



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Felipe Reis de Alexandria Simão

**Base genética da resistência aos antimicrobianos em
Pseudomonas aeruginosa isoladas de secreções respiratórias de
indivíduos com fibrose cística**

Rio de Janeiro

2023

Felipe Reis de Alexandria Simão

Base genética da resistência aos antimicrobianos em *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de secreções respiratórias de indivíduos com fibrose cística

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, 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

2023

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

S588 Simão, Felipe Reis de Alexandria.
Base genética da resistência aos antimicrobianos em
Pseudomonas aeruginosa isoladas de secreções respiratórias de
indivíduos com fibrose cística / Felipe Reis de Alexandria Simão –
2023.
123 f.

Orientador: Prof. Dr. Robson de Souza Leão
Coorientadora: Prof.^a Dra. Elizabeth de Andrade Marques

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de
Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em
Microbiologia.

1. *Pseudomonas aeruginosa* – Teses. 2. Infecções por
Pseudomonas – Microbiologia – Teses. 3. Farmacorresistência
Bacteriana Múltipla – Genética – Teses. 4. Fibrose Cística – Teses. 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 615.015.8

Bibliotecário: Felipe Caldonazzo CRB7/7341

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

Assinatura

Data

Felipe Reis de Alexandria Simão

Base genética da resistência aos antimicrobianos em *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de secreções respiratórias de indivíduos com fibrose cística

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

Aprovada em 28 de abril de 2023

Orientador: Prof. Dr. Robson de Souza Leão

Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

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

Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Banca Examinadora: _____

Prof.^a Dra. Mara Lucia Penna Queiroz

Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Dra. Melise Chaves Silveira

Fundação Oswaldo Cruz

Dra. Laura Maria Andrade de Oliveira

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2023

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais, que sempre batalharam muito e “deram o sangue” para me criar e me permitiram me tornar quem eu sou hoje.

AGRADECIMENTOS

A Deus, ao meu anjo da guarda e a todos os espíritos do bem, por me permitirem ter chegado até aqui, sempre protegido e nunca desamparado.

À minha mãe Ana e meu pai Carlos, por toda a compreensão, incentivo, amor, carinho, atenção e suporte.

À minha namorada Maria Eduarda, que sempre terá meu total agradecimento hoje e amanhã por todo companheirismo, pelo ombro e ouvido amigo, por me levantar nos momentos que eu mais desacreditei em mim mesmo e por ser essa pessoa maravilhosa que ela é.

Aos meus amigos, em especial, Carlos, Daniel, Lucas e Yasmin que sempre me deram apoio, motivação e sempre torceram por mim.

Aos funcionários do LABACT/HUPE, pelos ensinamentos e aos funcionários do DMIP.

A todos os professores e professoras com quem cruzei desde o fundamental até o presente momento.

Aos colegas do laboratório 2, em especial Elisa, Mila e Heloísa, que sempre me apoiaram e ajudaram em diversos momentos, com a maior atenção e paciência possível.

A coordenação do programa de Pós-Graduação em Microbiologia e a atual coordenadora Prof.^a Dra. Elizabeth de Andrade Marques.

Ao Prof. Dr. Robson Leão e a Prof.^a Dra. Elizabeth Marques pela oportunidade, ensinamentos e orientação, com seriedade e dedicação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro para a execução desse projeto.

O amanhã é ilusório
Porque ainda não existe
O hoje é real
É a realidade que você pode interferir
Racionais MC

RESUMO

SIMÃO, Felipe Reis de Alexandria. *Base genética da resistência aos antimicrobianos em Pseudomonas aeruginosa isoladas de secreções respiratórias de indivíduos com fibrose cística*. 2023. 123 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

