não-ribossomal / Módulos de peptídeo sintetase não-ribossomal de biossíntese de sideróforo	Sideróforo	+	+	+	+	+	+
<i>pscI</i>	Proteína citoplasmática do sistema de secreção tipo III (YscI)	Sistema de secreção do tipo III	+	+	+	+	+	+
<i>pilQ</i>	Proteína da biogênese do <i>pilus</i> tipo IV (PilQ)	Aderência e motilidade	+	+	+	+	+	+
<i>pvdS</i>	PvdS fator Sigma, controlando a biossíntese de pioverdina	Sideróforo e pigmento	+	+	+	+	+	+
<i>pchG</i>	Proteína biossintética de pioquelina PchG, oxidoredutase (ligação de NAD) / Tiazolinilimida redutase do <i>cluster</i> de genes da biossíntese de sideróforo	Sideróforo	+	+	+	+	+	+
<i>algR</i>	Regulador AlgR da resposta do sistema de dois-componentes da biossíntese de alginato	Antifagocitose e resistência ao soro	+	+	+	+	+	+
<i>fliF</i>	Proteína do anel M flagelar (FliF)	Aderência e motilidade	+	+	+	+	+	+

Tabela suplementar 2 (S2): Comparação dos fatores de virulência entre as seis amostras de *Pseudomonas aeruginosa* (continua)

Gene	Produto	Classificação	21114 ^{NM}	21113 ^{MUC}	21107 ^{SCV}	21167 ^{NM}	21168 ^{MUC}	21169 ^{SCV}
<i>algJ</i>	Alginato O-acetiltransferase da membrana interna (AlgJ)	Antifagocitose e resistência ao soro	+	+	+	+	+	+
<i>pscK</i>	Proteína citoplasmática do sistema de secreção tipo III (YscK)	Sistema de secreção do tipo III	+	+	+	+	+	+
<i>lipI</i>	Lipoproteína TssJ do sistema de secreção T6SS (VasD)	Sistema de secreção do tipo VI	+	+	+	+	+	+
<i>lasI</i>	N- (3-oxododecanoil) -L-homoserina lactona sintase / N-acil-L-homoserina lactona sintase, família LuxI	Sistema <i>quorum sensing</i>	+	+	+	+	+	+
<i>xcpR</i>	Proteína E da via de secreção geral	Sistema de secreção do tipo II	+	+	+	+	+	+
<i>pvdM</i>	Dipeptidase putativa, biossíntese de pyoverdina (PvdM)		+	+	+	+	+	+
<i>pcr3</i>	Proteína do sistema de secreção tipo III (SctX)	Sistema de secreção do tipo III	+	+	+	+	+	+
<i>fliA</i>	Fator Sigma de RNA polimerase para operon flagelar		+	+	+	+	+	+
<i>fleS</i>	Sensor flagelar histidina quinase (FleS)		+	+	+	+	+	+
<i>algG</i>	Poli (beta-D-manuronato) C5 epimerase (AlgG)	Antifagocitose e resistência ao soro	+	+	+	+	+	+
<i>motB</i>	Proteína de rotação do motor flagelar (MotB)		+	+	+	+	+	+
<i>algK</i>	Sistema de exportação de alginato AlgK / AlgE, componente periplasmático (AlgK)	Antifagocitose e resistência ao soro	+	+	+	+	+	+
<i>pcrD</i>	Proteína do canal da membrana interna do sistema de secreção do tipo III (LcrD, HrcV, EscV, SsaV)	Sistema de secreção do tipo III	+	+	+	+	+	+
<i>alg44</i>	Proteína de polimerização de alginato Alg44, proteína de fusão de membrana	Antifagocitose e resistência ao soro	+	+	+	+	+	+

Tabela suplementar 2 (S2): Comparação dos fatores de virulência entre as seis amostras de *Pseudomonas aeruginosa* (continua)

Gene	Produto	Classificação	21114 ^{NM}	21113 ^{MUC}	21107 ^{SCV}	21167 ^{NM}	21168 ^{MUC}	21169 ^{SCV}
<i>algQ</i>	Proteína AlgQ reguladora de alginato, regulador transcricional positivo de AlgD	Antifagocitose e resistência ao soro	+	+	+	+	+	+
<i>aprA</i>	Homólogo de PrtA / B / C / G de metaloproteinase alcalina secretada	Protease	+	+	+	+	+	+
<i>phzD1</i>	2-amino-2-desoxi-isochorismato hidrolase (PhzD)		+	+	+	+	+	+
<i>pvdQ</i>	Acil-homoserina lactona acilase PvdQ, extinção de quorum		+	+	+	+	+	+
<i>fliG</i>	Proteína de troca do motor flagelar (FliG)	Aderência e motilidade	+	+	+	+	+	+
<i>pcr4</i>	Proteína chaperona YscY (proteína Yop de translocação de proteínas)	Sistema de secreção do tipo III	+	+	+	+	+	+
<i>pilS</i>	Sensor de dois-componentes (PilS)	Aderência e motilidade	+	+	+	+	+	+
<i>pchR</i>	Regulador transcricional (PchR)	Sideróforo	+	+	+	+	+	+
<i>pchl</i>	Bomba de efluxo ABC, membrana interna fundida e subunidades de ATPase no agrupamento de genes de pioquelina / transportador ABC de sideróforo de ferro putativo, domínios de permease fundida e ATPase	Sideróforo	+	+	+	+	+	+
<i>algD</i>	GDP-manose 6-deidrogenase	Antifagocitose e resistência ao soro	+	+	+	+	+	+
<i>pilU</i>	Conjunto de <i>pilus</i> de sistema tipo IV (PilU) componente de ATPase	Aderência e motilidade	+	+	+	+	+	+
<i>pseE</i>	Proteína do sistema de secreção tipo III (YscE)	Sistema de secreção do tipo III	+	+	+	+	+	+
<i>vgrG1a</i>	Proteína VgrG	Sistema de secreção do tipo VI	+	+	+	+	+	+
<i>phzG1</i>	Piridoxamina 5'-fosfato oxidase (PhzG)		+	+	+	+	+	+
<i>fliB</i>	Proteína de biossíntese flagelar (FliB)	Aderência e motilidade	+	+	+	+	+	+
<i>hsiJ1</i>	Componente TssK do T6SS (ImpJ / VasE)	Sistema de secreção do tipo VI	+	+	+	+	+	+

Tabela suplementar 2 (S2): Comparação dos fatores de virulência entre as seis amostras de *Pseudomonas aeruginosa* (continua)

Gene	Produto	Classificação	21114 ^{NM}	21113 ^{MUC}	21107 ^{SCV}	21167 ^{NM}	21168 ^{MUC}	21169 ^{SCV}
<i>mucA</i>	Proteína reguladora negativa do fator Sigma RpoE (RseA)	Antifagocitose e resistência ao soro	+	+	+	+	+	+
<i>mucC</i>	Proteína reguladora do fator Sigma RpoE (RseC)	Antifagocitose e resistência ao soro	+	+	+	+	+	+
<i>pscP</i>	Proteína do sistema de secreção tipo III (YscP)	Sistema de secreção do tipo III	+	+	+	+	+	+
<i>phzE1</i>	2-amino-2-desoxi-isochorismato sintase (PhzE)		+	+	+	+	+	+
<i>pchF</i>	Pioquelina sintetase PchF, módulo de peptídeo sintetase não-ribossomal/Módulos de peptídeo sintetase não-ribossomal de biossíntese de sideróforo	Sideróforo	+	+	+	+	+	+
<i>lasB</i>	Vibriolisina, protease de zinco extracelular / Pseudolisina, protease de zinco extracelular	Protease	+	+	+	+	+	+
<i>mucD</i>	Protease HtrA / proteína chaperona		+	+	+	+	+	+
<i>waaP</i>	Núcleo de lipopolissacarídeo heptose (I) quinase (RfaP)	Aderência e endotoxina	+	+	+	+	+	+
<i>phzF1</i>	Isomerase trans-2,3-dihidro-3-hidroxiantranilato		+	+	+	+	+	+
<i>icmF1/tssM1</i>	Componente TssM do T6SS (IcmF / VasK)	Sistema de secreção do tipo VI	+	+	+	+	+	+
<i>tagQ</i>	Adesina autotransportadora		+	+	+	+	+	+
<i>phzB1</i>	Proteína de biossíntese de fenazina (PhzB)		+	+	+	+	+	+
<i>pchH</i>	Bomba de efluxo ABC, membrana interna fundida e subunidades de ATPase no agrupamento de genes de pioquelina / transportador de sideróforo de ferro ABC putativo, domínios de permease fundida e ATPase	Sideróforo	+	+	+	+	+	+
<i>flgH</i>	Proteína do anel L flagelar (FlgH)	Aderência e motilidade	+	+	+	+	+	+

Tabela suplementar 2 (S2): Comparação dos fatores de virulência entre as seis amostras de *Pseudomonas aeruginosa* (continua)

Gene	Produto	Classificação	21114 ^{NM}	21113 ^{MUC}	21107 ^{SCV}	21167 ^{NM}	21168 ^{MUC}	21169 ^{SCV}
<i>chpE</i>	Provável proteína de quimiotaxia	Aderência e motilidade	+	+	+	+	+	+
<i>fliQ</i>	Proteína de biossíntese flagelar (FliQ)	Aderência e motilidade	+	+	+	+	+	+
<i>hsiG1</i>	Componente TssF do T6SS (ImpG / VasA)	Sistema de secreção do tipo VI	+	+	+	+	+	+
<i>pvcC</i>	4-hidroxifenilacetato 3-monooxigenase		+	+	+	+	+	+
<i>pvdA</i>	L-ornitina 5-monooxigenase, PvdA de biossíntese de pioverdina / proteína de biossíntese de sideróforo, monooxigenase	Sideróforo e pigmento	+	+	+	+	+	+
<i>phzA1</i>	Proteína de biossíntese de fenazina (PhzA)		+	+	+	+	+	+
<i>mucP</i>	Protease intramembrana RasP / YluC , implicada na divisão celular com base na clivagem de FtsL		+	+	+	+	+	+
<i>pscC</i>	Proteína formadora de poros de membrana externa do sistema de secreção Tipo III (YscC, MxiD, HrcC, InvG)	Sistema de secreção do tipo III	+	+	+	+	+	+
<i>rhlI</i>	N-butanoil-L-homoserina lactona sintase / N-acil-L-homoserina lactona sintase, família LuxI	Sistema <i>quorum sensing</i>	+	+	+	+	+	+
<i>fimV</i>	Provável proteína transmembrana de montagem do <i>pilus</i> tipo IV relacionada à FimV	Aderência e motilidade	+	+	+	+	+	+
<i>fleQ</i>	Proteína reguladora flagelar (FleQ)	Aderência e motilidade	+	+	+	+	+	+
<i>hsiE1</i>	Componente TagJ associado a T6SS (ImpE)	Sistema de secreção do tipo VI	+	+	+	+	+	+
<i>phzA1</i>	Proteína de biossíntese de fenazina (PhzA)		+	+	+	+	+	+
<i>pscU</i>	Proteína da membrana interna do sistema de secreção do tipo III (YscU, SpaS, EscU, HrcU, SsaU, homóloga aos componentes de exportação flagelar)	Sistema de secreção do tipo III	+	+	+	+	+	+

Tabela suplementar 2 (S2): Comparação dos fatores de virulência entre as seis amostras de *Pseudomonas aeruginosa* (continua)

Gene	Produto	Classificação	21114 ^{NM}	21113 ^{MUC}	21107 ^{SCV}	21167 ^{NM}	21168 ^{MUC}	21169 ^{SCV}
<i>xcpW</i>	Proteína J da via de secreção geral	Sistema de secreção do tipo II	+	+	+	+	+	+
<i>pscR</i>	Proteína da membrana interna do sistema de secreção do tipo III (YscR, SpaR, HrcR, EscR, homóloga aos componentes de exportação flagelar)	Sistema de secreção do tipo III	+	+	+	+	+	+
<i>pilK</i>	Proteína metiltransferase de quimiotaxia (CheR)	Aderência e motilidade	+	+	+	+	+	+
<i>xcpS</i>	Proteína F da via de secreção geral	Sistema de secreção do tipo II	+	+	+	+	+	+
<i>pchC</i>	Proteína biossintética PchC de pioquelina, tioesterase / tioesterase prevista no <i>cluster</i> de genes da biossíntese de sideróforo	Sideróforo	+	+	+	+	+	+
<i>hsiA1</i>	Componente TssA de T6SS (ImpA)	Sistema de secreção do tipo VI	+	+	+	+	+	+
<i>xcpQ</i>	Proteína D da via de secreção geral	Sistema de secreção do tipo II	+	+	+	+	+	+
<i>flgM</i>	Regulador negativo da síntese de flagelina (FlgM) (anti-Sigma28)		+	+	+	+	+	+
<i>pcrH</i>	Proteína chaperona do sistema de secreção tipo III para YopD (SycD)	Sistema de secreção do tipo III	+	+	+	+	+	+
<i>plcH</i>	Fosfolipase C → PlcH hemolítico	Toxina e danos à membrana	+	+	+	+	+	+
<i>pilJ</i>	proteína PilJ de motilidade de <i>twitching</i>	Aderência e motilidade	+	+	+	+	+	+
<i>fliH</i>	Proteína de montagem flagelar (FliH)	Aderência e motilidade	+	+	+	+	+	+
<i>fliM</i>	Proteína de troca de motor flagelar (FliM)	Aderência e motilidade	+	+	+	+	+	+
<i>tseI</i>	Proteína hipotética		+	+	+	+	+	+
<i>mucE</i>	Proteína hipotética		+	+	+	+	+	+
<i>chpC</i>	Provável proteína de quimiotaxia	Aderência e motilidade	+	+	+	+	+	+

Tabela suplementar 2 (S2): Comparação dos fatores de virulência entre as seis amostras de *Pseudomonas aeruginosa* (continua)

Gene	Produto	Classificação	21114 ^{NM}	21113 ^{MUC}	21107 ^{SCV}	21167 ^{NM}	21168 ^{MUC}	21169 ^{SCV}
<i>algZ</i>	Sensor de sistema de biossíntese de alginato de dois-componentes histidina quinase AlgZ / FimS	Antifagocitose e resistência ao soro	+	+	+	+	+	+
<i>ppkA</i>	T6SS Serina / treonina proteína quinase (PpkA)	Sistema de secreção do tipo VI	+	+	+	+	+	+
<i>pcr2</i>	Chaperona do sistema de secreção tipo III (SycN)	Sistema de secreção do tipo III	+	+	+	+	+	+
<i>fliP</i>	Proteína de biossíntese flagelar (FliP)	Aderência e motilidade	+	+	+	+	+	+
<i>chpA</i>	Provável <i>frameshift</i> componente do sistema de transdução de sinal quimiotático	Aderência e motilidade	+	+	+	+	+	+
<i>fliO</i>	Proteína de biossíntese flagelar (FliO)	Aderência e motilidade	+	+	+	+	+	+
<i>fliJ</i>	Proteína flagelar (FliJ)	Aderência e motilidade	+	+	+	+	+	+
<i>flhF</i>	Proteína de biossíntese flagelar (FlhF)	Aderência e motilidade	+	+	+	+	+	+
<i>pilY2</i>	Proteína de biogênese fimbrial tipo IV (PilY2)	Aderência e motilidade	+	+	+	+	+	+
<i>exoS</i>	Exoenzima putativa T	Toxina	+	+	+	+	+	+
<i>waaF</i>	ADP-heptose - lipooligossacarídeo heptosiltransferase II	Aderência e endotoxina	+	+	+	+	+	+
<i>exsC</i>	Desconhecido, provavelmente envolvido na secreção do tipo III	Sistema de secreção do tipo III	+	+	+	+	+	+
<i>popB</i>	Proteína de injeção do sistema de secreção do tipo III (YopB)	Sistema de secreção do tipo III	+	+	+	+	+	+
<i>pscB</i>	Proteína chaperona do sistema de secreção Tipo III para YopN (SycN, YscB)	Sistema de secreção do tipo III	+	+	+	+	+	+
<i>pilH</i>	Proteína de motilidade de <i>twitching</i> (PilH)	Aderência e motilidade	+	+	+	+	+	+
<i>waaA</i>	Transferase de ácido 3-desoxi-D-mano-octulosônico	Aderência e endotoxina	+	+	+	+	+	+

Tabela suplementar 2 (S2): Comparação dos fatores de virulência entre as seis amostras de *Pseudomonas aeruginosa* (continua)

Gene	Produto	Classificação	21114 ^{NM}	21113 ^{MUC}	21107 ^{SCV}	21167 ^{NM}	21168 ^{MUC}	21169 ^{SCV}
<i>xcpT</i>	Proteína G da via de secreção geral	Sistema de secreção do tipo II	+	+	+	+	+	+
<i>algW</i>	Protease de sensor de estresse de membrana externa (DegS)		+	+	+	+	+	+
<i>rhlA</i>	RhlA, 3- (3-hidroxi)alcanoiloxi ácidos alcanóicos (HAAs) sintase	Biosurfactante	+	+	+	+	+	+
<i>phzM</i>	Metiltransferase PhzM fenazina-específica	Pigmento e atividade antimicrobiana	+	+	+	+	+	+
<i>algC</i>	Fosfoglucomutase / Fosfomanomutase		+	+	+	+	+	+
<i>phzS</i>	Monoxigenase PhzS dependente de FAD	Pigmento e atividade antimicrobiana	+	+	+	+	+	+
<i>clpVI</i>	T6SS AAA+ chaperona ClpV (TssH)	Sistema de secreção do tipo VI	+	+	+	+	+	+
<i>pchD</i>	2,3-dihidroxi benzoato-AMP ligase [pioquelina] de sideróforo / 2,3-dihidroxi benzoato-AMP ligase da biossíntese de sideróforo	Sideróforo	+	+	+	+	+	+
<i>waaC</i>	Lipopolissacarídeo heptosiltransferase I central	Aderência e endotoxina	+	+	+	+	+	+
<i>flgN</i>	Proteína de biossíntese flagelar (FlgN)		+	+	+	+	+	+
<i>algF</i>	Alginato O-acetiltransferase periplasmática (AlgF)	Antifagocitose e resistência ao soro	+	+	+	+	+	+
<i>fleR</i>	Regulador de resposta flagelar de dois-componentes (FleR)	Aderência e motilidade	+	+	+	+	+	+
<i>pvdO</i>	PvdO, serina / treonina quinase responsiva à pioverdina (previsto por OlgaV)		+	+	+	+	+	+
<i>chpD</i>	Regulador transcricional, família AraC	Aderência e motilidade	+	+	+	+	+	+
<i>flgJ</i>	Proteína flagelar (FlgJ) [peptidoglicano hidrolase]	Aderência e motilidade	+	+	+	+	+	+
<i>exsB</i>	Lipoproteína transportadora do sistema de secreção Tipo III (YscW, VirG)	Sistema de secreção do tipo III	+	+	+	+	+	+

Tabela suplementar 2 (S2): Comparação dos fatores de virulência entre as seis amostras de *Pseudomonas aeruginosa* (continua)

Gene	Produto	Classificação	21114 ^{NM}	21113 ^{MUC}	21107 ^{SCV}	21167 ^{NM}	21168 ^{MUC}	21169 ^{SCV}
<i>pvdN</i>	Proteína de biossíntese de pioverdina (PvdN), aminotransferase putativa, classe V		+	+	+	+	+	+
<i>toxA</i>	Proteína hipotética	Toxina	+	+	+	+	+	+
<i>rhlB</i>	RhlB, TDP-ramnosiltransferase I	Biosurfactante	+	+	+	+	+	+
<i>flgC</i>	Proteína de bastonete flagelar de corpo basal (FlgC)	Aderência e motilidade	+	+	+	+	+	+
<i>hsiC1/vipB</i>	Componente TssC do T6SS (ImpC/VipB)	Sistema de secreção do tipo VI	+	+	+	+	+	+
<i>pvdL</i>	Precursor da sintetase do cromóforo pioverdina (PvdL) / Módulos de peptídeo sintetase não-ribossomal da biossíntese de sideróforo		+	+	+	+	+	+
<i>fliE</i>	Proteína do complexo corporal basal-gancho flagelar (FliE)	Aderência e motilidade	+	+	+	+	+	+
<i>algE</i>	Sistema de exportação de alginato AlgK / AlgE, porina de membrana externa (AlgE)	Antifagocitose e resistência ao soro	+	+	+	+	+	+
<i>pchB</i>	Isochorismato de piruvato-liase [pioquelina] de sideróforo / Isocorismato de piruvato-liase da biossíntese de sideróforo	Sideróforo	+	+	+	+	+	+
<i>flgB</i>	Proteína de bastonete flagelar de corpo basal (FlgB)		+	+	+	+	+	+
<i>algP/algR3</i>	Proteína reguladora de alginato AlgP, regulador transcricional positivo de (AlgD)	Antifagocitose e resistência ao soro	+	+	+	+	+	+
<i>hcp1</i>	Hcp componente do T6SS	Sistema de secreção do tipo VI	+	+	+	+	+	+
<i>xcpU</i>	Proteína H da via de secreção geral	Sistema de secreção do tipo II	+	+	+	+	+	+
<i>flgE</i>	Proteína de gancho flagelar (FlgE)	Aderência e motilidade	+	+	+	+	+	+
<i>pvdG</i>	Tioesterase PvdG envolvida na biossíntese de peptídeos não ribossomais		+	+	+	+	+	+
<i>pilI</i>	Proteína de transdução de sinal do <i>pili</i> do sistema tipo IV (Pili)	Aderência e motilidade	+	+	+	+	+	+

Tabela suplementar 2 (S2): Comparação dos fatores de virulência entre as seis amostras de *Pseudomonas aeruginosa* (conclusão)

Gene	Produto	Classificação	21114 ^{NM}	21113 ^{MUC}	21107 ^{SCV}	21167 ^{NM}	21168 ^{MUC}	21169 ^{SCV}
<i>pscQ</i>	Proteína da membrana interna do sistema de secreção do tipo III (YscQ, homólogo aos componentes de exportação flagelar)	Sistema de secreção do tipo III	+	+	+	+	+	+
<i>tagF/pppB</i>	Componente TagF associado aoT6SS (ImpM)	Sistema de secreção do tipo VI	+	+	+	+	+	+
<i>xcpY</i>	Proteína L da via de secreção geral	Sistema de secreção do tipo II	+	+	+	+	+	+
<i>exoT</i>	Proteína hipotética	Toxina	+	+	+	+	+	+
<i>algU</i>	RpoE fator Sigma da RNA polimerase	Antifagocitose e resistência ao soro	+	+	+	+	+	+
<i>dotU1</i>	Componente TssL da membrana externa do T6SS(ImpK / VasF) / domínio OmpA / MotB	Sistema de secreção do tipo VI	+	+	+	+	+	+
<i>ptxR</i>	Regulador transcricional (PtxR), família LysR		+	+	+	+	+	+
<i>pilP</i>	Proteína de biogênese de <i>pilus</i> tipo IV (PilP)	Aderência e motilidade	+	+	+	+	+	+
<i>tse2</i>	Proteína hipotética		+	+	+	+	+	+
<i>alg8</i>	Alginato polimerase / glicosiltransferase (Alg8)	Antifagocitose e resistência ao soro	+	+	+	+	+	+
<i>rhlC</i>	RhlC, TDP-ramnosiltransferase 2		+	+	+	+	+	+
<i>tse3</i>	Lisozima bacteriana Tse3, efetora do sistema de secreção do tipo VI		+	+	+	+	+	+
<i>hsiH1</i>	Component TssG do T6SS (ImpH/VasB)	Sistema de secreção do tipo VI	+	+	+	+	+	+
<i>fliI</i>	ATP sintase FliI específica do flagelo	Aderência e motilidade	+	+	+	+	+	+
<i>pvcA</i>	Proteína PvcA, relacionada a isonitrila sintases conhecidas		+	+	+	+	+	+
<i>flgI</i>	Proteína flagelar do anel P (FlgI)	Aderência e motilidade	+	+	+	+	+	+
<i>fliL</i>	Proteína associada ao corpo basal flagelar (FliL)		+	+	+	+	+	+

Legenda: +: gene de virulência presente. MUC: mucoide; NM: não mucoide; SCV: *small colony variant*.

4 DISCUSSÃO

P. aeruginosa é o patógeno mais prevalente em secreções respiratórias de pacientes com FC (WATERS et al., 2013; SALSGIVER et al., 2016). Em geral, após a primeira colonização por esse microrganismo, os pacientes com FC apresentam vários episódios de colonização intermitente, culminando em infecção pulmonar crônica, sendo esse um fator central no curso da doença, associado a más condições clínicas, impacto significativo na qualidade de vida e nos custos da terapia (DAMAS et al., 2008; DITTRICH, 2017; BLANCHARD; WATERS, 2019).

O tratamento de infecções por *P. aeruginosa* não sensíveis aos carbapenêmicos (PANSC) ou a múltiplos antimicrobianos representa um grande desafio à terapêutica de pacientes crônicos com FC. Deste modo, a ocorrência de PANSC pode causar pior desfecho clínico, pois a resistência bacteriana a antimicrobianos usados como opção terapêutica final em pacientes portadores de infecções não responsivas aumenta as chances de óbito prematuro (BIANCONI et al., 2019).

Em paralelo, populações bacterianas de *P. aeruginosa* com fenótipo MDR, além de promoverem o declínio da função pulmonar, diminuem o leque de antimicrobianos disponíveis para a erradicação da infecção e as chances de sucesso do tratamento (BLANCHARD et al., 2017; LAW et al., 2017; RUTTER et al., 2017; STEFANI et al., 2017), tornando fundamental o acompanhamento dos exames microbiológicos de pacientes FC (MARQUES et al., 2011; GASPAR et al., 2013).

De forma geral o seguimento dos pacientes nos centros especializados em FC é realizado com frequência trimestral, ou quando ocorre exacerbação do quadro pulmonar, permitindo o aumento da expectativa e qualidade de vida para a maioria daqueles com adesão, ainda que haja muitos óbitos em idades iniciais devido às complicações da doença respiratória (DAMAS et al., 2008; De BOECK; AMARAL; 2016). O mesmo modelo de *follow-up* é aplicado para os pacientes incluídos no presente estudo, atendidos nos dois centros de referência.

Considerando que o número de pacientes dos grupos pediátrico e adulto foi o mesmo (n=9 em cada um deles), e a quantidade de amostras recuperadas do primeiro grupo (53,9%) foi discretamente maior que no segundo (46,1%), é importante salientar que o número de indivíduos incluídos no presente trabalho não representa o total daqueles com infecção pulmonar crônica atendidos nas duas unidades avaliadas, uma vez que, incluímos apenas os que apresentaram isolamento de amostras de PANSC.

A inclusão apenas de pacientes com infecção pulmonar crônica foi feita de forma intencional e direcionada, uma vez que a circulação de amostras de PANSC e dos fenótipos de resistência têm sido cada vez mais relatados na literatura e enseja bastante preocupação diante das possibilidades de falha terapêutica e aumento das taxas de morbimortalidade (POTRON; POIREL; NORDMANN, 2015; SMITH et al., 2017; LUCCA et al., 2018; PANG et al., 2019). Um importante passo na identificação e acompanhamento de pacientes com FC é a definição da infecção crônica pulmonar por *P. aeruginosa*, uma vez que a transição para esse estágio coloca os pacientes sob maior risco de progressão da doença respiratória (COHEN; PRINCE, 2012; WATERS; GRIMWOOD, 2018).

Diante da existência de alguns critérios de cronicidade distintos (CFF, 2019; MENA et al. (2008) nós optamos por aquele que mais se aproximou das características definidas para a nossa população, relativas à clínica e ao perfil microbiológico dos pacientes (LEE et al., 2005).

Diversos estudos discorrem sobre a associação da infecção pulmonar crônica e a progressão rápida da doença respiratória, na qual *P. aeruginosa* está relacionada a diversos processos que favorecem a sua adaptação ao meio ambiente pulmonar. A transição para o estágio crônico, geralmente precedida pela ocorrência de amostras mucoides, é predominante em mais de 60% dos pacientes adultos (AL-ALOUL et al., 2004; AARON et al., 2010; LUND-PALAU et al., 2016; LEE; YOON, 2017; SMITH et al., 2017; PARKINS; SOMAYAJI; WATERS, 2018).

Observamos uma importante variação no número de amostras obtidas entre os pacientes, e é fundamental destacar que foram selecionadas somente as amostras PANSC, o que pode causar uma impressão errônea quando se avaliam os números de amostras indivíduo a indivíduo, ao longo do período de estudo. Diante disso, podemos notar que alguns pacientes possuem uma ou duas amostras, e outros têm poucas dezenas, e ainda assim todos foram classificados como crônicos, critério baseado na continuidade da detecção de *P. aeruginosa* isoladas de secreções respiratória por seis meses consecutivos (LEE et al., 2005), independentemente de seu perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos.

Alguns pacientes apresentaram duas amostras de *P. aeruginosa* com morfologias distintas identificadas no mesmo material clínico, cadastradas no banco de dados com a mesma data, sendo contabilizadas como duas amostras diferentes. Esse fato é frequentemente observado nesses pacientes, especialmente aqueles com infecção pulmonar crônica, pois a distinção entre uma *P. aeruginosa* com fenótipo mucoide e outra não mucoide é suficiente para que entendamos que se tratavam de duas amostras diferentes. Além disso, o número de

visitas, somado aos momentos de exacerbações pulmonares que por vezes alguns dos pacientes possam ter sofrido durante esse período, também pode provocar diferenças nesses dados.

Após o estabelecimento da infecção crônica *P. aeruginosa*, torna-se quase impossível a erradicação desse patógeno; diante desse prognóstico ruim, é crucial a utilização de antimicrobianos antipseudomonais, usados de forma agressiva, visando retardar ou prevenir a transição ao estágio de cronicidade (ZEMANICK; HOFMAN, 2016).

Assim, diante da exposição cumulativa aos antimicrobianos, tem-se observado uma elevação nas taxas de *P. aeruginosa* resistentes em pacientes com FC, em especial aos carbapenêmicos, alcançando até 17% dos indivíduos com infecção respiratória por *P. aeruginosa* (CFF, 2019), causando grande consternação diante das falhas na erradicação, aumento no número de pacientes crônicos e elevação das taxas de morbidade e mortes precoces (LUND-PALAU et al., 2016; MUSTAFA et al., 2016; PANG et al., 2019).

Até pouco tempo atrás, a frequência de amostras de *P. aeruginosa* com elevadas taxas de resistência aos antimicrobianos na FC era considerado um cenário pouco comum no Brasil (PEREZ; BARTH, 2011; HERMES et al., 2013; LUTZ et al., 2013, FERREIRA et al., 2015). Entretanto, resultados publicados pelo nosso grupo (ALMEIDA et al., 2021), ao investigar a ocorrência de *P. aeruginosa* não sensíveis aos carbapenêmicos em 179 amostras de *P. aeruginosa* recuperadas de pacientes com infecção pulmonar crônica, nos mesmos centros de referência em FC incluídos neste trabalho, revelaram um novo contexto, no qual quase metade das amostras (44,1%) eram de PANSC, e ainda indicando que 39,6% e 4,4% das amostras foram classificadas MDR e XDR, simultaneamente.

Como mencionado anteriormente, os carbapenêmicos são comumente usados para tratar quadros de exacerbação ou infecção por *P. aeruginosa* na FC (RICHARDOT et al., 2015; CFF, 2019). Ao redor do mundo, e ao longo do tempo, as taxas de resistência aos carbapenêmicos em *P. aeruginosa* FC, considerados uma das últimas opções na linha de terapia, têm sido cada vez mais reportadas (MESAROS et al., 2007; MIRIAGOU et al., 2010; DORTET; POIREL; NORDMANN, 2012; RICHARDOT et al., 2015).

Observamos que 137 (95,8%), 86 (60,1%) e 57 (39,9%) das amostras eram resistentes a imipenem, meropenem e doripenem, respectivamente. Voltamos a ressaltar que só foram incluídas neste trabalho as amostras não sensíveis aos carbapenêmicos, e que mais da metade (56,6%) delas era não sensível a IPM e MEN, concomitantemente.

As taxas aumentadas de casos de infecção de pacientes com FC, pediátricos, por *P. aeruginosa* CR e MDR, em diversos países, têm demandado estratégias de erradicação

agressivas e programas de manejo das terapias com antimicrobianos, medidas que são essenciais para combater o progresso e disseminação da resistência (LOGAN et al., 2017; RUTTER et al., 2017).

Neste trabalho, os resultados apontaram que aproximadamente metade das amostras de PANSC era não sensível à gentamicina, amicacina, tobramicina e ciprofloxacina. Tendo em vista o fato bastante conhecido de que as amostras de *P. aeruginosa* em FC no Brasil eram factualmente mais sensíveis aos antimicrobianos (PAIXÃO et al., 2010; PEREZ; BARTH, 2011; HERMES et al., 2013; LUTZ et al., 2013; FERREIRA et al., 2010, 2015), todavia diferente do que tem sido reportado em outros centros, globalmente (MAHMOUD et al., 2013; POTRON et al., 2015; DING et al., 2016; SUBEDI et al., 2018), pode-se portanto considerar que os nossos percentuais de resistência estão relativamente aumentados.

Um possibilidade para a baixa frequência de amostras MDR em nosso país pode ser creditada à ausência de relatos de cepas epidêmicas de *P. aeruginosa* na FC (LEÃO et al., 2010; FERREIRA et al., 2015), que usualmente se disseminam com grande facilidade entre os pacientes (MUSTAFA et al., 2016; LOGAN et al., 2017; RUTTER et al., 2017). De forma geral, esses clones transmissíveis estão associados ao fenótipo MDR e têm sido continuamente relatados na Europa, América do Norte e Austrália, como as cepas *Denmark* (DK), clone C, *Liverpool Epidemic Strain* (LES), Manchester, *Australian Epidemic Strain-1* (AES-1), *Midland* (Mid1) e *Prairie Epidemic Strain* (PES) (PEDERSEN et al., 1986; CHENG et al., 1996; RÖMLING et al., 1994b; ARMSTRONG et al., 2001; JONES et al., 2001; SCOTT; PITT 2004; LÓPEZ-CAUSAPE et al., 2015; SOMAYAJI et al., 2017).

Além do próprio critério de seleção adotado, já discutido anteriormante, as altas taxas de resistência aos antimicrobianos observadas podem ser explicadas, parcialmente, pela presença de amostras com o fenótipo mucóide. Metade das amostras descritas nesse trabalho exibiam esse fenótipo, e observamos que 12,1% (17) dessas foram classificadas como MDR, 20,3% como XDR e 3,5% como PDR, e somadas nota-se um total de 36% de amostras mucóides apresentando fenótipos altamente resistentes.

A associação inicial da mucoidade e as altas taxas de resistência aos antimicrobianos ainda é controversa, estando a formação de biofilme mais bem correlacionada com a resistência aumentada (SHAWAR et al., 1999; AHANGARZADEH-REZAEI et al., 2002; SRIFUENGFUNG et al., 2004; OWLIA, et al., 2014). Num estudo publicado por Bianconi et al (2019), em que foram sequenciadas quarenta amostras de *P. aeruginosa* da FC, coletadas ao longo de oito anos, relatou-se que, apesar de as amostras mucóides serem quase sempre

associadas a taxas de resistência aumentadas, a análise estatística demonstrou uma correlação negativa entre amostras MDR e o fenótipo mucóide.

O exopolissacarídeo alginato, produzido excessivamente por *P. aeruginosa* mucóides, pode inibir a difusão de alguns antimicrobianos, como tobramicina e gentamicina pelo epitélio respiratório, dada a formação de biofilmes, podendo ser uma provável causa direta da resistência (GERMONI; BREMER; LAMONT, 2016).

Análises dos resultados dos TSA de amostras coletadas em dois centros cariocas para tratamento de FC, do período de 2010 a 2014, mostraram altos percentuais de resistência aos antimicrobianos em *P. aeruginosa*, os quais: 44,1% para amicacina, 43,6% para gentamicina, 37,9% para aztreonam, 31,2% para tobramicina, e < a 30% para piperacilina+tazobactam e ciprofloxacina (ALMEIDA et al., 2021). Diante do exposto, é possível perceber uma elevação expressiva nos índices amostras resistentes quando comparados aos dados nacionais previamente publicados, ainda que nesse trabalho estivessem compreendidas amostras de *P. aeruginosa* sensíveis e não sensíveis aos carbapenêmicos de pacientes FC.

Pôde-se observar, no presente estudo, ao longo dos dez anos, um aumento progressivo no número de amostras mais resistentes aos antimicrobianos, tanto aquelas recuperadas de pacientes pediátricos quanto de adultos com FC, excetuando-se os anos de 2009 e 2015. Alguns itens devem ser considerados, diante de tal narrativa: 1) o número de amostras de paciente não foi homogêneo, seja pelo fato da seleção especificamente de amostras NSC e não de todas as *P. aeruginosa* coletadas; 2) pela diferença nas quantidades de exacerbações pulmonares de cada paciente; 3) pelo período em que se iniciou o seu acompanhamento no centro de referência *versus* o intervalo estipulado para a coleta desses dados, 4) pela ocorrência do óbito de dois pacientes ao longo do estudo.

Essas observações nos permitiram contabilizar um aumento nos registros de amostras mais resistentes, mais expressivo após os anos de 2012 e 2013, acompanhado inclusive de maior constância dos fenótipos MDR, XDR e PDR, o que pode estar refletindo as taxas de exposição cumulativa a antibióticos ao longo do tempo, uma extraordinária força seletiva para a emergência de amostras mais resistentes.

É crucial o monitoramento da resistência aos antimicrobianos, principalmente para aqueles com aplicação direta na prática da erradicação de infecções pulmonares por *P. aeruginosa* na FC, em virtude da gravidade que a doença pode atingir e da impossibilidade de uso da antibioticoterapia empírica.

Alguns medicamentos antipseudomonais para erradicação e controle da exacerbação do quadro clínico respiratório merecem atenção e monitoramento, como tobramicina,

ciprofloxacina e polimixina, pois são utilizadas como estratégia na terapia inalatória. O aumento da taxa de resistência a esses antimicrobianos, assim como aos aminoglicosídeos e carbapenêmicos, certamente representa um grande desafio na condução do tratamento da infecção (ATHANAZIO et al., 2017; SMITH et al., 2017).

Foi possível verificar uma diferença na caracterização de PANSC, ainda que percentualmente baixa, diante dos resultados do TDD e pela CIM, quando testada a susceptibilidade aos carbapenêmicos. É sabido que podem haver discrepâncias em relação aos resultados de ambas as metodologias, por conta das diferenças de acurácia, sensibilidade, instabilidade dos carbapenêmicos, e forma de execução dos dois ensaios, impactando diretamente nos índices de resistência em amostragens demasiado grandes (BURNS et al., 2000; GALES et al., 2002; SMITH et al., 2003; SRIFUENGFUNG et al., 2004; AARON et al., 2005; OWLIA et al., 2014; RUTTER et al., 2017).