A fibrose cística (FC) é uma doença genética que afeta principalmente o sistema respiratório e digestivo. É causada por mutação no gene *CFTR* que resulta em mau funcionamento das glândulas exócrinas, levando à produção de muco espesso que obstrui as vias aéreas e dificulta a digestão. *Pseudomonas aeruginosa* é o principal patógeno associado a quadros de exacerbação pulmonares e óbitos em indivíduos com FC. A capacidade de resistir a antimicrobianos exibida por *P. aeruginosa* está relacionada a fatores múltiplos, como a superexpressão de bombas de efluxo. Além desta, o microrganismo também pode adquirir genes via transferência horizontal e exibir resistência adaptativa, como em condições de biofilmes. Apesar deste arsenal, amostras de *P. aeruginosa* de indivíduos brasileiros com FC não eram comumente associadas a resistência a múltiplas drogas (MDR), principalmente quando comparadas com o resto do mundo, onde a presença de clones epidêmicos, capazes de exprimir resistência a diversas drogas, são muitas vezes reportados. Devido a estas características e a recente observação de *P. aeruginosa* resistente a diversas drogas em nossos centros, o sequenciamento do genoma completo (SGT) se mostra uma ferramenta capaz de auxiliar nas análises moleculares relacionadas a resistência aos antimicrobianos, através da busca por mutações em genes intrínsecos, aquisição de genes extrínsecos e plasmídeos, assim como o monitoramento na busca de clones epidêmicos que circulam nesses pacientes, que até o momento, ainda não foram descritos no Brasil. A quase totalidade das amostras deste estudo exibiram resistência a imipenem e meropenem, contudo, como apenas amostras resistentes a polimixina B foram selecionadas, este era um perfil esperado, visto que a resistência a esta classe é associada a perfis MDR e resistência extensiva. Usando o SGT, buscamos por genes de resistência intrínseca, e foram identificadas evidências que nos permitem supor que alterações no gene *mexZ* estejam superexpressando a bomba de efluxo MexXY. Alterações nos genes *oprD*, *opdP* e *opdD*, relacionados a porinas de entrada de carbapenêmicos, possivelmente estão relacionadas com a resistência a essa classe. Modificações nos genes *gyrA* e *parC*, codificadores das enzimas de replicação do DNA, também foram identificadas associadas a resistência a fluoroquinolonas. Alterações em *parS* e *pmrB*, relacionados a resistência a polimixina B, também foram identificadas. A tipificação molecular das amostras foi capaz de identificar três novos STs, 4051, 4052 e 4053 e quando comparadas com clones epidêmicos de FC, nenhuma das amostras incluídas nesse estudo demonstrou associação com estes. A análise do ambiente genético de amostras de *P. aeruginosa* resistentes a polimixina B nos permitiu entender os diferentes mecanismos de resistência aos antimicrobianos, além de subsidiar o entendimento das possíveis relações com as cepas epidêmicas que circulam entre indivíduos com FC observadas em outros países.

Palavras-chave: Fibrose Cística, *Pseudomonas aeruginosa*. Resistência. Sequenciamento do Genoma Total. Plasmídeos. Tipificação.

ABSTRACT

SIMÃO, Felipe Reis de Alexandria. *Genetic basis of antimicrobial resistance in Pseudomonas aeruginosa isolated from respiratory secretions of individuals with cystic fibrosis*. 2023. 123 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