No presente estudo, as taxas de amostras não sensíveis, determinadas pela CIM, ainda que tenham apresentado percentuais discretamente inferiores, não causou prejuízo à interpretação final dos nossos resultados na categorização da resistência, já que não foi a metodologia de escolha para a inclusão/classificação das amostras como PANSC.

As faixas das CIMs observadas para as 143 amostras variaram de 1 a 128 µg/mL, 0,125 a 64 µg/mL e de 0,25 a 32 µg/mL para os carbapenêmicos IPM, MEM e DOR, respectivamente, com faixas de diluição elevadas, quando comparadas a outros estudos.

Dados reportados num trabalho realizado com *P. aeruginosa* recuperadas de pacientes com FC no continente europeu indicaram valores de CIM para IPM variando de 4 a 32 µg/mL, e, para o MEM, de 2 e 16 µg/mL (MUSTAFA et al., 2016). Notamos que os nossos valores de CIMs são relativamente superiores, uma vez que detectamos inibição do crescimento das amostras nas concentrações de 128 µg/mL e 64 µg/mL, para IPM e MEM, simultaneamente, comparando-se os resultados para esses dois antimicrobianos.

Essa diferença pode ser, em parte, explicada pela discrepância no critério de seleção das amostras em ambos os estudos, e destacamos que o relato europeu avaliou amostras de *P. aeruginosa* de pacientes FC crônicos e não crônicos, independentemente de sua faixa etária, e não apenas aquelas não sensíveis aos carbapenêmicos.

Observamos que 97 (67,9%) amostras de PANSC alistadas no presente estudo demonstraram valores de CIMs para IPM elevados (≥ 8 até 128 µg/mL), o que levou à discussão sobre as possíveis causas da resistência aos carbapenêmicos. Devido ao manifesto fato de que a expressão reduzida de porinas é o mecanismo de resistência mais comum em PANSC na FC, e mediante CIMs aumentadas observadas na maior parte das amostras

incluídas no atual trabalho, seria factível essa casuística. O conhecimento do mecanismo de resistência é fundamental nas estratégias de erradicação e controle de infecções pulmonares por *P. aeruginosa*, na condução da antibioticoterapia e avaliação do prognóstico desses pacientes.

Diante do exposto, e com a cautela de considerarmos os demais mecanismos que podem estar envolvidos na resistência aos carbapenêmicos, os nossos resultados exigem investigações futuras sobre a natureza molecular da resistência, para que se possam fazer mais assertivas.

Nosso estudo evidenciou taxas de CIMs variando de 0,15 a 128 µg/mL, para os três carbapenêmicos, e os valores mais elevados das CIM₅₀ e CIM₉₀ foram de 32 e 64 µg/mL para IPM, 4 e 16 µg/mL para MEM, e 2 e 32 µg/mL para DOR, não sendo considerada a faixa etária dos pacientes neste momento.

Um relato publicado avaliando 139 amostras de *P. aeruginosa* FC e não FC, de pacientes atendidos no Hospital Universitário de Nantes (França), mostrou CIM₅₀ de 4, 2 e 1 µg/mL, respectivamente para imipenem, meropenem e doripenem, e as CIM₉₀ foram 32 µg/mL para imipenem, e 16 µg/mL, para meropenem e doripenem (BRETONNIÈRE et al., 2016).

Observamos que, em comparação aos resultados descritos por esse outro estudo europeu, nossas faixas de CIM, CIM₅₀ e CIM₉₀ foram de ordinário mais elevadas, dados que merecem ser monitorados, uma vez que podem impactar na condução da terapia e em caso de falha terapêutica, gerar danos severos à qualidade e expectativa de vida desses pacientes. Como já apontado anteriormente, essa diferença pode ser, em parte, explicada pela diferença no critério de seleção das amostras em ambos os estudos.

Nos últimos anos, alguns estudos têm reportado globalmente um aumento nas taxas de amostras de *P. aeruginosa* resistentes a polimixina em infecções associadas a pacientes sob cuidados intensivos, como pneumonia e bacteremia (PARK et al., 2011; JEANNO; BOLARD; PLÉSIAT, 2016; MELETIS; SKOURA, 2018; TAHMASEBIA; DEHBASHIB; ARABESTANIB, 2020).

Felizmente, é sabido que a circulação de amostras de *P. aeruginosa* não sensíveis a polimixina em pacientes não-FC, no Brasil, é incomum (HERMES et al., 2013; RIBEIRO et al.; 2018; ORSI et al., 2019; ARAÚJO LIMA et al., 2020). De maneira categórica, é fundamental tomar conhecimento desses casos no nosso país, pois restringem as opções terapêuticas, colaboram com taxas elevadas de óbito, e que poderiam se espalhar velozmente,

nos casos de amostras portadoras do gene plasmidial *mcr-1* (TAHMASEBIA; DEHBASHIB; ARABESTANIB et al., 2020).

Diante dos poucos relatos de amostras de *P. aeruginosa* resistentes a polimixina, no Brasil, pode-se notar que são normalmente recuperadas de pacientes sob cuidados intensivos, algumas correlacionadas com o fenótipo MDR e a ocorrência concomitante com genes codificadores de betalactamases (ORSI et al., 2016; RIBEIRO et al., 2018; da COSTA JÚNIOR et al., 2020).

Um grupo brasileiro publicou resultados da análise do genoma de *P. aeruginosa* pertencente ao ST245 e resistente a polimixina, obtida de paciente não-FC, que estava sob cuidados intensivos, e que demonstrou um conjunto extraordinário de genes de resistência e virulência, e polimorfismos genéticos relacionados ao lipídio A e à ativação de lipopolissacarídeo (LPS) (ORSI et al., 2019).

Na FC, os relatos de PANSP em todo o mundo também são pouco frequentes e um dos mais expressivos foi reportado em três diferentes hospitais no Reino Unido, Bélgica e Alemanha, demonstrando que 22% das amostras de *P. aeruginosa*, coletadas no período de 2006 a 2012, foram PANSP (MUSTAFA et al., 2016). Esses dados europeus avaliaram uma coletânea de microrganismos com diferentes perfis de resistência, não apenas aos carbapenêmicos, o que pode ser um fator de conflito quando comparados os dados reportados com os do nosso estudo.

Considerando tais diferenças nos critérios seleção das amostras, e excluindo-se qualquer estratificação relativa à cronicidade ou faixa etária, observamos que os números de amostras incluídas nos dois estudos foram próximos.

No presente estudo, 31,5% das amostras foram classificadas como PANSP, pelo que sabemos, esse é o primeiro relato em nosso país na FC.

Surpreendentemente, a primeira amostra PANSP do presente estudo foi isolada em 2008, sendo recuperada anualmente ao menos uma amostra não sensível a polimixina, até o último ano desse trabalho, fato esse que nos causou admiração diante da ausência de relatos desses casos em FC no Brasil (HERMES et al., 2013; ORSI et al., 2019).

Recentemente a publicação de um *draft genome* trouxe surpresa ao descrever *P. aeruginosa* isolada de secreção respiratória de um paciente pediátrico com FC, no México, pertencente ao novo ST3351, exibindo alto nível de resistência a polimixinas (CIM > 128 µg/mL), e com mutações detectadas associadas à resistência em *pmrB* e *pmrA*, além de diversos genes de virulência terem sido identificados (ROSALES-REYES et al., 2020).

É interessante notar que a circulação ainda rara de amostras PANSP pode ser consequência tanto da circulação infrequente de amostras não sensíveis, quanto das diferenças nas metodologias utilizadas no TSA para esse antimicrobiano, que pode resultar em índices falsamente baixos ao se subestimar a resistência adotando-se a disco-difusão para a polimixina, devido à sua má difusão em ágar por seu alto peso molecular (FALAGAS; RAFAILIDIS; MATTHAIYOU, 2010; BIALVAEI; KAFIL, 2015).

A adoção e padronização da determinação da susceptibilidade a polimixina por microdiluição, tem sido citada como uma metodologia adequada, precisa, sensível, célere e de baixo custo para a determinação da atividade da polimixina nas amostras de *P. aeruginosa* (HOGARDT et al., 2004; MOSKOWITZ et al., 2010; CLSI b e c, 2020). O acesso aos valores das faixas da CIM fornecidos nos laudos microbiológicos pode ser extremamente útil para os médicos que acompanham os pacientes com FC, permitindo comparar e avaliar a susceptibilidade das amostras clínicas, e na tomada de decisão na prescrição de antibióticos que podem causar efeitos adversos severos, como a polimixina B (BRETONNIÈRE et al., 2016; REKIS; AMBROSE; SAKON, 2020).

A prevalência de amostras de *P. aeruginosa* hipermutável em infecção crônica de FC é bem conhecida, e varia usualmente de 16 a 60% nessas amostras (OLIVER et al., 2000; OLIVER; BAQUERO; BLÁZQUEZ, 2002; MACIÁ et al., 2004, 2005; CIOFU et al., 2005). Um estudo multicêntrico realizado no Brasil, em duas cidades diferentes (Sudeste e Sul), mostrou a ocorrência de taxas de *P. aeruginosa* HPM de 27,5% entre os isolados (LUTZ et al., 2013). Os resultados obtidos no presente estudo, conduzido com amostras coletadas exatamente nos mesmos dois centros do Rio de Janeiro do artigo brasileiro citado previamente, indicaram uma frequência relativamente baixa entre as NSC, uma vez que das 143 amostras, 18 (12,3%) eram HPM, ocorrendo em 11 (61,1%) pacientes, (7 pacientes pediátricos e 4 adultos), os quais tinham ao menos uma amostra de *P. aeruginosa* SISf. A maioria das amostras HPM (72,2%) foi recuperada de pacientes pediátricos.

Cinco amostras HPM do presente estudo exibiam o fenótipo MDR, e nove (50%) eram XDR, deixando clara uma relação entre a frequência de mutação aumentada e a resistência aumentada e simultânea a múltiplas antimicrobianos dessas amostras de PANSC. A discrepância entre os dados dos mesmos centros pode ser parcialmente devida ao número de amostras, de pacientes, assim como ao perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos.

Grande parte dos estudos com pacientes com FC revelou uma ligação entre o aumento da resistência antimicrobiana e a hipermutabilidade (CIOFU et al., 2005; LEE et al., 2005; MACIÁ et al., 2005; MENA et al., 2008; LUTZ et al., 2013). No entanto, alguns deles

sugeriram que a hipermutabilidade pode influenciar a adaptação genética bacteriana, como *quorum sensing*, virulência e hiperprodução de alginato, mas não está necessariamente associada à sensibilidade ao antimicrobiano (MENA et al., 2008).

Relato de caso

No relato de caso descrito nesse trabalho, um paciente 17P (F508del/Y913X) com FC cronicamente infectado por *P. aeruginosa* há 12 anos e apresentou um quadro de exacerbação pulmonar no ano seguinte ao encerramento da coleta de amostras que culminou com a sua hospitalização (abril de 2017). Nesse momento, foram recuperadas três amostras de *P. aeruginosa* com três fenótipos ocorrendo simultaneamente: não mucoide (21114), mucoide (21113) e *small colony variant* (SCV) (21107). Tal fato se repetiu dois meses depois, quando ele sofreu novo quadro de exacerbação sendo necessário mais uma internação, quando foram isoladas as amostras 21167^{NM}, 21168^{MUC} e 21169^{SCV}.

Esses fatos chamaram a nossa atenção, pois, embora o fenótipo SCV tenha sido descrito na literatura ao redor do mundo (PESTRAK et al., 2018; AL AHMAR et al., 2019; GLOAG et al., 2019), até o momento, ainda não havia sido relatado no Brasil. Assim, investigamos os aspectos fenotípicos e genotípicos dessas amostras, relatando a primeira ocorrência no Brasil de *P. aeruginosa* SCV, isolada de um paciente com FC, utilizando técnicas moleculares para nos auxiliar na identificação das variações mais relevantes entre as seis amostras. Esses dados deram origem ao artigo submetido ao *Brazilian Journal of Microbiology* (ANEXO C).

A maioria das amostras incluídas no relato de caso foi classificada como MDR, exceto as mucoides, que geralmente são associadas à piora da função pulmonar. Todas as amostras eram susceptíveis a polimixina, exceto a 21169^{SCV}, recuperada durante a segunda hospitalização. As amostras consideradas *superbugs* já foram descritas como associadas à resistência a polimixina, e os mecanismos de resistência que ainda não estão claros, podendo ser devido à modificação de LPS, porinas, bombas de efluxo, superprodução de cápsula de polissacarídeo ou mediada por plasmídeo por THG, como o gene *mcr-1*. Na última década, um aumento nas taxas de resistência a polimixina de *P. aeruginosa* foi relatado (PARK et al., 2011; JEANNOT; BOLARD; PLÉSIAT, 2017; MELETIS; SKOURA, 2018; TAHMASEBIA et al., 2020). Por outro lado, *P. aeruginosa* não sensível a polimixina, no Brasil, permanece com circulação extremamente rara (HERMES et al., 2013; ORSI et al., 2019). A ocorrência

de amostras não suscetíveis a polimixina na FC, em nosso país foi relatada pela primeira vez neste estudo, porém a circulação do gene *mcr-1* não foi detectada.

No presente estudo, HPM foi observada nas amostras exibindo os fenótipos NM e SCV, com taxas de mutação fortemente aumentadas, em ambos os períodos de internação do paciente. Embora esse fenômeno não esteja relacionado exclusivamente ao aumento da resistência aos antimicrobianos (MENA et al., 2007; LUTZ et al., 2013; KHIL et al., 2019), as amostras incluídas neste relato de caso foram classificadas como MDR ou PDR. A população de amostras HPM, em diferentes momentos da infecção, pode se tornar prevalente e até mesmo dominante sobre toda a população selvagem, sob certas condições, conforme observado no ambiente das vias aéreas, o que pode se traduzir em diferentes fenótipos, virulência e resistência antimicrobiana (FELIZIANI et al., 2014; SOMMER et al., 2016).

Devido ao isolamento do fenótipo SCV, que ainda não tinha sido observado em nosso país, o SGT do genoma bacteriano foi realizado, técnica molecular que tem sido cada vez mais adotada por laboratórios de microbiologia clínica (PESTRAK et al., 2018).

Todas as amostras foram identificadas como pertencentes a um novo *Sequence Type* (ST) (ST2744), porém não estavam relacionadas a nenhum complexo clonal conhecido. Está bem estabelecido que os pacientes com FC adquirem *P. aeruginosa* do meio ambiente, e que abrigam clones únicos quando atingem o estágio de infecção pulmonar crônica. No Brasil, clones epidêmicos ainda não foram descritos em amostras de *P. aeruginosa* de pacientes com FC (LEÃO et al., 2010; FERREIRA et al., 2015).

Genes responsáveis pela resistência aos antibióticos (*aph (3') - Iib*, *bla_{PAO}*, *bla_{OXA-50}*, *fosA*, *catB7* e *crpP*) foram anotados. A presença desses genes está associada ao perfil de resistência aos antimicrobianos observado fenotipicamente entre as amostras. Destacamos a detecção do gene *crpP*, conferindo resistência às fluoroquinolonas, descrito inicialmente em isolados clínicos de *Enterobacteriaceae* (não-FC) no México (CHÁVEZ-JACOBO et al., 2019), e pela primeira vez em *P. aeruginosa* de paciente com FC no Brasil, pelo presente estudo. A ciprofloxacina é utilizada como estratégia terapêutica associada a polimixina para interromper a infecção crônica, como alternativa à tobramicina, e a circulação de genes associados à resistência pode contribuir para o insucesso terapêutico, piora do quadro do paciente e óbito (ATHANAZIO et al., 2017).

Nas amostras 21107^{SCV}, 21167^{NM} e 21169^{SCV}, o montante mais importante de substituições e deleções foi observado no gene codificador da porina *oprD*, principal proteína-alvo para a captação de carbapenêmicos, associada à resistência a imipenem, na ausência de genes para carbapenemases (De ROSA et al., 2019), consistente com os resultados do

antibiograma. Nas amostras 21113^{MUC}, 21114^{NM} e 21168^{MUC}, esse gene apresentou uma substituição exclusiva (S → A), na posição 319 da sequência de aminoácidos, o que pode indicar uma perda de atividade de protease, e nenhum efeito na atividade de porina, previamente descrito por Yoshihara *et al.* (1998). O gene *oprF* apresentou, ainda que em quantidade reduzida, as mesmas substituições nas sequências de todas as amostras avaliadas. Em contrapartida, uma substituição única e exclusiva foi observada na amostra 21107^{SCV}, coincidentemente o único isolado em que a ilha genômica portadora de fatores de exotoxina A e piocina não foi detectada. *oprF* mutantes estão associados à resistência a betalactâmicos, *quorum sensing* desorganizado, resultando em biossíntese deficiente de fatores de virulência extracelulares, como piocina e exotoxina A (FITO-BONCOMPTE *et al.*, 2011; CASSIN; TSENG, 2019).

Quando foram comparados os genes repressores/reguladores de sistemas de efluxo, como *nalC*, *nfxB*, *mexS* e *mexZ*, foram observadas substituições ocorrendo em todas as amostras, descritas como relacionados fenótipo MDR em *P. aeruginosa* (CABOT *et al.*, 2016; LUPO, HAENNI; MADEC, 2018), corroborando com o perfil de suscetibilidade das amostras incluídas nesse caso clínico.

Tendo em vista a resistência aos carbapenêmicos exibida pelas amostras incluídas neste estudo, e na ausência de genes para carbapenemases, mutações observadas nos genes podem justificar em parte a resistência aos antimicrobianos, seja pela menor expressão de porinas ou superexpressão dos sistemas de efluxo (DRISCOLL; BRODY; KOLLEF, 2007).

Um fago intacto foi detectado em todas as amostras, denominado YMC11/02/R656, e foi observado que essas compartilhavam o mesmo profago descrito por nosso grupo em *Achromobacter ruhlandii*, obtida de paciente com FC (RODRIGUES *et al.*, 2016). Isso destaca a possível capacidade potencial dessas amostras em incorporar elementos genéticos transmissíveis, que podem promover a disseminação/aquisição de determinantes de resistência, ainda que de outras espécies. *P. aeruginosa* é uma espécie originalmente ambiental, e facilmente se encontram fagos associados a este microrganismo (CHATTERJEE *et al.*, 2016). Na predição de ilhas genômicas (IG), nove foram detectadas nas seis amostras. Uma IG não foi detectada apenas na amostra 21107^{SCV}, estando relacionada à virulência bacteriana e aumento da patogênese, contendo exotoxina A, produto bacteriano para prevenir reação inflamatória (WANG *et al.*, 2016), e piocina, uma importante bacteriocina (GHEQUIRE; ÖZTÜRK, 2018).

Cinco sequências de inserção foram encontradas em todas as amostras, e todas foram relacionadas a *P. aeruginosa* (100% de identidade). Está bem estabelecido que as SIs, que

mobilizam genes e flanqueiam os transposons, e estes podem estar fortemente envolvidas nas estratégias de desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos, já que facilitam a entrada de genes de resistência nos genomas microbianos (WOLKOWICZ et al., 2019). Conforme discutido anteriormente, além das porinas e das bombas de efluxo poderiam justificar parcialmente os fenótipos MDR e PDR observados nas amostras; ainda que não tenhamos realizado a montagem do genoma completo e circular, sequências relacionadas a elementos plasmidiais não foram encontradas. Todas as amostras compartilhavam os mesmos genes de virulência, entretanto, o número de cópias de alguns desses genes variou; tal fato foi observado em ambas as amostras SCV, para os genes de síntese de alginato (*algB*) e fenazina (*phzA1* e *phzB1*), o que poderia explicar o dano respiratório causado neste paciente durante o processo de infecção crônica e exacerbação. Curiosamente, um número maior de cópias de *algB* foi encontrado em ambas as amostras SCV, gene que controla os níveis de alginato ativando a transcrição de *algD*, o principal gene de biossíntese de alginato em *P. aeruginosa*, correlacionado com infecções respiratórias crônicas em pacientes com FC (GOVAN; DERETIC, 1996; WOOLWINE; WOZNIAK, 1999; TAN et al., 2014). Os genes *phzA1* e *phzB1* foram encontrados em número maior de cópias na amostra 21107^{SCV}, o que pode estar implicado no potencial de eliminação de outras espécies bacterianas, posto que pode causar aumento de espécies reativas de oxigênio, sendo tóxico para outros microrganismos que coabitem as vias aéreas (VALENTE et al., 2011; CHULIÁ, 2018). Os mesmos genes foram observados em um número menor de cópias na amostra 21169^{SCV}, coletada no segundo momento de exacerbação pulmonar do paciente. É importante atentar para a quantidade variada de cópias dos genes de virulência, pois o número de fatores de virulência colabora para o aumento do genoma acessório, gerando genomas maiores, devido à quantidade de virulência e genes de resistência (SUBEDI et al., 2018).

As sequências curtas e repetitivas de DNA denominadas CRISPR, associadas a genes associados a CRISPR (*cas*), são responsáveis por determinar um mecanismo de defesa único contra material genético exógeno (SILVEIRA et al., 2020). Foram detectadas três pequenas sequências CRISPR e três regiões DR, e nenhum gene *cas*, pela análise *in silico* de todo os genomas das amostras de *P. aeruginosa* incluídos neste relato de caso, tornando-os numericamente semelhantes aos relatados em *P. aeruginosa* cepa PAO1, e diferentes de *P. aeruginosa* SCV20265, uma *small colony variant* recuperada de paciente com FC. Uma clara associação foi demonstrada com a ausência de elementos CRISPR e grande quantidade de genes associados à resistência e virulência, bem como ao fenótipo MDR (SANTOS et al., 2020), característica observada nas amostras incluídas nesse relato de caso.

A diversidade de variantes da morfologia colonial observada sugeriu a existência de fortes e múltiplas pressões seletivas. Mutações e grandes inversões cromossômicas já foram relatadas como fatores críticos geradores de morfotipos variantes, tendo sido descritos anteriormente por vários autores e indicados como possivelmente indutores do fenótipo SCV no pulmão com FC (SMITH et al., 2006; STARKEY et al., 2009; BLANKA et al., 2015; WILLIAMS et al., 2015; MALONE, 2015). As mutações associadas ao surgimento de SCV mais comumente identificadas são aquelas que induzem a perda de função em proteínas repressoras que regulam a atividade da diguanilatociclase (DGC), como aquelas nos genes *rsmA*, *yfiN*, *fleQ*, *wspF*, *mutS* e *accBC*, que controlam os níveis intracelulares do *cdG* (*cyclic-di-GMP*), uma molécula sinalizadora que controla as vias envolvidas na mobilidade e formação de biofilme, além da produção de exopolissacarídeos bacterianos (EPS), adesinas e virulência (BLANKA et al., 2015; MALONE, 2015).

Deleções no gene *rsmA* em PAO1 foram descritas como promotoras da emergência de SCV em um modelo experimental murino, por aumentar a expressão de alginato e persistência bacteriana (IRIE et al., 2010). O gene *fleQ*, um regulador transcricional, foi descrito como indutor do fenótipo autoagregativo, semelhante ao SCV em PAO1, quando identificadas deleções na sua sequência de nucleotídeos (SMITH et al., 2006; HICKMAN; HARWOOD, 2008). Foi demonstrado *in vitro* que mutações que levam à perda da função do gene *wspF* seriam uma das principais vias para o surgimento do fenótipo SCV, devido à expressão constitutiva de *cdG* e superprodução de EPS (STARKEY et al., 2009).

O operon de sinalização *yfiBNR* é considerado outro alvo genético para a emergência de amostras clínicas SCV, e a DGC YfiN pode ser suprimida por *YfiR*. A repressão do *YfiR*, devido a uma mutação que promove perda de função nos genes *yfiR* ou *yfiN*, leva à ativação de DGC, superprodução de *cdG* e formação de SCV *in vitro* (MALONE, 2015). Foi descrito que, como *wspF* e *fleQ*, ativam mutações que ocorrem em *yfiR* e *yfiN*, em infecções pulmonares de FC crônicas, levando à formação de SCV nos pulmões (MALONE et al., 2010, 2012).

Um relato feito por Blanka et al. (2015) descreveu que, uma mutação pontual no gene *accBC* foi um dos gatilhos genéticos para a superprodução de *cdG* em *P. aeruginosa*, quando comparadas as suas sequências com as da *P. aeruginosa* SCV20265 (BLANKA et al., 2015). Mutações em *mutS* e outros genes do MMR já foram associadas ao aparecimento clínico de *P. aeruginosa* SCV na FC, podendo haver correlação com essas mutações e o aumento da persistência, em experimentos com camundongos, e que mutantes sejam selecionados em pulmões cronicamente infectados (LUJAN et al., 2007).

Comparando-se as sequências de nucleotídeos dos genes *rsmA*, *yfiN*, *yfiR*, *fleQ*, *wspF*, *mutS* e *accBC*, algumas mutações descritas anteriormente como relacionadas ao aparecimento do fenótipo SCV em *P. aeruginosa* (BLANKA et al., 2015; MALONE, 2015; SU et al., 2015) foram detectadas nas amostras do presente relato. Curiosamente, observamos as mesmas mutações ocorrendo na maioria dos genes citados anteriormente em 21114^{NM}, 21113^{MUC}, 21167^{NM} e 21168^{MUC}, que não podem ser associadas ao aparecimento de SCV, uma vez que claramente essas amostras não expressaram o fenótipo variante. Quando a sequência de nucleotídeos de *mutS* foi analisada, apesar das alterações genotípicas naquele gene estarem fortemente relacionadas à emergência de SCV, foram detectadas mutações (deleção, inserções e substituições) identificadas tanto em isolados de SCV quanto em um dos isolados não mucoides, o que também parece excluir sua relação com o surgimento desse fenótipo, neste estudo de caso.

mutS é um importante alvo mutacional no genoma de amostras HPM, uma vez que mutações em grande escala neste gene foram descritas anteriormente como relacionadas à persistência, cronicidade, aumento da resistência antimicrobiana, resistência a múltiplos antimicrobianos, incluindo a emergência do fenótipo SCV (OLIVER et al., 2000; OLIVER; BAQUERO; BLÁZQUEZ et al., 2002; MALONE, 2015). As amostras de *P. aeruginosa* 21107^{SCV}, 21167^{NM} e 21169^{SCV} apresentaram deleção, substituições e inserções em *mutS*, o que poderia explicar parcialmente as taxas de mutações fortemente aumentadas demonstradas fenotipicamente. Nas infecções crônicas por *P. aeruginosa*, amostras mutantes são muito comuns, principalmente devido a alterações nos genes *mutS* ou *mutL*, partes centrais do MMR, e podem favorecer a adaptação desse microrganismo às vias aéreas da FC (LUJÁN et al., 2011). Na maioria dos outros genes associados ao sistema de reparo de DNA bacteriano, as mesmas substituições foram encontradas em todas as amostras.

O objetivo deste estudo de caso foi comparar os diferentes fenótipos, em dois momentos de exacerbações pulmonares, e não foram observadas diferenças genotípicas relevantes esperadas nas amostras SCV, o que possivelmente se justifica pelo curto espaço de tempo entre as coletas, terapia antimicrobiana pouco conhecida e sua duração, ou porque outros possíveis genes envolvidos na emergência desse fenótipo variante ainda são desconhecidos, e podem estar atuando como reguladores dos efeitos transcricionais dos níveis de *cdG*, ou genes ligados a alguma outra via metabólica ainda não descrita.

Investigações genotípicas podem complementar positivamente o manejo laboratorial/clínico na rotina microbiológica, informando sobre alterações genéticas, que podem ter impactos preditivos no perfil de resistência não detectável e persistência associados

à colonização das vias aéreas, além de estarem relacionadas à virulência e resistência microbiana, aumentando a gravidade de quadro respiratório na FC, podendo estar relacionado ao quadro clínico do paciente em questão.

Este é o primeiro relato de *P. aeruginosa* SCV na FC no Brasil. Seu comportamento é extremamente particular, o que confere a microrganismos com esse fenótipo uma vantagem seletiva no ambiente pulmonar, rico em estressores. O fenótipo SCV, além da variante mucoide e do fenômeno HPM, desempenha um papel importante na colonização e persistência de *P. aeruginosa* no pulmão e está associada à piora clínica dos pacientes FC.

CONCLUSÕES

A análise temporal, ao longo de dez anos, em amostras de *P. aeruginosa* não sensíveis aos carbapenêmicos (PANSC) recuperadas de pacientes FC com infecção pulmonar crônica, mostrou uma elevação importante nos índices de resistência aos antimicrobianos, destacando-se amicacina, gentamicina, tobramicina, e ciprofloxacina, quando comparados com dados anteriores dos mesmos centros.

Altas taxas de resistência foram observadas para os carbapenêmicos imipenem (IPM), meropenem (MEM) e doripenem (DOR), e mais da metade das amostras exibiam não sensibilidade simultânea a IPM e MEM, e cerca de 20 % mostraram-se não sensível aos três carbapenêmicos concomitantemente. É possível que essas taxas se relacionem com a seleção de amostras de PANSC exclusivamente.

Foi perceptível o aumento no número de amostras de PANSC coletadas no período compreendido pelo estudo. Os anos em que se observou um maior número de amostras de PANSC foram 2012, 2013, 2014 e 2016. Apenas 1/4 dos pacientes tiveram uma única amostra PANSC recuperada, e todos eram de pacientes adultos.

A quase totalidade das amostras de PANSC foi associada aos fenótipos MDR, XDR ou PDR. Apenas três dos 18 pacientes não apresentaram amostras com esses fenótipos e nos demais, não foi incomum a ocorrência deles de forma isolada ou concomitantemente ao longo do período.

Foi observado um aumento nas CIM para os carbapenêmicos e polimixina (POL) quando comparados com dados anteriores relatados na literatura. Além disso, destacamos o relato de amostras não sensíveis a polimixina (PANSP), ocorrendo em 78% dos pacientes; esse é o primeiro relato de amostras PANSP descrito em FC no Brasil.

A minoria das amostras foi classificada como hipermutável e mais da metade eram XDR. Em um terço dos pacientes, amostras HPM foram detectadas em pelo menos dois momentos, ao longo do estudo, com em intervalos de tempo variáveis.

A associação entre hipermutabilidade e aumento da taxa de resistência antimicrobiana foi observada. Quando comparadas a população selvagem com sua respectiva subpopulação, foram observadas diferenças na susceptibilidade aos antimicrobianos, principalmente para ciprofloxacina e DOR. Não houve diferença na categorização entre as duas populações para POL.

O sequenciamento de genoma total realizado nas seis amostras dos morfotipos não-mucoide, mucoide e *small colony variant* (SCV), recuperadas em dois episódios de

exacerbação, caracterizou um novo ST (ST2744) comum a todas as amostras. A presença de genes de resistência adquiridos *bla*_{PAO}, *bla*_{OXA-50}, *aph (3')-Iib*, *fosA*, *catB7* e *crpP*, e ainda mutações em genes para porinas e bombas de efluxo foi também detectada.

Não foram observados marcadores genéticos clássicos exclusivos para os fenótipos SCV e HPM.

O primeiro caso de SCV em *P. aeruginosa* recuperadas de pacientes com FC no Brasil foi descrito nesse trabalho.

Os dados apresentados nesse estudo reforçam a necessidade da vigilância epidemiológica em *P. aeruginosa*, justificando o uso de técnicas fenotípicas e moleculares na detecção dos mecanismos de resistência e virulência na FC, que podem contribuir para a conduta e sucesso terapêutico.

REFERÊNCIAS

- AARON, S.D. et al. Combination antibiotic susceptibility testing to treat exacerbations of cystic fibrosis associated with multiresistant bacteria: a randomised, double-blind, controlled clinical trial. *Lancet*, v. 366, p. 463-471, 2005. DOI:10.1016/S0140-6736(05)67060-2.
- AARON, S.D. et al. Infection with transmissible strains of *Pseudomonas aeruginosa* and clinical outcomes in adults with cystic fibrosis. *JAMA*, v. 304, n. 19, p. 2145-53, 2010. DOI: 10.1001/jama.2010.1665.
- ABBY, S.S. et al. Identification of protein secretion systems in bacterial genomes. *Sci Rep.*, v. 6, p. 23080, 2016. DOI: 10.1038/srep23080.
- AGHAZADEH, M. et al. Role of efflux pumps: MexAB-OprM and MexXY(-OprA), AmpC cephalosporinase and OprD porin in non-metallo- β -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis and burn patients. *Infect Genet Evol.*, v. 24, p. 187-192, 2014. DOI: 10.1186/s12866-016-0719-2.
- AHANGARZADEH-REZAEI, M. et al. In vitro activity of imipenem and ceftazidime against mucoid and non-mucoid strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients in Iran. *Arch Iran Med.*, v. 5, n. 4, p. 251-254, 2002.
- AL AHMAR, R. et al. Pyrimidine Biosynthesis Regulates the Small-Colony Variant and Mucoidity in *Pseudomonas aeruginosa* through Sigma Factor Competition. *Journal of Bacteriology*, v. 201, n. 1, e00575-182018, 2019. DOI: 10.1128/JB.00575-18.
- AL-ALOUL, M. et al. Increased morbidity associated with chronic infection by an epidemic *Pseudomonas aeruginosa* strain in CF patients. *Thorax*, v. 59, n. 4, p. 334-62004, 2003. DOI: 10.1136/thx.2003.014258.
- ALMEIDA, M.M. et al. Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Chronic Lung Infection: Current Resistance Profile and Hypermutability in Patients with Cystic Fibrosis. *Curr Microbiol.*, 2021. DOI: 10.1007/s00284-020-02337-0.
- AMBROA, A. et al. Temperate Bacteriophages (Prophages) in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Belonging to the International Cystic Fibrosis Clone (CC274). *Front Microbiol.*, v. 11:556706, 2020. DOI: 10.3389/fmicb.2020.556706.
- ANDERSEN, D.H. Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: a clinical and pathological study. *Am J Dis Child*, v. 56, n. 344, p. 991938, 1938.
- ANDERSSON, D.I.; HUGHES, D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat Rev Microbiol.*, v. 8, p. 260-271, 2010. DOI: 10.1038/nrmicro2319.
- ARAÚJO LIMA, A.V. et al. Occurrence and Diversity of Intra- and Interhospital Drug-Resistant and Biofilm-Forming *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Drug Resist.*, v. 26, n. 7, p. 802-814, 2020. DOI: 10.1089/mdr.2019.0214.

ARMSTRONG, D. et al. Evidence for Spread of a Clonal Strain of *Pseudomonas aeruginosa* among Cystic Fibrosis Clinics. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 41, p. 2266–2267, 2003. DOI: 10.1128/jcm.41.5.2266-2267.2003.

ATHANAZIO, R.A. et al. Grupo de Trabalho das Diretrizes Brasileiras de Diagnóstico e Tratamento da Fibrose Cística. *Brazilian guidelines for the diagnosis and treatment of cystic fibrosis. J Bras Pneumol.*, v. 43, n. 3, p. 219-245, 2017. DOI: 10.1590/S1806-37562017000000065.

AZAM, M.W.; KHAN, A.U. Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. *Drug Discov.*, v. 24, n. 1, p. 350-359, 2019. DOI:10.1016/j.drudis.2018.07.003.

BANKEVICH, A. et al. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *Journal Of Computational Biology*. 24(1):350-359, 2012. DOI:10.1089/cmb.2012.0021.

van BELKUM, A. et al. Phylogenetic distribution of CRISPR-Cas Systems in Antibiotic-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *MBio.*, v. 6, p. 1–13, 2015. DOI: 10.1128/mBio.01796-15.

BHAGIRATH, A.Y. et al. Cystic fibrosis lung environment and *Pseudomonas aeruginosa* infection. *BMC Pulmonary Medicine*, v. 16, n. 174, 2016. DOI 10.1186/s12890-016-0339-5.

BIALVAEI, A.Z.; KAFIL, S.H. Colistin, mechanisms and prevalence of resistance. *Curr Med Res Opin.*, v. 31, n. 4, p. 707-21, 2015. DOI: 10.1185/03007995.2015.1018989. Epub 2015 Mar 19.

BIANCONI, I. et al. Comparative genomics and biological characterization of sequential *Pseudomonas aeruginosa* isolates from persistent airways infection. *BMC Genomics*, v. 16, n.1105, 2015. DOI: 10.1186/s12864-015-2276-8.

BIANCONI, I. et al. Persistence and Microevolution of *Pseudomonas aeruginosa* in the Cystic Fibrosis Lung: A Single-Patient Longitudinal Genomic Study. *Front Microbiol.*, v. 9, n. 3242, 2019. DOI: 10.3389/fmicb.2018.03242.

BLANCHARD, A.C. et al. Effectiveness of a stepwise *Pseudomonas aeruginosa* eradication protocol in children with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.*, v. 16, n. 3, p. 395-400, 2017. DOI: 10.1016/j.jcf.2017.01.007.

BLANCHARD, A.C.; WATERS, V.J. Microbiology of Cystic Fibrosis Airway Disease. *Semin Respir Crit Care Med.*, v. 40, n. 6, p. 727-736, 2019. DOI: 10.1055/s-0039-1698464.

BLANKA, A. et al. Constitutive production of c-di-GMP is associated with mutations in a variant of *Pseudomonas aeruginosa* with altered membrane composition. *Sci Signal.*, v. 8, n. 372, p. ra36, 2015. DOI: 10.1126/scisignal.2005943.

BLOCK, J.K. et al. Predictors of pulmonary exacerbations in patients with cystic fibrosis infected with multi-resistant bacteria. *Thorax*, v. 61, p. 969–974, 2006. DOI: 10.1136/thx.2006.061366.

De BOECK, K.; AMARAL, M.D. Progress in therapies for cystic fibrosis. *Lancet Respir Med.*, v. 4, n. 8, p. 662-674, 2016. DOI: 10.1016/S2213-2600(16)00023-0.

BRAGA, F.S. et al. Genomic information on *Stenotrophomonas maltophilia* ST264 isolated from a cystic fibrosis pediatric patient in Brazil. *Braz J Microbiol.*, v. 51, n. 3, p. 1125-1127, 2020. DOI: 10.1007/s42770-019-00214-y.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 4: Procedimentos Laboratoriais: da requisição do exame à análise microbiológica e laudo final/Agência Nacional de Vigilância Sanitária.– Brasília: Anvisa, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Habilitar-se no Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) " Teste do Pezinho". 2019. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/45503-ministerio-da-saude-reforca-a-importancia-do-teste-do-pezinho-entre-o-3-e-5-dia-de-vida>. Acesso em: (09/01/2021).