Cystic fibrosis (CF) is a genetic disease that affects mainly respiratory and digestive system. It is caused by mutations in *CFTR* gene resulting in malfunction of the exocrine glands and thickness of mucus that obstruct the airways and makes digestion difficult. *Pseudomonas aeruginosa* is the main pathogens associated to pulmonary exacerbation and death in CF population. The ability to resist antimicrobials exhibited by *P. aeruginosa* is related to multiple factors, like efflux pump overexpression. Besides the microorganism can also acquire horizontal transferable genes and exhibit adaptative resistance as in biofilm conditions. In addition to this, *P. aeruginosa* samples acquired from Brazilian CF individuals were not associated to multidrug-resistance (MDR) profile, especially when compared to the rest of the world, where epidemic strains, capable of express resistance to various drugs, are commonly reported. Due to these characteristics and the recent observation of *P. aeruginosa* resistant to several drugs in ours centers, whole genome sequencing (WGS) is a tool capable of assisting in molecular analyzes related to antimicrobial resistance, through the search for mutations in intrinsic genes, acquisition of extrinsic genes and plasmids, as well as monitoring in the search for epidemic clones that circulates in these patients, which so far have not been described in Brazil. Almost all of the samples in this study exhibited resistance to imipenem and meropenem, however, as only samples resistant to polymyxin B were selected, this was an expected profile, since resistance to this class is associated with MDR profiles and extensively resistance. Using the WGS, we searched for intrinsic resistance genes, and identified evidence that suggests that alterations in the *mexZ* gene are overexpressing the MexXY efflux pump. Alterations in *oprD*, *opdP* and *opdD* genes, related to carbapenem resistance porins, are possibly related to resistance to this class. Modifications in the *gyrA* and *parC* genes, encoding DNA replication enzymes, have also been identified as associated with resistance to fluoroquinolones. Alterations in *parS* and *pmrB*, related to polymyxin B resistance, were also identified. The molecular typing were able to identify three new STs, 4051, 4052 and 4053 and when compared to epidemic CF clones, none of the samples included in this study showed association with them. The analysis of the genetic environment of *P. aeruginosa* resistant to polymyxin B allowed us to understand the different mechanisms of antimicrobial resistance, in addition to subsidizing the understanding of the possible relationships with the epidemic strains that circulates among individuals with CF, observed in other countries.

Keywords: Cystic fibrosis. *Pseudomonas aeruginosa*. Resistance. Whole Genome Sequencing. Plasmids. Typing.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Registros e seguimentos de indivíduos portadores de fibrose cística no Brasil entre os anos de 2009 e 2020.....	18
Figura 2 –	Painel do teste POLICIMBAC para a determinação da concentração inibitória mínima de polimixina B.....	39
Figura 3 –	Mapa do plasmídeo obtido na amostra 17138 através da ferramenta DNAPlotter.....	63
Figura 4 –	Mapa do plasmídeo obtido na amostra 17801 através da ferramenta DNAPlotter.....	64
Figura 5 –	Mapa do plasmídeo obtido na amostra 17828 através da ferramenta DNAPlotter.....	65
Figura 6 –	Mapa do plasmídeo obtido na amostra 17973 através da ferramenta DNAPlotter.....	66
Figura 7 –	Árvore filogenética das amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> deste estudo e das cepas epidêmicas de fibrose cística.....	69

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 –	Distribuição dos pacientes e amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> entre as clínicas de origem.....	35
Quadro 2 –	Descrição da cepa controle utilizada, concentrações do sulfato de polimixina definidas para o uso entre as amostras e faixa de crescimento aceitável da cepa controle na determinação da concentração inibitória mínima.....	37
Quadro 3 –	Categorias e agentes antimicrobianos testados e aplicados para classificação de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistentes a polimixina B nos perfis MDR e XDR.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Número de amostras resistentes aos antimicrobianos em <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistentes a polimixina B.....	48
Tabela 2 –	Perfis de resistência aos antimicrobianos em cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistentes a polimixina B, determinados pelos resultados obtidos com o método de difusão em ágar.....	49
Tabela 3 –	Distribuição das concentrações inibitória mínima para polimixina B, perfil de resistência aos antimicrobianos em <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50
Tabela 4 –	Comparação entre as metodologias utilizadas para a determinação da concentração inibitória mínima para polimixina B.....	51
Tabela 5 -	Classificação das amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em resistente a múltiplas drogas e resistência extensiva baseado nos marcadores fenotípicos de resistência aos antimicrobianos.....	52
Tabela 6 –	Dados da composição genômica das amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	54
Tabela 7 –	Análise dos genes de resistência extrínseca encontrada nas amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> pesquisadas através da ferramenta ResFinder.....	61
Tabela 8 –	Presença de genes relacionados a resistência a antimicrobianos nos plasmídeos das amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> pesquisadas.....	62
Tabela 9 –	Identificação dos <i>sequence type</i> através do perfil alélico das amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> pesquisadas neste estudo e de cepas epidêmicas de fibrose cística.....	67
Tabela 10 -	Mutações nos genes de interesse das amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	107
Tabela 11 -	Principais mutações associadas a resistência a antimicrobianos nos genes das amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isoladas de indivíduos com fibrose cística deste estudo	122