BRETONNIÈRE, C. et al. MIC score, a new tool to compare bacterial susceptibility to antibiotics application to the comparison of susceptibility to different penems of clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antibiot.* (Tokyo), v. 69, n. 11, p. 806-810, 2016. DOI: 10.1038/ja.2016.38.

BURNS, J.L. et al. Comparison of agar diffusion methodologies for antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol.*, v. 38, n. 5, p.1818-22, 2000. DOI: 10.1128/JCM.38.5.1818-1822.2000.

BURROWES, E. et al. Influence of the regulatory protein RsmA on cellular functions in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, as revealed by transcriptome analysis. *Microbiology*, v. 152, p. 405–418, 2006. DOI 10.1099/mic.0.28324-0.

CABOT, G. et al. Evolution of *Pseudomonas aeruginosa* Antimicrobial Resistance and Fitness under Low and High Mutation Rates. *Antimicrob Agents Chemother.*, v. 60, n. 3, p. 1767-78 2016. DOI: 10.1128/AAC.02676-15.

CASSIN, E.K.; TSENG, B.S. Pushing beyond the envelope: the potential roles of OprF in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and pathogenicity. *J Bacteriol.* v. 201, n. 18, p. e00050-19, 2019. DOI:10.1128/JB .00050-19.

CASTANHEIRA, M. et al. Epidemiology and carbapenem resistance mechanisms of carbapenem-non-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* collected during 2009-11 in 14 European and Mediterranean countries. *J Antimicrob Chemother.*, v.69, p. 1804–1814, 2014. DOI: 10.1093/jac/dku048.

CASTELLANI, C. et al. Cystic fibrosis carrier screening effects on birth prevalence and newborn screening. *Genet Med.*, v. 18, n. 2, p. 145-51, 2016. DOI: 10.1038/gim.2015.68.

CHATTERJEE, M. et al. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and alternative therapeutic options. *Int J Med Microbiol.*, v. 306, n. 1, p. 48-58, 2016. DOI: 10.1016/j.ijmm.2015.11.004.

CHÁVEZ-JACOBO, V.M. et al. Prevalence of the *crpP* gene conferring decreased ciprofloxacin susceptibility in enterobacterial clinical isolates from Mexican hospitals. *J Antimicrob Chemother.*, v. 74, n. 5, p. 1253-1259, 2019. DOI: 10.1093/jac/dky562.

CHEVALIER, S. et al. Structure, function and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* porins. *Microbiol Rev.*, v. 41, n. 5, p. 698-722, 2017. DOI: 10.1093/femsre/fux020.

CHENG, K. et al. Spread of beta-lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a cystic fibrosis clinic. *Lancet*, v. 348, p. 639–642, 1996. DOI: 10.1016/S0140-6736(96)05169-0.

CHULIÁ, E.Z. *Diversidad de genes bacterianos relacionados con mecanismos de biocontrol em la rizosfera*. 2018. Dissertation, Universitat Oberta de Catalunya, España, 2004.

CIGANA, C. et al. Genotypic and phenotypic relatedness of *Pseudomonas aeruginosa* isolates among the major cystic fibrosis patient cohort in Italy. *BMC Microbiology*, v. 16, n. 142, 2016. DOI: 10.1186/s12866-016-0760-1.

CIOFU, O. et al. Occurrence of Hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis Patients Is Associated with the Oxidative Stress Caused by Chronic Lung Inflammation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 49, p. 2276–2282, 2005. DOI: 10.1128/AAC.49.6.2276-2282.2005.

CLINICAL AND FUNCTIONAL TRANSLATION OF CFTR. CFTR2 Variant List History. Disponível em: https://cftr2.org/mutations_history. Acesso em: 27/02/20201.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INTITUTE (CLSIa). Standards, Performance Testing, Antimicrobial Susceptibility. CLSI document M100. Wayne, P.A., 2020.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INTITUTE (CLSIb). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. CLSI document M02. Wayne, P.A., 2020.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INTITUTE (CLSIc). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. CLSI document M07. Wayne, P.A., 2020.

CLOKIE, M. R. et al. Phages in nature. *Bacteriophage*, v. 1, p. 31–45, 2011. DOI: 10.4161/bact.1.1.14942.

COENYE, T. et al. Taxonomy and identification of the *Burkholderia cepacia* complex. *J Clin Microbiol.*, v. 39, n. 10, p. 3427–36, 2001. DOI: 0.1128/JCM.39.10.3427-3436.2001.

COHEN, T.S.; PRINCE, A. Cystic fibrosis: a mucosal immunodeficiency syndrome. *Nat Med.*, v. 18, n. 4, p. 509-19, 2012. DOI: 10.1038/nm.2715.

COLQUE, C.A. et al. Hypermutator *Pseudomonas aeruginosa* Exploits Multiple Genetic Pathways To Develop Multidrug Resistance during Long-Term Infections in the Airways of Cystic Fibrosis Patients. *Antimicrob Agents Chemother.*, v. 64, n. 5, p. e02142-19, 2020 DOI: 10.1128/AAC.02142-19.

Da COSTA JÚNIOR, S.D. et al. Synergistic Effect between Usnic Acid and Polymyxin B against Resistant Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Evid Based Complement Alternat Med.*, v. 12, p. 9852145, 2020. DOI: 10.1155/2020/9852145.

COURTOIS, N.; CASPAR, Y.; MAURIN, M. Phenotypic and genetic resistance traits of *Pseudomonas aeruginosa* strains infecting cystic fibrosis patients: A French cohort study. *Int J Antimicrob Agents.*, v. 52, 3, p. 358-364, 2018. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2018.05.008.

CURRAN, B. et al. Development of a Multilocus Sequence Typing Scheme for the Opportunistic Pathogen *Pseudomonas aeruginosa* Development of a Multilocus. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, n. 12, p. 5644–5649, 2004. DOI: 10.1128/JCM.42.12.5644-5649.2004.

CUTHBERTSON, L. et al. Lung function and microbiota diversity in cystic fibrosis. *Microbiome*, v. 8, n. 1, p. 45, 2020. DOI: 10.1186/s40168-020-00810-3.

CUTTING, G.R. Cystic fibrosis genetics: from molecular understanding to clinical application. *Nat Rev Genet.*, v. 16, n. 1, p. 45-56, 2015. DOI: 10.1038/nrg3849.

CYSTIC Fibrosis Foundation Patient Registry (CFFPR). *Annual Data Report*, 2019. Disponível em: <www.cff.org>. Acesso em: (09/01/2021).

CYSTIC Fibrosis Mutation Database (CFMD): Statistics (*sickkids.on.ca*). *Currently mutations listed in this CFTR mutation database*. Disponível em: <www.genet.sickkids.on.ca>. Acesso em: (09/01/2021).

DAVIS, P.B. Cystic fibrosis since 1938. *Am J Respir Crit Care Med*, v.173, p. 475-82, 2006.

DAVIES, E.V. et al. Evolutionary diversification of *Pseudomonas aeruginosa* in an artificial sputum model. *BMC Microbiology*, v. 17, p. 3, 2017. DOI 10.1186/s12866-016-0916-z.

DENAMUR, E.; MATIC, I. Evolution of mutation rates in bacteria. *Mol Microbiol.*, v. 60, p. 820–827, 2006. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2006.05150.x.

DING, C. et al. Prevalence of *Pseudomonas aeruginosa* and antimicrobial-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in patients with pneumonia in mainland China: a systematic review and meta-analysis. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 49, p. 119–128, 2016. DOI: 10.1016/j.ijid.2016.06.014.

DITTRICH, A.M. Chronic *Pseudomonas aeruginosa* airway colonization in cystic fibrosis patients: Prevention concepts. *Internist. (Berl)*, v. 58, n. 11, p.1133-1141, 2017. DOI: 10.1007/s00108-017-0327-8.

DORING, G.; HOIBY, N. Consensus Study Group. Early intervention and prevention of lung disease in cystic fibrosis: a European consensus. *J Cyst Fibros.*, v. 3, p. 67–91, 2004. DOI: 10.1016/j.jcf.2004.03.008.

DORTET, L.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. *Future Microbiol.* v. 2, n. 5, p. 501–512, 2007. DOI: 10.2217/17460913.2.5.501.

DORTET, L.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Rapid identification of carbapenemase types in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas spp.* by using a biochemical test. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 56, n. 12, p. 6437–6440, 2012. DOI: 10.1128/AAC.01395-12.

DREIER, J.; RUGGERONE, P. Interaction of antibacterial compounds with RND efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol.*, v. 6, p. 660, 2015. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00660.

DRISCOLL, J.A.; BRODY, S.L.; KOLLEF, M.H. The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs*, v. 67, p. 351–368, 2007. DOI: 10.2165/00003495-200767030-00003.

ELBORN, J. S. Cystic fibrosis. *Lancet*. vol. 388, n. 10059, p. 2519-2531, 2016. DOI:10.1016/S0140-6736(16)00576-6.

EMIRALIOGLU, N. et al. The success of the different eradication therapy regimens for *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *J Clin Pharm Ther.*, v. 41, n. 4, p. 419-23, 2016. DOI: 10.1111/jcpt.12407.

ENGLAND, W.E.; KIM, T.; WHITAKER, R.J. Metapopulation structure of CRISPR-Cas immunity in *Pseudomonas aeruginosa* and its viruses. *mSystems.*, v. 3, p. e00075-18, 2018. DOI: 10.1128/mSystems.00075-18.

EREN, E. et al. Substrate specificity within a family of outer membrane carboxylate channels. *PLoS Biol.*, v. 10, p. e1001242, 2012. DOI: 0.1371/journal.pbio.1001242.

EREN, E. et al. Toward understanding the outer membrane uptake of small molecules by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem.*, v. 288, p. 12042–53, 2013. DOI: 10.1074/jbc.M113.463570.

ESTABROOKS, S.; BRODSKY JL. Regulation of CFTR Biogenesis by the Proteostatic Network and Pharmacological Modulators. *Int J Mol Sci.*, v. 21, n. 2, p. 452, 2020. DOI: 10.3390/ijms21020452.

FALAGAS, M.E.; RAFAILIDIS, P.I.; MATTHAIIOU, D.K. Resistance to polymyxins: mechanisms, frequency and treatment options. *Drug Resist Updates*, v. 13, p. 132-8, 2010. DOI: 10.1016/j.drug.2010.05.002.

FANCONI, G.; UEHLINGER, E.; KNAUER, C. Das coeliakiesyndrombe: Angeborener zystischer pancreas fibromatose und bronkiektasien. *Wien Med Wochenschr.*,v. 86, p. 753, 1936.

FANEN, P.; WOHLHUTER-HADDAD, A.; HINZPETER, A. Genetics of cystic fibrosis: CFTR mutation classifications toward genotype-based CF therapies. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 52, p. 94–102, 2014. DOI:10.1016/j.biocel.2014.02.023

FARRELL, P.M. The prevalence of cystic fibrosis in the European Union. *J Cyst Fibros.*, v. 7, n. 5, p. 450-3, 2008. DOI: 10.1016/j.jcf.2008.03.007.

FELIZIANI, S. et al. Mucoidy, quorum sensing, mismatch repair and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis chronic airways infections. *PLoS One*, v. 5, n. 9, p. e12669, 2010. DOI: 10.1371/journal.pone.0012669.

FELIZIANI, S. et al. Coexistence and within-host evolution of diversified lineages of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in long-term cystic fibrosis infections. *PLoS Genet.*, v. 10, n. 10, p. e1004651, 2014. DOI: 10.1371/journal.pgen.1004651.

FÉREC, C.; SCOTET, V. Genetics of cystic fibrosis: Basics. *Arch Pediatr.*, v. 27 Suppl 1, p. eS4-eS7, 2020. DOI: 10.1016/S0929-693X(20)30043-9.

FERREIRA, A.G. et al. Influence of biofilm formation in the susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* from Brazilian patients with cystic fibrosis. *APMIS*, v. 118, n. 8, p. 606-12, 2010. DOI: 10.1111/j.1600-0463.2010.02636.x.

FERREIRA, A.G. et al. Low-level resistance and clonal diversity of *Pseudomonas aeruginosa* among chronically colonized cystic fibrosis patients. *APMIS*, v. 123, p. 1061–1068, 2015. DOI: 10.1111/apm.12463.

FILHO, L.V.R.F.S. et al. Infecção por *Pseudomonas aeruginosa* em pacientes com fibrose cística: evidências científicas sobre o impacto clínico, diagnóstico e tratamento. *J Bras Pneumol.*, v. 39, n. 4, 2013.

FILKINS, L.M.; O'TOOLE, G.A. Cystic Fibrosis Lung Infections: Polymicrobial, Complex, and Hard to Treat. *PLoS Pathog.*, v. 11, n. 12, p. e1005258, 2015 DOI: 10.1371/journal.ppat.1005258.

FIRMIDA, M. C. Fisiopatologia e Manifestações Clínicas da Fibrose Cística. *Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto*, UERJ. 2011.

FISHEL, R. Mismatch repair, molecular switches, and signal transduction. *Genet Dev.*, v. 12, p. 2096–2101, 1998. DOI: 10.1101/gad.12.14.2096.

FITO-BONCOMPTE, L. et al. Full virulence of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprF. *Infect Immun.*, 2011. DOI: 10.1128/IAI.00850-10.

FOLESCU, T.W. et al. *Burkholderia cepacia* complex: clinical course in cystic fibrosis patients. *BMC Pulm Med.*, v. 15, p. 158, 2015. DOI: 10.1186/s12890-015-0148-2.

FUKUI, K. DNA mismatch repair in eukaryotes and bacteria. *J Nucleic Acids*, v. 2010, 2010. DOI: 10.4061/2010/260512.

GALES, A.C. et al. Comparação das atividades antimicrobianas de meropenem e imipenem/cilastatina: o laboratório necessita testar rotineiramente os dois antimicrobianos? *Rio de Janeiro*, v. 38, n. 1, p. 13-20, 2002.

GALES, A.C.; JONES, R.N.; SADER, H.S. Contemporary activity of colistin and polymyxin B against a worldwide collection of Gram-negative pathogens: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006–09). *J Antimicrob Chemother.*, v. 66, p. 2070-4, 2011. DOI: 10.1093/jac/dkr239.

GASPAR, M.C. et al. *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis lung disease and new perspectives of treatment: a review. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, v. 32, p. 1231–1252, 2013. DOI: 10.1007/s10096-013-1876-y.

GERMONI, L.A.; BREMER, P.J.; LAMONT, I.L. The effect of alginate lyase on the gentamicin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in mucoid biofilms. *J Appl Microbiol.*, v. 121, n. 1, p. 126-35, 2016 DOI: 10.1111/jam.13153.

GHEQUIRE, M.G.K.; ÖZTÜRK, B. A Colicin M-Type Bacteriocin from *Pseudomonas aeruginosa* Targeting the HxuC Heme Receptor Requires a Novel Immunity Partner. *Appl Environ Microbiol.*, v. 84, n. 18, p. e00716-18, 2018. DOI: 10.1128/AEM.00716-18.

GIANOTTI, A. et al. Small Molecule Anion Carriers Correct Abnormal Airway Surface Liquid Properties in Cystic Fibrosis Airway Epithelia. *Int J Mol Sci.*, v. 21, n. 4, p. 1488, 2020. DOI: 10.3390/ijms21041488.

GIBSON, R.L. et al. Significant microbiological effect of inhaled tobramycin in young children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.*, v. 167, n. 6, p. 841-9, 2003. DOI: 10.1164/rccm.200208-855OC.

GLOAG, E.S. et al. *Pseudomonas aeruginosa* Interstrain Dynamics and Selection of Hyperbiofilm Mutants during a Chronic Infection. *mBio.*, 2019. DOI: 10.1128/mBio.01698-19.

GNIADEK, T.J.; CARROLL, K.C.; SIMNER, P.J. Carbapenem-resistant non- glucose-fermenting Gram-negative bacilli: the missing piece to the puzzle. *J Clin Microbiol.*, v. 54, p. 1700–1710, 2016. DOI: 10.1128/JCM.03264-15.

GOETZ, D.; REN, C. L. Review of Cystic Fibrosis. *Pediatric annals*, v. 48, n. 4, p. e154-e161, 2019. DOI:10.3928/19382359-20190327-01.

GOSS, C.H.; MUHLEBACH, M.S. Review: *Staphylococcus aureus* and MRSA in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.*, v. 10, n. 5, p. 298–306, 2011. DOI: 10.1016/j.jcf.2011.06.002.

von GÖTZ, F. et al. Expression Analysis of a Highly Adherent and Cytotoxic Small Colony Variant of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from a Lung of a Patient with Cystic Fibrosis. *Journal of Bacteriology*, p. 3837–3847, 2004. DOI: 10.1128/JB.186.12.3837–3847.

GOVAN, J.R.W.; DERETIC, V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev.*, v. 60, p. 539–574, 1996. PMID: 8840786 PMCID: PMC239456.

GOVAN, J.R.W.; BROWN, A.R.; JONES, A. M. Evolving epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* and the *Burkholderia cepacia* complex in cystic fibrosis lung infection. *Future Microbiology*, v. 2, n. 2, p. 153-64, 2007. DOI:10.2217/17460913.2.2.153.

HAMMAMI, S. et al. Mechanisms of carbapenem resistance in non-metallo-beta-lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from a Tunisian hospital. *Pathol Biol (Paris)*, v. 57, n. 7-8, p. 530-5, 2009. DOI: 10.1016/j.patbio.2008.09.001.

HEIJERMAN, H. Infection and inflammation in cystic fibrosis: A short review. *Journal of Cystic Fibrosis, European Cystic Fibrosis Society*, v. 4, n. 2(supl), p. 3–5, 2005. DOI 10.1016/j.jcf.2005.05.005.

HERMES, D.M. et al. Evaluation of heteroresistance to polymyxin B among carbapenem-susceptible and -resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol.*, v. 62, p. 1184–1189, 2013. DOI: 10.1099/jmm.0.059220-0.

HICKMAN, J.W.; TIFREA, D.F.; HARWOOD, C.S. A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 102, p. 14422-7, 2005. DOI: 10.1073/pnas.0507170102.

HICKMAN, J.W.; HARWOOD, C.S. Identification of FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* as a c-di-GMP-responsive transcription factor. *Mol Microbiol.*, v. 69, p. 376–389, 2008. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2008.06281.x.

HOGARDT, M. J. Pitfalls of polymyxin antimicrobial susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients. *J Antimicrob Chemother.*, v. 54, n. 6, p. 1057-61, 2004. DOI: 10.1093/jac/dkh470.

HOGARDT, M.; HEESEMANN, J. Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during persistence in the cystic fibrosis lung. *Int J Med Microbiol.*, v. 300, p. 557–562, 2010. DOI: 10.1016/j.ijmm.2010.08.008.

HONG, DJ. et al. Epidemiology and Characteristics of Metallo- β -Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Chemother.*, v. 47, n. 2, p. 81-97, 2015. DOI: 10.3947/ic.2015.47.2.81.

Infectious Diseases Society of America (IDSA); SPELLBERG, B. et al. Combating antimicrobial resistance: policy recommendations to save lives. *Clin. Infect. Dis.*, v. 52 (Supl 5), p. 397–S428, 2011. DOI: 10.1093/cid/cir153.

IRIE, Y. et al. *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix polysaccharide Psl is regulated transcriptionally by RpoS and post-transcriptionally by RsmA. *Mol Microbiol.*, v. 78, p. 158–172, 2010. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2010.07320.x.

JANI, M.; MATHEE, K.; AZAD, R.K. Identification of Novel Genomic Islands in Liverpool Epidemic Strain of *Pseudomonas aeruginosa* Using Segmentation and Clustering. *Front Microbiol.*, v. 7, p. 1210, 2016. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01210.

JEANNOT, K.; BOLARD, A.; PLÉSIAT, P. Resistance to polymyxins in Gram-negative organisms. *Int J Antimicrob Agents.*, v. 49, n. 5, p. 526-535, 2017. DOI:10.1016/j.ijantimicag.2016.11.029.

JELSBAK, L. et al. Molecular epidemiology and dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* populations in lungs of cystic fibrosis patients. *Infect Immun.*, v. 75:2214-24, 2007. DOI: 10.1128/IAI.01282-06.

JONES, A.M. et al. Spread of a multiresistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* in an adult cystic fibrosis clinic. *Lancet*, v. 358, p. 557–558, 2001. DOI: 10.1016/s0140-6736(01)05714-2.

KALFERSTOVA, L. et al. How and why to monitor *Pseudomonas aeruginosa* infections in the long term at a cystic fibrosis centre. *J Hosp Infect.*, v. 92, p. 54–60, 2016. DOI: 10.1016/j.jhin.2015.09.010.

KEREM, B. et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science*, v. 245, n. 4922, p. 1073-1080, 1989. DOI: 10.1126/science.2570460

KHAN, M. et al. Antibiotic Resistance Characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Keratitis in Australia and India. *Antibiotics* (Basel), v. 9, n. 9, p. 600, 2020. DOI: 10.3390/antibiotics9090600.

KHIL, P.P. et al. Dynamic Emergence of Mismatch Repair Deficiency Facilitates Rapid Evolution of Ceftazidime-Avibactam Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Acute Infection. *mBio.*, 2019. DOI: 10.1128/Mbio.01822-19.

KLOCKGETHER, J. et al. *Pseudomonas aeruginosa* genomic structure and diversity. *Front Microbiol.*, v. 2, p. 150, 2011. DOI: 10.3389/fmicb.2011.00150.

KÖHLER, T. et al. Carbapenem activities against *Pseudomonas aeruginosa*: respective contributions of OprD and efflux systems. *Antimicrob Agents Chemother.*, v. 43, n. 2, p. 424-7, 1999. DOI: 10.1128/aac.43.2.424.

KOONIN, E.V.; WOLF, Y.I. Evolution of microbes and viruses: a paradigm shift in evolutionary biology? *Frontiers in Cellular And Infection Microbiology*, 2012. DOI: 10.3389/fcimb.2012.00119.

KOS, V.N.; MCLAUGHLIN, R.E.; GARDNER, H.A. Identification of unique in-frame deletions in OprD among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Pathog Dis.*, v. 74, n. 4, p. ftw031, 2016. DOI: 10.1093/femspd/ftw031.

KOUDA, S. et al. Increased prevalence and clonal dissemination of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with the blaIMP-1 gene cassette in Hiroshima. *J Antimicrob Chemother.*, v. 64, p. 46–51, 2009. DOI:10.1093/jac/dkp142.

KRESSE, A.U. et al. Impact of large chromosomal inversion on the adaptation and evolution of *Pseudomonas aeruginosa* chronically colonizing cystic fibrosis lungs. *Mol Microbiol.*, v. 47, p. 145–158, 2003. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2003.03261.x

KRIENGKAUYKIAT, J. et al. Use of an efflux pump inhibitor to determine the prevalence of efflux pump-mediated fluoroquinolone resistance and multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.*, v. 49, n. 2, p. 565-70, 2005. DOI: 10.1128/AAC.49.2.565-570.2005.

LANDERSDORFER, C.B. et al. Optimization of a Meropenem-Tobramycin Combination Dosage Regimen against Hypermutable and Nonhypermutable *Pseudomonas aeruginosa* via Mechanism-Based Modeling and the Hollow-Fiber Infection Model. *Antimicrob Agents Chemother.*, v. 62, n. 4, p. e02055-17, 2018. DOI: 10.1128/AAC.02055-17.

LAW, N. et al. Successful adjunctive use of bacteriophage therapy for treatment of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection in a cystic fibrosis patient. *Case Reports Infection.*, v. 47, n. 4, p. 665-668, 2019. DOI: 10.1007/s15010-019-01319-0.

LEÃO, R.S. O sistema de reparo do DNA em *Pseudomonas aeruginosa*: caracterização molecular e ocorrência natural de mutantes. 2009. 166 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

LEÃO, R.S. et al. Comparison of the worldwide transmissible *Pseudomonas aeruginosa* with isolates from brazilian cystic fibrosis patients. *Braz J Microbiol.*, v. 41, n. 4, p. 1079–1081, 2010. DOI: 10.1590/S1517-838220100004000028.

LEÃO, R.S. et al. KPC-2 Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from patients with Cystic Fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*, v. 10, p. 140–142, 2011b. DOI: 10.1016/j.jcf.2010.12.003.

LEE, B. et al. Heterogeneity of Biofilms Formed by Nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Patients with Cystic Fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 10, p. 5247–5255, 2005. DOI: 10.1128/JCM.43..

LEE, J. et al. Epidemiology and clinical features of community-onset bacteremia caused by extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Microb Drug Resist.*, v. 17, p. 267–273, 2011. DOI: 10.1089/mdr.2010.0134.

LEE, J.; ZHANG, L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell.*, p. 26–41, 2015. DOI: 10.1007/s13238-014- 0100-x.

LEE, K.; YOON, S.S. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm, a Programmed Bacterial Life for Fitness. *J Microbiol Biotechnol.*, v. 27, n. 6, p. 1053-1064, 2017. DOI: 10.4014/jmb.1611.11056.

LI, Y. et al. Characterization by phenotypic and genotypic methods of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with cystic fibrosis. *Molecular Medicine Reports*, v. 11, p. 494-498, 2015. DOI: 10.3892/mmr.2014.2685.

LI, X.Z.; PLÉSIA, T. P.; NIKAIDO, H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clin. Microbiol.*, v. 2015. DOI: 10.1128/cmr.00117-14.

LIA, H. et al. Structure and function of OprD protein in *Pseudomonas aeruginosa*: From antibiotic resistance to novel therapies. *Int J Med Microbiol.*, v. 302, n. 2, 2012. DOI:10.1016/j.ijmm.2011.10.001.

LISTER, P.D.; WOLTER, D.J.; HANSON, N.D. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev.*, v. 22, p. 582–610, 2009. DOI: 10.1128/CMR.00040-09.

LIVERMORE, D. M. Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. *J Antimicrob Chemother.*, v. 47, n. 3, p. 247-50, 2001. DOI: 10.1093/jac/47.3.247.

LIVERMORE, D.M. Are susceptibility tests enough, or should laboratories still seek ESBLs and carbapenemases directly? *J Antimicrob Chemother.*, v. 67, n. 7, p.1569-77, 2012. DOI: 10.1093/jac/dks088.

LOMOVSKAYA, O. et al. Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy. *Antimicrob Agents Chemother.*, v. 45, p. 105–116, 2001. DOI: 10.1128/AAC.45.1.105-116.2001.

LÓPEZ-CAUSAPÉ, C. et al. Clonal Dissemination, Emergence of Mutator Lineages and Antibiotic Resistance Evolution in *Pseudomonas aeruginosa* Cystic Fibrosis Chronic Lung Infection. *PLoS One*, v. 8, p. 1–8, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0071001.

LÓPEZ-CAUSAPÉ, C. et al. Antibiotic resistance and population structure of cystic fibrosis *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a Spanish multi-centre study. *Int J Antimicrob Agents.*, v. 50, n. 3, p. 334-341, 2017. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2017.03.034.

LU, B.; LEONG, H.W. Computational methods for predicting genomic islands in microbial genomes. *PLoS One*, v. 14, p. 200-206, 2016. DOI: 10.1016/j.csbj.2016.05.001.

LUBAMBA, B. et al. Cystic fibrosis: Insight into CFTR pathophysiology and pharmacotherapy. *Clinical Biochemistry (Belgium)*, v. 45, n. 15, p. 1132–1144, 2012. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2012.05.034.

LUCCA, F. et al. Antibiotic resistance evolution of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients (2010-2013). *The Clinical Respiratory Journal*, v. 12, n. 7, p. 2189-2196, 2018. DOI:10.1111/crj.12787.

LUJAN, A.M. et al. Quorum-sensing-deficient (*lasR*) mutants emerge at high frequency from a *Pseudomonas aeruginosa mutS* strain. *Microbiology*, v. 153, p. 225–237, 2007. DOI: 10.1099/mic.0.29021-0.

LUJÁN, A.M. et al. Evolution and adaptation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms driven by mismatch repair system-deficient mutators. *PLoS One*, v. 6, n. 11, p. e27842, 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0027842.

LUND-PALAU, H. *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis: pathophysiological mechanisms and therapeutic approaches. *Expert Rev Respir Med.*, v. 10, n. 6, p. 685-97, 2016. DOI: 10.1080/17476348.2016.1177460.

LUPO, A.; HAENNI, M.; MADEC, J.Y. Antimicrobial Resistance in *Acinetobacter spp.* and *Pseudomonas spp.* *Microbiol Spectr.*, 2018. DOI: 10.1128/microbiolspec.

- LUTZ, L. et al. Hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients from two Brazilian cities. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 51, p. 927–930, 2013. DOI: 10.1128/JCM.02638-12.
- MACIÁ, M. D. et al. Detection and Susceptibility Testing of Hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* Strains with the Etest and Disk Diffusion. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 48, n. 7, p. 2665–2672, 2004. DOI: 10.1128/AAC.48.7.2665-2672.2004.
- MACIÁ, M.D. et al. Hypermutation is a key factor in development of multiple-antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains causing chronic lung infections. *Antimicrob Agents Chemother.*, v. 49, p. 3382–3386, 2005. DOI: 10.1128/AAC.49.8.3382-3386.2005.
- MAGIORAKOS, A.P. et al. 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, p. 268–281, 2012. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.
- MAHMOUD, A. et al. Prevalence of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in patients with nosocomial infections at a University hospital in Egypt, with special reference to typing methods. *Journal of Virology & Microbiology*, p. 1–13, 2013. DOI: 10.5171/2013.290047.
- MALONE, J.G. et al. YfiBNR mediates cyclic di- GMP dependent small colony variant formation and persistence in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathog.*, 2010. DOI: 10.1371/journal.ppat.1000804.
- MALONE, J.G. et al. The YfiBNR signal transduction mechanism reveals novel targets for the evolution of persistent *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis airways. *PLoS Pathog.*, 2012. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002760.
- MALONE, J.G. Role of small colony variants in persistence of *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis lungs. *Infect Drug Resist.*, v. 8, p. 237-47, 2015. DOI: 10.2147/IDR.S68214.
- MANDSBERG, L.F. et al. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains with increased mutation frequency due to inactivation of the DNA oxidative repair system. *Antimicrob Agents Chemother.*, v. 53, p. 2483–2491, 2009. DOI: 10.1128/AAC.00428-08.
- MARQUES, E. A. Perfil Microbiológico na Fibrose Cística. *Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto* (Brasil), v. 10, n. 4, p. 23–35, 2011.
- MARRAFFINI, L.A. CRISPR-Cas immunity in prokaryotes. *Nature*, v. 526, 55–61, 2015. DOI: 10.1038/nature15386.
- MARTINEZ, J.L. et al. Beyond serial passages: new methods for predicting the emergence of resistance to novel antibiotics. *Curr Opin Pharmacol.*, v. 11, p. 439–445, 2011. DOI: 10.1016/j.coph.2011.07.005.
- MARTÍNEZ, J.A. Aproximación terapéutica dirigida tras el conocimiento del aislado: enterobacterias productoras de carbapenemasas, *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente y

- Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos. *Rev Esp Quimioter.*, v. Suppl 1, p. 31-4, 2016. PMID: 27608310.
- MARVIG, R. et al. Convergent evolution and adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* within patients with cystic fibrosis. *Nat Genet.*, v. 47, p. 57–64, 2015. DOI: 10.1038/ng.3148.
- MASEDA, H. et al. Variation of the mexT gene, a regulator of the MexEF-oprN efflux pump expression in wild-type strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett.*, v. 192, p. 107–112, 2000. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2000.tb09367.x.
- MATHEE, K. et al. Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* genome evolution. *Proc Natl Acad Sci. (USA)*, v. 105, n. 8, p. 3100–5, 2008. DOI: 10.1073/pnas.0711982105.
- MCCALLUM, N.; BERGER-BACCHI, B.; SENN, M.M. Regulation of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol.*, v. 300, n. 2-3, p.118-29, 2010. DOI: 10.1016/j.ijmm.2009.08.015.
- MCGINN, J.; MARRAFFINI, L.A. Molecular mechanisms of CRISPR–Cas spacer acquisition. *Nat Rev Microbiol.*, v. 17, p. 7–12, 2019. DOI: 10.1038/s41579-018-0071-7.
- MELETIS, G.; SKOURA, L. Polymyxin Resistance Mechanisms: From Intrinsic Resistance to Mcr Genes. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.*, v. 13, n. 3, p. 198-206, 2018. DOI: 10.2174/1574891X14666181126142704.
- MENA, A. et al. Inactivation of the Mismatch Repair System in *Pseudomonas aeruginosa* Attenuates Virulence but Favors Persistence of Oropharyngeal Colonization in Cystic Fibrosis Mice. *J Bacteriol.*, v. 189, n. 9, p. 3665–3668, 2007. DOI: 10.1128/JB.00120-07.
- MENA, A. et al. Genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients is catalysed by hypermutation. *Journal of Bacteriology*, v. 190, p. 7910–7917, 2008. DOI: 10.1128/JB.01147-08.
- MENG, X. et al. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and its stability. *Cell Mol Life Sci.*, v. 74, n. 1, p. 23-38, 2017. DOI: 10.1007/s00018-016-2386-8.
- MESAROS, N. et al. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clin. Microbiol. Infect.*, v. 13, p. 560–578, 2007. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2007.01681.x.
- MILLER, J.M. et al. A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clinical Infectious Diseases*, v. 67, n. 6, p. e1–e94, 2018. DOI:10.1093/cid/ciy381.
- MIRIAGOU, V. et al. Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. *Clin. Microbiol. Infect.*, v. 16, p. 112–122, 2010. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2009.03116.x.

MOSKOWITZ, S.M. et al. *PmrB* mutations promote polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from colistin-treated cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother.*, v. 56, n. 2, p. 1019-30, 2012. DOI: 10.1128/AAC.05829-11.

MUSTAFA, M-H. et al. Antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients in northern Europe. *Antimicrob Agents Chemother.*, v. 60, p. 6735–6741, 2016. DOI:10.1128/AAC.01046-16.

MUSTAFA, M-H. Acquired resistance to macrolides in *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients. *Eur Respir J.*, v. 49, n. 5, p. 1601847, 2017. DOI: 10.1183/13993003.01847-2016.

NAEHRIG, S.; CHAO, C.M.; NAEHRLICH, L. Cystic Fibrosis. *Dtsch Arztebl Int.*, v. 114, n. 33-34, p. 564-574, 2017. DOI: 10.3238/arztebl.2017.0564.

NEVES, P. R. et al. Multirresistência mediada por metalo-beta-lactamases, porinas, bombas de efluxo e metilases, em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. In: XI CONGRESSO Brasileiro de Controle de Infecção e Epidemiologia Hospitalar, Rio de Janeiro. *Braz J Infec Dis.*, v. 12, p. 30, 2008.

NEVES, P. R. et al. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. *J Bras Patol Med Lab.*, v. 47, n. 4, p. 409-420, 2011.

NUNES, L.M. et al. A new insight into CFTR allele frequency in Brazil through next generation sequencing. *Pediatr Pulmonol.*, v. 52, n. 10, p. 1300-1305, 2017. DOI: 10.1002/ppul.23774.

OCAMPO-SOSA, A.A. et al. Alterations of OprD in carbapenem-intermediate and -susceptible strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with bacteremia in a Spanish multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother.*, v. 56, n. 4, p. 1703-13, 2012. DOI: 10.1128/AAC.05451-11.

OCKENGA, J. Evaluation of the role of CFTR in alcohol related pancreatic disease. *Gut*, v. 49, p. 312-3, 2001.

OLIVARES, J. et al. Overproduction of the multidrug efflux pump MexEF-OprN does not impair *Pseudomonas aeruginosa* fitness in competition tests, but produces specific changes in bacterial regulatory networks. *Environmental Microbiology.*, 2012. DOI:10.1111/j.1462-2920.2012.02727.x.

OLIVER, A. et al. High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science*, v. 288, p. 1251–1254, 2000. DOI: 10.1126/science.288.5469.1251.

OLIVER, A.; BAQUERO, F.; BLÁZQUEZ, J. The mismatch repair system (*mutS*, *mutL* and *uvrD* genes) in *Pseudomonas aeruginosa*: molecular characterization of naturally occurring mutants. *Molecular Microbiology*, v. 43, p. 1641–1650, 2002. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2002.02855.x.

- OLIVER, A., et al. The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug Resistance Updates*, Spain, v. 21, n. 22, p. 41–59, 2015. DOI: 10.1016/j.drup.2015.08.002.
- ORSI, T.D’A. et al. Polymyxin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* assigned as ST245: First report in an intensive care unit in São Paulo, Brazil. 2019. *J Glob Antimicrob Resist.*, v. 16, p. 147-149, 2019. DOI: 10.1016/j.jgar.2018.12.021.
- OSKOWITZ, S.M. et al. Colistin susceptibility testing: evaluation of reliability for cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Antimicrob Chemother.*, v. 65, n. 7, p. 416-23, 2010. DOI: 10.1093/jac/dkq131.
- OWLIA, P. et al. Antimicrobial susceptibility differences among mucoid and non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *GMS Hyg Infect Control.*, 2014. DOI: 10.3205/dgkh000233.
- PAIXÃO, V.A. et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility of respiratory pathogens in patients with cystic fibrosis. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 14, p. 406–409, 2010. PMID: 20963328.
- PAMUKCU, A.; BUSH, A.; BUCHDAHL, R. Effects of *Pseudomonas aeruginosa* colonization on lung function and anthropometric variables in children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.*, v. 19, n. 1, p. 10-5, 1995. DOI: 10.1002/ppul.1950190103.
- PANG, Z. et al. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol Adv.*, v. 37, n. 1, p. 177-192, 2019. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2018.11.013.
- PARK, Y.K. et al. Correlation between overexpression and amino acid substitution of the PmrAB locus and colistin resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Int J Antimicrob Agents*, v. 37, p. 525-30, 2011. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2011.02.008.
- PARKINS, M.D.; SOMAYAJI, R.; WATERS, V.J. Epidemiology, Biology, and Impact of Clonal *Pseudomonas aeruginosa* Infections in Cystic Fibrosis. *Clin Microbiol Rev.*, v. 31, n. 4, p. e00019-18, 2018. DOI: 10.1128/CMR.00019-18.
- PEARSON, J. P. et al. Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *J Bacteriol.*, v. 181, n. 4, p. 1203-10, 1999. PMCID: PMC93498. PMID: 9973347
- PEDERSEN, S.S. et al. An epidemic spread of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* in a cystic fibrosis centre. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 17, p. 505-516, 1986. DOI: 10.1093/jac/17.4.505.
- PEIXOTO, A. Lung ultrasound assessment of response to antibiotic therapy in cystic fibrosis exacerbations: a study of two cases. *J Bras Pneumol.*, v.45, n.6, 2019. DOI: 10.1590/1806-3713/e20190128.
- PEREIRA, R.H. et al. Patterns of virulence factor expression and antimicrobial resistance in *Achromobacter xylosoxidans* and *Achromobacter ruhlandii* isolates from patients with cystic

fibrosis. *Epidemiol Infect.*, v. 145, n. 3, p. 600-606, 2017. DOI: 10.1017/S0950268816002624.