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	<i>ATP binding cassette</i>
AES	<i>Australian epidemic strain</i>
AMI	Amicacina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATM	Aztreonam
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BV-BRC	<i>Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center</i>
CAMHB	Caldo Mueller-Hinton cátion-ajustado
CARD	<i>Comprehensive Antibiotic Resistance Database</i>
CAZ	Ceftazidima
cBc	Complexo <i>Burkholderia cepacia</i>
CC	Controle de crescimento
CDS	Sequências codificadoras
CFTR	<i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
CGE	<i>Center for Genomic Epidemiology</i>
CIM	Concentração inibitória mínima
CIP	Ciprofloxacina
CLSI	<i>Clinical & Laboratory Standards Institute</i>
DES	<i>Dutch epidemic strain</i>
DHFR	<i>dihydrofolate reductase</i>
DK	<i>Denmark strain</i>
DOR	Doripenem
ENaC	<i>Epithelial sodium channel</i>
FC	Fibrose Cística
FEP	Cefepime

GBEFC	Grupo de Estudos Brasileiros em Fibrose Cística
GC	Guanina+citosina
GES	<i>Guiana extended-spectrum β-lactamase</i>
HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto
IFF/FIOCRUZ	Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira
IMP	Imipenem/Imipenemase
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
IRT	<i>Immunoreactive trypsinogen</i>
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae carbapenemase</i>
LabGen	Laboratório de Genoma Bacteriano
LES	<i>Liverpool epidemic strain</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
MATE	<i>Multi-drug and toxic compound extrusion</i>
MBL	<i>Metallo-β-lactamases</i>
MDR	Resistente a múltiplas drogas
MER	Meropenem
MES	<i>Manchester epidemic strain</i>
MFS	<i>Major facilitator superfamily</i>
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NDARO	<i>National Database of Antibiotic Resistance Organisms</i>
NDM	<i>New Delhi metallo-β-lactamase</i>
NT	<i>Neutralize tagment</i>
NTHi	<i>Nontypeable Haemophilus influenzae</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
OXA	Oxacilinase
PATRIC	<i>Applying Pathosystems Resource Integration Center</i>
Pb	Pares de base
PBP	<i>Penicillin binding proteins</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDR	Pandroga resistente
PES	<i>Praire epidemic strain</i>

PEtN	Fosfoetanolamina
PPC	Policlínica Piquet Carneiro
PPT	Piperacilina-tazobactam
PubMLST	<i>Public Databases for Molecular Typing and Microbial Genome Diversity</i>
RAST	<i>Rapid Annotation Subsystem Technology</i>
RND	<i>Resistance-nodulation division</i>
SPM	<i>São Paulo metallo-β-lactamase</i>
SCV	<i>Small colony variant</i>
SGT	Sequenciamento do genoma total
SMR	<i>Small multidrug resistance</i>
ST	<i>Sequence type</i>
TCS	<i>Two-component systems</i>
TDD	Teste disco-difusão
TOB	Tobramicina
UFC	Unidade formadora de colônia
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
VIM	<i>Verona Imipenemase</i>
XDR	Resistência extensiva

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
<	Menor que
≥	Maior ou igual
≤	Menor ou igual
°C	Grau Celsius
β	Beta
Ca	Molécula de cálcio
Mg	Molécula de magnésio
mg	Miligrama
mL	Mililitro
ng	Nanograma
pM	Picomolar
μL	Microlitro
μg	Micrograma
®	Marca registrada