PEREZ, L.R.; BARTH, A.L. Biofilm production using distinct media and antimicrobial susceptibility profile of *Pseudomonas aeruginosa*. *Braz J Infect Dis.*, v. 15, n. 4, p. 301-4, 2011. DOI: 10.1016/s1413-8670(11)70196-9.

PESTRAK, M.J. et al. *Pseudomonas aeruginosa* rugose small-colony variants evade host clearance, are hyper-inflammatory, and persist in multiple host environments. *PLoS Pathog.*, 2018. DOI: 10.1371/journal.ppat.1006842.

PETROVA, G. et al. Identification of 99% of CFTR gene mutations in Bulgarian-, Bulgarian Turk-, and Roma cystic fibrosis patients. *Mol Genet Genomic Med.*, v. 7, n. 8, p. e696, 2019. DOI: 10.1002/mgg3.696.

PETTIT, R.S.; FELLNER, C. CFTR Modulators for the Treatment of Cystic Fibrosis. *P T.*, v. 39, n. 7, p. 500-11, 2014.

POIREL, L.; PITOUT, J.D.; NORDMANN, P. Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. *Future Medicine Ltd.*, v. 2, n. 5, p. 501–512, 2007. DOI: 10.2217/17460913.2.5.501.

POOLE, K.; SRIKUMAR, R. Multidrug efflux in *Pseudomonas aeruginosa*: components, mechanisms and clinical significance. *Curr Top Med Chem.*, v. 1, p. 59–71, 2001. DOI:10.2174/1568026013395605.

POOLE, K. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Ann Med.*, v. 39, p. 162–176, 2007.

POOLE, K. *Pseudomonas aeruginosa* : resistance to the max. *Front Microbiol.*, v. 2, p. 65, 2011. DOI: 10.3389/fmicb.2011.00065.

POTRON, A.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. *Int J Antimicrob Agents.*, v. 45, p. 568–585, 2015. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2015.03.001.

QUEENAN, A.M.; BUSH, K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.*, v. 20, n. 3, p. 440-58, 2007. DOI: 10.1128/CMR.00001-07.

QIU, X.; KULASEKARA, B.R.; LORY, S. Role of Horizontal Gene Transfer in the Evolution of *Pseudomonas aeruginosa* Virulence. *Genome Dyn.*, v. 6, p. 126-139, 2009. DOI: 10.1159/000235767.

RADÓ, J. et al. Characterization of environmental *Pseudomonas aeruginosa* using multilocus sequence typing scheme. *Journal of Medical Microbiology*, v. 66, p. 1457–1466, 2017. DOI 10.1099/jmm.0.000589.

RAGUPATHI, D.K.N.; VEERARAGHAVAN, B. Accurate identification and epidemiological characterization of *Burkholderia cepacia* complex: an update. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.*, v. 18, n.7, 2019. DOI: 10.1186/s12941-019-0306-.

RAMSAY, K.A. et al. Infection in cystic fibrosis: impact of the environment and climate. *Expert Review of Respiratory Medicine*, 2016. DOI: 10.1586/17476348.2016.116271.

RASKIN, S. et al. Incidence of cystic fibrosis in five different states of Brazil as determined by screening of p. F508del, mutation at the CFTR gene in newborns and patients. *J Cyst Fibros.*, v.7, n. 1, p. 15-22, 2008. DOI: 10.1016/j.jcf.2007.03.006.

RATJEN, F.; DÖRING, G.; NIKOLAIZIK, W.H. Effect of inhaled tobramycin on early *Pseudomonas aeruginosa* colonisation in patients with cystic fibrosis. *Lancet*, v. 358, n. 9286, p. 983-4, 2001. DOI: 10.1016/S0140-6736(01)06124-4.

RATJEN, F.; DÖRING, G. Cystic fibrosis. *Lancet*, v. 361, p. 681–689, 2003. DOI: 10.1016/S0140-6736(03)12567-6.

RATJEN, F. Cystic fibrosis: pathogenesis and future treatment strategies. *Respir Care.*, v. 54, n. 5, p. 595-605, 2009. DOI: 10.4187/aarc0427.

REES, V.E. et al. Meropenem Combined with Ciprofloxacin Combats Hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* from Respiratory Infections of Cystic Fibrosis Patients. *Antimicrob Agents Chemother.*, v. 62, n. 11, p. e01150-18, 2018. DOI: 10.1128/AAC.01150-18.

REES, V.E. et al. Characterization of Hypermutator *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Patients with Cystic Fibrosis in Australia. *Antimicrob Agents Chemother.*, v. 63, n. 4, p. e02538-18, 2019. DOI: 10.1128/AAC.02538-18.

Registre Français de la Mucoviscidose (RFM). Bilan des données, 2017.

REKIS, N.; AMBROSE, M.; SAKON, C. Neurotoxicity in adult patients with cystic fibrosis using polymyxin B for acute pulmonary exacerbations. *Pediatr Pulmonol.*, v. 55, n. 5, p. 1094-1096, 2020. DOI: 10.1002/ppul.24727.

Relatório Anual do Registro Brasileiro de Fibrose Cística, 2018. Disponível em: < GBEFC - Grupo Brasileiro de Estudos de Fibrose Cística (portalgbecf.org.br)>.

REMOLD, S.K. et al. Differential habitat use and niche partitioning by *Pseudomonas* species in human homes. *Microb Ecol.*, v. 62, n. 3, p. 505-517, 2011.

REN, C.L. et al; Multiple antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and lung function decline in patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.*, v. 11, p. 293–299, 2012. DOI: 10.1016/j.jcf.2012.02.005

RIBEIRO, A.C.S. et al. *Pseudomonas aeruginosa* in the ICU: prevalence, resistance profile, and antimicrobial consumption. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 53, 2020. DOI: 10.1590/0037-8682-0498-2018.

RICHARDOT, C. et al. Carbapenem resistance in cystic fibrosis strains of *Pseudomonas aeruginosa* as a result of amino acid substitutions in porin OprD. *Int J Antimicrob Agents.*, v. 45, p. 529–32, 2015. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2014.12.029.

- RIERA, E. et al. *Pseudomonas aeruginosa* carbapenem resistance mechanisms in Spain: impact on the activity of imipenem, meropenem and doripenem. *J Antimicrob Chemother.*, v. 66, n. 9, p. 2022-7, 2011. DOI: 10.1093/jac/dkr232.
- ROBLEDO, I.E.; AQUINO, E.E.; VÁZQUEZ, G.J. Detection of the KPC gene in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* during a PCR-based nosocomial surveillance study in Puerto Rico. *Antimicrob Agents Chemother.*, v. 55, n. 6, p. 2968-70, 2011. DOI: 10.1128/AAC.01633-10.
- RODRIGUES, E.R. et al. Draft genome sequences of four *Achromobacter ruhlandii* strains isolated from cystic fibrosis patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*, v. 111(, n. 12, p. 777-780, 2016. DOI: 10.1590/0074-02760160130.
- RÖMLING, U. et al. Epidemiology of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *J Infect Dis.*, v. 170, p. 1616-21, 1994a. DOI: 10.1093/infdis/170.6.1616.
- RÖMLING, U. et al. A major *Pseudomonas aeruginosa* clone common to patients and aquatic habitats. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 60, p.1734–1738, 1994b. PMID: PMC201555.
- De ROSA, A. et al. Distribution of carbapenem resistance mechanisms in clinical isolates of XDR *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.*, v. 38, n. 8, p. 1547-1552, 2019. DOI: 10.1007/s10096-019-03585-0.
- ROSALES-REYES, R. et al. Draft Genome Sequence of a *Pseudomonas aeruginosa* Sequence Type 3351 Strain Exhibiting High-Level Resistance to Polymyxins in a Pediatric Patient with Cystic Fibrosis in Mexico. *Microbiol Resour Announc.*, v. 9, . 2, p. e01261-19, 2020. DOI: 10.1128/MRA.01261-19.
- RUTTER, W.C. et al. Increasing Incidence of Multidrug Resistance Among Cystic Fibrosis Respiratory Bacterial Isolates. *Microbial Drug Resistance*, v. 00, n. 00, 2017 . DOI: 10.1089/mdr.2016.0048.
- SABRA, W.; HADDAD, A.M.; ZENG, A.P. Comparative physiological study of the wild type and the small colony variant of *Pseudomonas aeruginosa* 20265 under controlled growth conditions. *World J Microbiol Biotechnol.*, v. 30, p. 1027–1036, 2014. DOI: 10.1007/s11274-013-1521-z.
- SALSGIVER, E.L. et al. Changing Epidemiology of the Respiratory Bacteriology of Patients with Cystic Fibrosis. *Chest*, v. 149, p. 390–400, 2016. DOI: 10.1378/chest.15-0676.
- SANTOS, I.A.; NOGUEIRA, J.M.; MENDONÇA, F.C. Mecanismos de resistência antimicrobiana em *Pseudomonas aeruginosa*. *RBAC.*, v. 47, n. 1-2, p. 4, 2015.
- SANTOS, B.A. et al. CRISPR elements and their association with antimicrobial resistance and virulence genes among vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible enterococci recovered from human and food sources. *Infect Genet Evol.*, v. 80, p. 104183, 2020. DOI: 10.1016/j.meegid.2020.104183.

- SCOTT, F.W.; PITT, T.L. Identification and characterization of transmissible *Pseudomonas aeruginosa* strains in cystic fibrosis patients in England and Wales. 2004. *Journal of Medical Microbiology*, v. 53, p. 609–615. DOI: 10.1099/jmm.0.45620-0.
- SCOTT, E. et al. Genomic Islands of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett.*, v. 290, n. 1, p. 70–78, 2008. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2008.01406.x.
- SHARMA, P. et al. Whole genome sequencing of bacteria in cystic fibrosis as a model for bacterial genome adaptation and evolution. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.*, v. 12, n. 3, p. 343–355, 2014. DOI: 10.1586/14787210.2014.887441.
- SHAWAR, R.M. et al. Activities of tobramycin and six other antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother.*, v. 43, n. 1, p. 2877–2880, 1999. DOI: 10.1128/AAC.43.12.2877.
- SILBERT, S.; BARTH, A.L.; SADER, H.S. Heterogeneity of *Pseudomonas aeruginosa* in Brazilian cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol.*, v. 39, p. 3976–81, 2001. DOI: 10.1128/JCM.39.11.3976-3981.2001.
- da SILVA FILHO, L. V. R. F. et al. Extensive CFTR sequencing through NGS in Brazilian individuals with cystic fibrosis: unravelling regional discrepancies in the country. *Journal of Cystic Fibrosis*, 2020. DOI: 10.1016/j.jcf.2020.08.007.
- SILVEIRA, M.C. et al. Exploring the success of Brazilian endemic clone *Pseudomonas aeruginosa* ST277 and its association with the CRISPR-Cas system type I-C. *BMC Genomics.*, v. 21, n. 255, 2020. DOI: 10.1186/s12864-020-6650-9.
- SMANIA, A.M. et al. Emergence of phenotypic variants upon mismatch repair disruption in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, v. 150, p. 1327–1338, 2004. DOI: 10.1099/mic.0.26751-0.
- SMITH, A.L. et al. Susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates and clinical response to parenteral antibiotic administration: lack of association in cystic fibrosis. *Chest*, v. 123, n. 5, p. 1495–502, 2003. DOI: 10.1378/chest.123.5.1495.
- SMITH, E.E. et al. Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *Proc Natl Acad Sci. (USA)*, v. 103, p. 8487–8492, 2006. DOI: 10.1073/pnas.0602138103.
- SMITH, W.D. et al. Current and future therapies for *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cystic fibrosis. *FEMS Microbiol Lett.*, v. 364, n. 14, 2017. DOI: 10.1093/femsle/fnx121. PMID: 28854668.
- SOMAYAJI, R. et al. Long-term clinical outcomes of ‘Prairie Epidemic Strain’ *Pseudomonas aeruginosa* infection in adults with cystic fibrosis. *Thorax*, v. 72, p. 333–339, 2017. DOI:10.1136/thoraxjnl-2015-208083.
- SOMMER, L.M. et al. Is genotyping of single isolates sufficient for population structure analysis of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis airways? *BMC Genomics*, v. 17, p. 589, 2016. DOI: 10.1186/s12864-016-2873-1.

- SRIFUENGFUNG, S. et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* mucoid and non-mucoid type. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.*, v. 35, n. 4, p. 893-6, 2004.
- STAFLE, P. et al. The impact of a national population carrier screening program on cystic fibrosis birth rate and age at diagnosis: Implications for newborn screening. *J Cyst Fibros.*, v. 15, p. 460-6, 2016. DOI: 10.1016/j.jcf.2015.08.007.
- STANKE, F.; TÜMMLER, B. Classification of CFTR mutation classes. *Lancet Respir Med.*, v. 4, n. 8, p. e36, 2016. DOI: 10.1016/S2213-2600(16)30147-3.
- STARKEY, M. et al. *Pseudomonas aeruginosa* rugose small-colony variants have adaptations that likely promote persistence in the cystic fibrosis lung. *J Bacteriol.*, v. 191, p. 3492–3503, 2009. DOI: 10.1128/JB.00119-09.
- STEFANI, S. et al. Relevance of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *Int J Med Microbiol.*, v. 307, n. 6, p. 353-362, 2017. DOI: 10.1016/j.ijmm.2017.07.004.
- SU, T. et al. The REC domain mediated dimerization is critical for FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* to function as a c-di-GMP receptor and flagella gene regulator. *Struct Biol.*, v. 192, p. 1-13, 2015. DOI: 10.1016/j.jsb.2015.09.002.
- SUBEDI, D. et al. Comparative genomics of clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from different geographic sites. *Sci Rep.*, v. 8, n. 1, p. 15668, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-34020-7.
- TAHMASEBIA, H.; DEHBASHIB, S.; ARABESTANIB, M.R. Co-harboring of *mcr-1* and β -lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* by high-resolution melting curve analysis (HRMA): Molecular typing of superbug strains in bloodstream infections (BSI). *Infection, Genetics and Evolution*, 2020. DOI: 10.1016/j.meegid.2020.104518.
- TAMBER, S.; OCHS, M.M.; HANCOCK, R.E. Role of the novel OprD family of porins in nutrient uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.*, v. 188, p. 45–54, 2006. DOI: 10.1128/JB.188.1.45-54.2006.
- TAN, K. et al. Sensor domain of histidine kinase KinB of *Pseudomonas*: a helix-swapped dimer. *J Biol Chem.*, v. 2014. DOI: 10.1074/jbc.M113.514836.
- TREGGIARI, M.M. et al. Comparative efficacy and safety of 4 randomized regimens to treat early *Pseudomonas aeruginosa* infection in children with cystic fibrosis. *Arch Pediatr Adolesc Med.*, v. 165, n. 9, p. 847-56, 2011. DOI: 10.1001/archpediatrics.2011.136.
- The Canadian Fibrosis Registry (CFR)*, 2017. Disponível em: <<https://www.cysticfibrosis.ca/registry/2017AnnualDataReport.pdf>>.
- VALENTE, A.M.M.P. et al. Atividade antibacteriana do ácido fenazina-1-carboxílico por *Pseudomonas sp.* (Mono49) isolada de Monostroma da Antártica. In: Congresso Brasileiro de

Microbiologia, 26, 2011, Brasil. Disponível em:

<<http://www.sigeventos.com.br/sbmicrobiologia/cdrom/resumos/R1883->>

VILA, J.; MARCO, F. Interpretive reading of the non-fermenting gram-negative bacilli antibiogram. *Enferm Infec Microbiol Clin.*, v. 28, n. 1, p. 726-36, 2010. DOI: 10.1016/j.eimc.2010.05.001.

VIAU, R. et al. Intestinal Carriage of Carbapenemase-Producing Organisms: Current Status of Surveillance Methods. *Clin Microbiol Rev.*, v. 29, n. 1, p. 1-27, 2016. DOI: 10.1128/CMR.00108-14.

WANG, G-Q. et al. Effect of negative pressure on proliferation, virulence factor secretion, biofilm formation, and virulence-regulated gene expression of *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. *Biomed Res Int.*, v. 2016, p. 7986234, 2016. DOI: 10.1155/2016/7986234.

WATERS, V.; GRIMWOOD, K. Defining chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros.*, v. 17, n. 3, p. 292-293, 2018. DOI: 10.1016/j.jcf.2018.03.007.

WHO. World Health Organization. The molecular genetic epidemiology of cystic fibrosis. Disponível em : <www.who.int/genomics/publications/reports/en/index.html>

WILLIAMS, D. et al. Divergent, coexisting *Pseudomonas aeruginosa* lineages in chronic cystic fibrosis lung infections. *Am J Respir Crit Care Med.*, 2015. DOI: 10.1164/rccm.201409-1646OC.

WINSTANLEY, C. et al. Newly introduced genomic prophage islands are critical determinants of in vivo competitiveness in the Liverpool epidemic strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Genome Res.*, v. 19, n. 1, p. 12–23, 2009. DOI: 10.1101/gr.086082.108.

WOLKOWICZ, T. et al. Distribution of carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* isolates among hospitalised children in Poland: Characterisation of two novel insertion sequences disrupting the oprD gene. *J Glob Antimicrob Resist.*, v. 7, p. 119-125, 2016. DOI: 10.1016/j.jgar.2016.08.007.

WOOLWINE, S.C.; WOZNIAK, D.J. Identification of an *Escherichia coli* pepA Homolog and Its Involvement in Suppression of the algB Phenotype in Mucoïd *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.*, v. 181, n. 1, p. 107–116, 1999. PMID: 9864319. PMID: 9864319.

WRIGHT, G.D. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Adv Drug Deliv Rev.*, v. 57, p. 1451-1470, 2005. DOI: 10.1016/j.addr.2005.04.002.

YONEYAMA, H. et al. Role of porins in the antibiotic susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa*: construction of mutants with deletions in the multiple porin genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 213, n. 1, p. 88-95, 1995. DOI: 10.1006/bbrc.1995.2102.

YORDANOV, S.T.D. *Pseudomonas aeruginosa*-a phenomenon of bacterial resistance. *J Med Microbiol.*, v. 58, n. 9, p. 113348, 2009. DOI: 10.1099/jmm.0.009142-0.

YOSHIHARA, E. et al (Identification of the catalytic triad of the protein D2 protease in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem Biophys Res Commun.*, 1998. DOI: 10.1006/bbrc.1998.8745

ZANKARI, E. et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother.*, v. 67, p. 2640–2644, 2012. DOI:10.1093/jac/dks261.

ZIĘTKIEWICZ, E. et al. CFTR mutations spectrum and the efficiency of molecular diagnostics in Polish cystic fibrosis patients. *PLoS One*, v. 9, n. 2, p. e89094, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0089094.

ZEMANICK, E. T.; HOFFMAN, L. R. Cystic Fibrosis: Microbiology and Host Response. *Pediatric Clinics of North America (USA)*, v. 63, n. 4, p. 617–636, 2016. DOI: 10.1016/j.pcl.2016.04.003.

APÊNDICE – Projetos de *Whole Genome Shotgun* depositados no *DDBJ/ENA/GenBank*

Projeto de *Whole Genome Shotgun* depositado no *DDBJ/ENA/GenBank* da amostra de *P. aeruginosa* 21107

26/07/2020

SUB6482601 - Summary | WGS | Submission Portal

National Center for Biotechnology Information



Submission Portal

[Home](#)
[My submissions](#)
[Templates](#)
[My profile](#)

Genome submission: SUB6482601

Pseudomonas aeruginosa isolated from sputum of cystic fibrosis patient

✓ BioProject: Processed

[PRJNA580445](#) : *Pseudomonas aeruginosa* genome sequencing (TaxID: 287)

Locus Tag Prefixes:

- GGB92

✓ BioSample: Processed

Successfully loaded

SAMN13158036 : Pa21107 (TaxID: 287)

✓ Genomes: Processed ([Details](#))

- [WUTK00000000](#)
- [21107_contigs.fsa](#)
- PGAP file
- 2 files:
 - [21107_contigs00000000.bgpipe.output.sqn](#)
 - [21107_contigs00000000.bgpipe.output.gb](#)
- p2g file
- [WUTK01.p2g](#)
- accessions list
- [WUTK01_accs](#)

Summary

This WGS submission will be released

immediately following processing.

To provide any necessary changes to submission at this stage, please email us.

[Ask for help](#)

Projeto de *Whole Genome Shotgun* depositado no *DDBJ/ENA/GenBank* da amostra de *P. aeruginosa* 21113

26/07/2020

SUB6482644 - Summary | WGS | Submission Portal

National Center for Biotechnology Information



Submission Portal

[Home](#)
[My submissions](#)
[Templates](#)
[My profile](#)

Genome submission: SUB6482644

Pseudomonas aeruginosa isolated from sputum of cystic fibrosis patient

✓ **BioProject: Processed**

[PRJNA580449](#) : *Pseudomonas aeruginosa* genome sequencing (TaxID: 287)

Locus Tag Prefixes:

- GGB94

✓ **BioSample: Processed**

Successfully loaded

SAMN13159202 : Pa21113 (TaxID: 287)

✓ **Genomes: Processed** ([Details](#))

- [WUTL00000000](#)
- [21113_contigs.fsa](#)
- PGAP file
- 2 files:
 - [21113_contigs00000000.bgpipe.output.sqn](#)
 - [21113_contigs00000000.bgpipe.output.gb](#)
- p2g file
- [WUTL01.p2g](#)
- accessions list
- [WUTL01_accs](#)

Summary

This WGS submission will be released

immediately following processing.

To provide any necessary changes to submission at this stage, please email us.

[Ask for help](#)

Projeto de *Whole Genome Shotgun* depositado no *DDBJ/ENA/GenBank* da amostra de *P. aeruginosa* 21114

26/07/2020

SUB6482712 - Summary | WGS | Submission Portal

National Center for Biotechnology Information



Submission Portal

[Home](#)
[My submissions](#)
[Templates](#)
[My profile](#)

Genome submission: SUB6482712

Pseudomonas aeruginosa isolated from sputum of cystic fibrosis patient

✓ BioProject: Processed

[PRJNA580450](#) : *Pseudomonas aeruginosa* genome sequencing (TaxID: 287)

Locus Tag Prefixes:

- GGB95

✓ BioSample: Processed

Successfully loaded

SAMN13159203 : Pa21114 (TaxID: 287)

✓ Genomes: Processed ([Details](#))

- [WUTM00000000](#)
[21114_contigs.fsa](#)
- PGAP file
2 files:
 - [21114_contigs00000000.bgpipe.output.sqn](#)
 - [21114_contigs00000000.bgpipe.output.gb](#)
- p2g file
[WUTM01.p2g](#)
- accessions list
[WUTM01_accs](#)

Summary

This WGS submission will be released

immediately following processing.

To provide any necessary changes to submission at this stage, please email us.

[Ask for help](#)

Projeto de *Whole Genome Shotgun* depositado no *DDBJ/ENA/GenBank* da amostra de *P. aeruginosa* 21167

26/07/2020

SUB6482714 - Summary | WGS | Submission Portal

National Center for Biotechnology Information



Submission Portal

[Home](#)
[My submissions](#)
[Templates](#)
[My profile](#)

Genome submission: SUB6482714

Pseudomonas aeruginosa isolated from sputum of cystic fibrosis patient

✓ BioProject: Processed

[PRJNA580453](#) : *Pseudomonas aeruginosa* genome sequencing (TaxID: 287)

Locus Tag Prefixes:

- GGB96

✓ BioSample: Processed

Successfully loaded

SAMN13159397 : Pa21167 (TaxID: 287)

✓ Genomes: Processed ([Details](#))

- [WUTN00000000](#)
- [21167_contigs.fsa](#)
- PGAP file
- 2 files:
 - [21167_contigs00000000.bgpipe.output.sqn](#)
 - [21167_contigs00000000.bgpipe.output.gb](#)
- p2g file
- [WUTN01.p2g](#)
- accessions list
- [WUTN01_accs](#)

Summary

This WGS submission will be released

To provide any necessary changes to submission at this stage, please email us.

immediately following processing.

[Ask for help](#)

APÊNDICE – Projeto de *Whole Genome Shotgun* depositado no *DDBJ/ENA/GenBank* da amostra de *P. aeruginosa* 21168

26/07/2020

SUB6482768 - Summary | WGS | Submission Portal

National Center for Biotechnology Information



Submission Portal

[Home](#)
[My submissions](#)
[Templates](#)
[My profile](#)

Genome submission: SUB6482768

Pseudomonas aeruginosa isolated from sputum of cystic fibrosis patient

✓ BioProject: Processed

[PRJNA580455](#) : *Pseudomonas aeruginosa* genome sequencing (TaxID: 287)

Locus Tag Prefixes:

- GGB97

✓ BioSample: Processed

Successfully loaded

SAMN13159398 : Pa21168 (TaxID: 287)

✓ Genomes: Processed ([Details](#))

- [WUTO00000000](#)
- [21168_contigs.fsa](#)
- PGAP file
- 2 files:
 - [21168_contigs00000000.bgpipe.output.sqn](#)
 - [21168_contigs00000000.bgpipe.output.gb](#)
- p2g file
- [WUTO01.p2g](#)
- accessions list
- [WUTO01_accs](#)

Summary

This WGS submission will be released

immediately following processing.

To provide any necessary changes to submission at this stage, please email us.

[Ask for help](#)

Projeto de *Whole Genome Shotgun* depositado no *DDBJ/ENA/GenBank* da amostra de *P. aeruginosa* 21169

26/07/2020

SUB6482776 - Summary | WGS | Submission Portal

National Center for Biotechnology Information



Submission Portal

[Home](#)
[My submissions](#)
[Templates](#)
[My profile](#)

Genome submission: SUB6482776

Pseudomonas aeruginosa isolated from sputum of cystic fibrosis patient

✓ **BioProject: Processed**

[PRJNA580457](#) : *Pseudomonas aeruginosa* genome sequencing (TaxID: 287)

Locus Tag Prefixes:

- GGB98

✓ **BioSample: Processed**

Successfully loaded

SAMN13159401 : Pa21169 (TaxID: 287)

✓ **Genomes: Processed** ([Details](#))

- [WUTP00000000](#)
[21169_contigs.fsa](#)
- PGAP file
2 files:
 - [21169_contigs00000000.bgpipe.output.sqn](#)
 - [21169_contigs00000000.bgpipe.output.gb](#)
- p2g file
[WUTP01.p2g](#)
- accessions list
[WUTP01_accs](#)

Summary

This WGS submission will be released

To provide any necessary changes to submission at this stage, please email us.

immediately following processing.

[Ask for help](#)

ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Diversidade genética e resistência aos antimicrobianos em *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos isoladas de pacientes com fibrose cística com infecção crônica ao longo de 10 anos.

Pesquisador: Mila Muraro de Almeida

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 79547616.1.0000.5259

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Médicas

Patrocinador Principal: Faculdade de Ciências Médicas

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.476.727

Apresentação do Projeto:

A *Pseudomonas aeruginosa* é um microrganismo ubíquo e versátil e com grande capacidade adaptativa. Apresenta importantes fatores de virulência e resistência aos antimicrobianos, gerando dificuldades na sua erradicação em quadros infecciosos de pacientes críticos e com fibrose cística (FC). Quando presente em infecções respiratórias nos pacientes com FC está associado a elevadas taxas de morbi-mortalidade. É notável a sua tendência aumentada a um padrão de resistência a múltiplos antimicrobianos, bem como a sua perda de sensibilidade a algumas classes, como os betalactâmicos (em especial, aos carbapenêmicos) e as quinolonas. Este projeto tem como objetivo investigar, através de métodos fenotípicos e moleculares, a evolução temporal da resistência aos carbapenêmicos e a ocorrência de amostras multidrogarresistentes, extensivodrogarresistentes e pandrogarresistentes, em *P. aeruginosa* isoladas de pacientes com FC com infecção pulmonar crônica, acompanhados em dois centros de referência no Rio de Janeiro. As amostras serão selecionadas de acordo com seus resultados no teste de disco-difusão, por apresentarem, no período de 2006 a 2016, o perfil de não sensibilidade ao imipenem, meropenem e/ou doripenem. Estas amostras estão estocada no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências Médicas / UERJ

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar, de forma temporal, a susceptibilidade in vitro aos antimicrobianos nas amostras de

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo

Bairro: Vila Isabel

CEP: 20.551-030

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2868-8253

E-mail: cep.hupe.interno@gmail.com



Continuação do Parecer: 2.476.727

Pseudomonas aeruginosa resistentes aos carbapenêmicos, obtidas de secreções respiratórias de pacientes crônicos, com fibrose cística, ao longo de 10 anos

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há risco para os pacientes já que as amostras biológicas já foram coletadas e o estudo é retrospectivo

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa está bem elaborada, A pesquisa está bem estruturada e o referencial teórico e metodológico estão explicitados, demonstrando aprofundamento e conhecimento necessários para sua realização. As referências estão adequadas e a pesquisa é exequível.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os documentos de apresentação compulsória foram adequadamente apresentados, incluindo a justificativa de de não apresentar TCLE

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto pode ser realizado da forma como está apresentado. Diante do exposto e à luz da Resolução CNS nº466/2012, o projeto pode ser enquadrado na categoria – APROVADO.

Considerações Finais a critério do CEP:

Tendo em vista a legislação vigente, o CEP recomenda ao Pesquisador: Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e no termo de consentimento livre e esclarecido, para análise das mudanças; Informar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da pesquisa; O Comitê de Ética solicita a V. S^a., que encaminhe relatórios parciais de andamento a cada 06 (seis) Meses da pesquisa e ao término, encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto; Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_766929.pdf	18/10/2017 12:27:09		Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto.pdf	18/10/2017 12:26:44	Mila Muraro de Almeida	Aceito

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo

Bairro: Vila Isabel

CEP: 20.551-030

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2868-8253

E-mail: cep.hupe.interno@gmail.com



Continuação do Parecer: 2.476.727

Declaração de Pesquisadores	declaracao.pdf	26/08/2017 18:00:44	Mila Muraro de Almeida	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle.pdf	26/08/2017 18:00:24	Mila Muraro de Almeida	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto.doc	12/08/2017 18:41:16	Mila Muraro de Almeida	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 29 de Janeiro de 2018

Assinado por:
DENIZAR VIANNA ARAÚJO
(Coordenador)

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo

Bairro: Vila Isabel

CEP: 20.551-030

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2868-8253

E-mail: cep.hupe.interno@gmail.com

ANEXO B - Artigo científico produzido durante o período de doutoramento

Current Microbiology
<https://doi.org/10.1007/s00284-020-02337-0>



Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Chronic Lung Infection: Current Resistance Profile and Hypermutability in Patients with Cystic Fibrosis

Mila M. Almeida¹ · Meyvianne T. Freitas¹ · Tania W. Folescu² · Monica C. Firmida³ · Ana Paula D'A. Carvalho-Assef⁴ · Elizabeth A. Marques¹ · Robson S. Leão¹

Received: 27 May 2020 / Accepted: 14 December 2020
 © The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC part of Springer Nature 2021

Abstract

Pseudomonas aeruginosa is associated with chronic and progressive lung disease and is closely related to increased morbidity and mortality in cystic fibrosis (CF) patients. Hypermutable (HPM) *P. aeruginosa* isolates have been described in these patients and are usually associated with antibiotic resistance. This study aimed to investigate the occurrence of carbapenem resistance and hypermutable phenotype in 179 *P. aeruginosa* isolates from 8 chronically CF patients assisted at two reference centers in Rio de Janeiro, Brazil. Using disk diffusion test, non-susceptible (NS) rates higher than 40% were observed for imipenem, amikacin, and gentamicin. A total of 79 isolates (44.1%), 71 (39.6%), and 8 (4.4%) were classified as carbapenem-resistant (CR resistance to at least one carbapenem), multidrug-resistant (MDR), and extensively drug-resistant (XDR), respectively. Minimal inhibitory concentration was determined for 79 CR *P. aeruginosa* and showed the following variations: 4 and 128 µg/mL to imipenem, 4 and 64 µg/mL to meropenem, and 4 and ≥ 32 µg/mL to doripenem. We have found only four (2.23%) HPM isolates from 4 patients. Analyzing the genetic relationship among the HPM isolates, 3 pulsed-field gel electrophoresis/pulsotypes (D, M, and J) were observed. Only M pulsotype was recovered from two patients in different years. Polymerase chain reaction screening for *bla*_{GES}, *bla*_{IMP}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{SPM}, and *bla*_{VIM} genes was performed for all CR isolates and none of them were positive. Our results demonstrate a high occurrence of CR and MDR *P. aeruginosa* of CF patients follow-up in both centers studied, while the presence of HPM is still unusual.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02337-0>.

✉ Robson S. Leão
 robson.leao@uerj.br

- Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil
- Instituto Nacional de Saúde da Mulher, Criança e do Adolescente Fernandes Figueira, Centro de Referência para Crianças e Adolescentes com Fibrose Cística - Ministério da Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil
- Departamento de Doenças do Tórax, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil
- Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

Introduction

Chronic pulmonary infection caused by *Pseudomonas aeruginosa* is closely related to increased morbidity and mortality in cystic fibrosis (CF) [1] pediatric and adult patients, which generally present a single clone in the airways after the infection becoming chronic [2, 3] showing several resistance mechanisms that contribute to deterioration of the respiratory function and poor prognosis [1].

The hypermutable phenotype (HPM) is widely observed in *P. aeruginosa* isolates from CF patients and is derived from a high rate of mutations in the DNA repair system, which is largely prevalent in chronic respiratory infections and might contribute to the loss of susceptibility to antimicrobials and its persistence [4, 5]. Based on the observation of the distribution of the global data about this phenotype, there is likely a direct relationship between increased antimicrobial resistance and hypermutability [6].

Multidrug-resistant (MDR) and carbapenem-resistant (CR) isolates of *P. aeruginosa* from patients with CF are

Published online: 06 January 2021

Springer

Content courtesy of Springer Nature, terms of use apply. Rights reserved.

ANEXO C - Comprovação de submissão do artigo científico à *Brazilian Journal of Microbiology* (BJMI-S-21-00101)

Date: qua., 27 de jan. de 2021 às 16:17

Subject: Submission Confirmation

To: Robson Leão <rdsleao@gmail.com>

Dear Mr Leão,

Thank you for submitting your manuscript,

"Phenotypic and genetic comparison of a small colony variant of *Pseudomonas aeruginosa* from mucoid and non-mucoid isolates obtained from a patient with cystic fibrosis during respiratory exacerbations", to *Brazilian Journal of Microbiology*

The submission id is: BJMI-D-21-00101

Please refer to this number in any future correspondence.

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript by accessing the journal's web site.

Your username is: Robson Leão

If you forgot your password, you can click the 'Send Login Details' link on the EM Login page at

<https://www.editorialmanager.com/bjmi/>.

With kind regards,

Journals Editorial Office BJMI

Springer

ANEXO D – Primeira página da submissão do artigo científico à *Brazilian Journal of Microbiology* (BJMI-S-21-00101)

Brazilian Journal of Microbiology
Phenotypic and genetic comparison of a small colony variant of *Pseudomonas aeruginosa* from mucoid and non-mucoid isolates obtained from a patient with cystic fibrosis during respiratory exacerbations
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:					
Full Title:	Phenotypic and genetic comparison of a small colony variant of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> from mucoid and non-mucoid isolates obtained from a patient with cystic fibrosis during respiratory exacerbations				
Article Type:	Research Paper				
Section/Category:	Clinical Microbiology				
Funding Information:	<table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 60%;">Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (465718/2014-0)</td> <td style="width: 40%;">Not applicable</td> </tr> </table>	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (465718/2014-0)	Not applicable		
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (465718/2014-0)	Not applicable				
Abstract:	<p><i>Pseudomonas aeruginosa</i> infections in cystic fibrosis (CF) patients have been associated with chronic obstructive pulmonary disease, increased hospitalization, and morbimortality. In this work, whole-genome sequencing was performed to access information about clonality, resistance mechanisms, and other molecular features for six <i>P. aeruginosa</i> isolates displaying small colony variant (SCV) (n=2), mucoid (n=2), and non-mucoid (n=2) phenotypes, recovered from a chronically colonized CF patient, during two episodes of pulmonary exacerbation. Most were multidrug-resistant, except for both mucoid isolates. All strains were susceptible to polymyxin, except for 21169 SCV, classified as pan-drug resistant. Using estimation of mutation frequencies, four isolates were classified as hypermutable (HPM) (21114 NM, 21107 SCV, 21167 NM, and 21169 SCV) and two as normomutants (21113 MUC and 21168 MUC). Exclusive relationships between SCV and HPM phenotypes and genetic features were not observed. All <i>P. aeruginosa</i> isolates belonged to a new sequence type (ST2744). Acquired resistance for betalactams (bla PAO and bla OXA-50), aminoglycosides (aph (3')-IIb), fosfomicin (fosA), chloramphenicol (catB7), and ciprofloxacin (crpP) were detected in all isolates, while the mcr-1 and carbapenemase genes were not found. Observed mutations in genes encoding porins and efflux systems may explain the observed antimicrobial resistance profile. We highlight the quantitative difference in virulence genes such as algB, phzA1 and phzB1 between the strains. To our knowledge, this is the first report of <i>P. aeruginosa</i> SCV genome sequencing from a CF patient in Brazil. Our findings may help to develop new strategies to predict genetic alterations linked to persistence, virulence, and microbial resistance, associated to clinical severity of CF.</p>				
Corresponding Author:	Robson Leão UERJ BRAZIL				
Corresponding Author Secondary Information:					
Corresponding Author's Institution:	UERJ				
Corresponding Author's Secondary Institution:					
First Author:	Mila Muraro Almeida, M.Sc				
First Author Secondary Information:					
Order of Authors:	<table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td>Mila Muraro Almeida, M.Sc</td> </tr> <tr> <td>Leonardo Ribeiro Bastos, M.D., Ph.D.</td> </tr> <tr> <td>Mônica Cássia Firmida, M.D., Ph.D.</td> </tr> <tr> <td>Rodolpho Mattos Albano, Ph.D.</td> </tr> </table>	Mila Muraro Almeida, M.Sc	Leonardo Ribeiro Bastos, M.D., Ph.D.	Mônica Cássia Firmida, M.D., Ph.D.	Rodolpho Mattos Albano, Ph.D.
Mila Muraro Almeida, M.Sc					
Leonardo Ribeiro Bastos, M.D., Ph.D.					
Mônica Cássia Firmida, M.D., Ph.D.					
Rodolpho Mattos Albano, Ph.D.					