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	17
1	JUSTIFICATIVA	33
2	OBJETIVOS	34
2.1	Geral	34
2.2	Específicos	34
3	MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1	Pacientes e critério de seleção	35
3.2	Estoque bacteriano	35
3.3	Identificação das amostras	36
3.4	Teste de sensibilidade aos antimicrobianos	36
3.4.1	<u>Teste Disco-Difusão</u>	36
3.4.2	<u>Concentração Inibitória Mínima</u>	36
3.4.2.1	Preparo do meio de cultura.....	37
3.4.2.2	Preparo da solução do agente antimicrobiano.....	38
3.4.2.3	Preparo do inóculo.....	38
3.4.2.4	Incubação da placa e identificação da Concentração Inibitória Mínima.....	39
3.4.3	<u>Teste comercial POLICIMBAC</u>	39
3.4.3.1	Preparo do inóculo.....	40
3.4.3.2	Inoculação, incubação e identificação da Concentração Inibitória Mínima.	40
3.5	Classificação das amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em resistente a múltiplas drogas (MDR) e resistência extensiva (XDR)....	41
3.6	Obtenção e purificação do DNA	41
3.7	Sequenciamento do genoma total de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistentes a polimixina B	42
3.7.1	<u>Preparo das bibliotecas genômicas</u>	43
3.7.2	<u>Fragmentação e marcação do DNA genômico</u>	43
3.7.3	<u>Amplificação do DNA fragmentado</u>	44
3.7.4	<u>Purificação das bibliotecas genômicas</u>	44
3.7.5	<u>Normalização e mistura das bibliotecas</u>	45

3.7.6	<u>Trimagem das <i>reads</i> e montagem dos genomas</u>	45
3.8	Análise de Bioinformática	46
4	RESULTADOS	48
4.1	Perfil de resistência aos antimicrobianos	48
4.1.1	<u>Teste Disco-Difusão</u>	48
4.1.2	<u>Concentração Inibitória Mínima</u>	49
4.1.3	<u>Teste comercial POLICIMBAC</u>	50
4.2	Classificação das amostras de acordo com os perfis de resistência: resistente a múltiplas drogas (MDR) e resistência extensiva (XDR)....	51
4.3	Sequenciamento do genoma total	52
4.3.1	<u>Montagem e anotação dos genomas</u>	52
4.3.2	<u>Genes associados a resistência aos antimicrobianos</u>	55
4.3.2.1	Genes intrínsecos.....	55
4.3.2.2	Genes extrínsecos.....	59
4.3.3	<u>Análise de plasmídeo</u>	62
4.3.4	<u>Tipificação molecular</u>	66
5	DISCUSSÃO	71
	CONCLUSÃO	89
	REFERÊNCIAS	92
	APÊNDICE A – Mutações nos genes de interesse das amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	107
	APÊNDICE B – Principais mutações associadas a resistência a antimicrobianos nos genes das amostras de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isoladas de indivíduos com fibrose cística deste estudo	123

INTRODUÇÃO

Fibrose Cística

A fibrose cística (FC), é a doença autossômica recessiva mais comum na população caucasiana, ocorrendo em aproximadamente 1 a cada 3500 nascimentos. A maioria dos pacientes tornam-se sintomáticos após o nascimento, e infecções respiratórias e baixo ganho de peso são sintomas mais frequentes (DE BOECK, 2020).

A doença envolve as células produtoras do muco e do suor, afetando múltiplos órgãos, sendo os pulmões afetados de forma mais severa (RAFEEQ & MURAD, 2017). É uma doença gênica que ocorre através de mutações no cromossomo sete, e altera funções do gene regulador da condutância transmembrana da fibrose cística (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*, CFTR), que codifica a proteína de mesmo nome, modificando-a (ROSENFELD, SONTAG & REN, 2016; DE BOECK, 2020).

A proteína CFTR atua como um canal de transporte de íons de cloreto, permitindo sua passagem pelas células produtoras de muco, seguido pela água e tornando o muco delgado. Mutações neste gene afetam este transporte e a absorção do sódio, levando ao aumento da espessura do muco nos pulmões. Devido ao defeito na ação de limpeza mucociliar do CFTR e ao acúmulo de secreções mucopurulentas, os pulmões tornam-se um ambiente ideal para a proliferação e persistência de bactérias, como a de *Pseudomonas aeruginosa* (DOURAGHI *et al.*, 2014; RAFEEQ & MURAD, 2017).

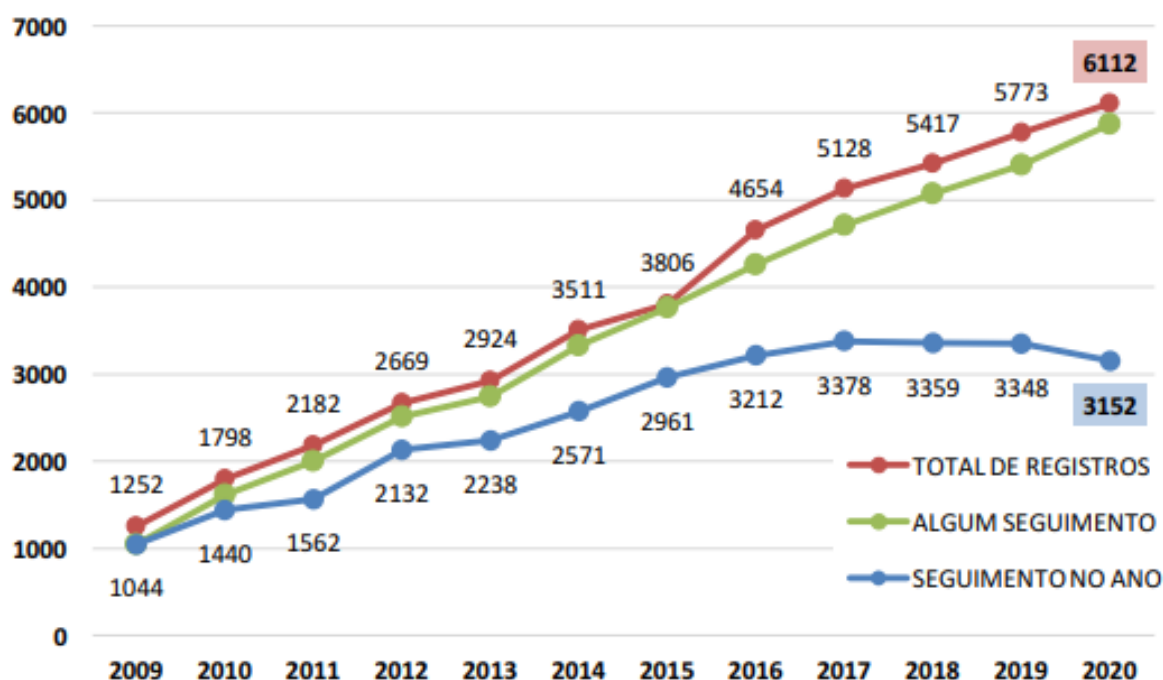
O CFTR também age em outros órgãos como hipotálamo, rins e ossos, e devido a mutações no gene, podem haver retardamento no crescimento da criança, início tardio da puberdade, modulação na densidade óssea e susceptibilidade à cálculos renais nos pacientes com FC (CASTELLANI & ASSAEL, 2016).

A triagem neonatal é uma das formas de diagnóstico da doença, normalmente utilizando a medição de tripsinogênio imunorreativo (*immunoreactive trypsinogen*, IRT), que irá medir a enzima tripsina, produzida pelo pâncreas, e em caso positivo, o teste do suor, que mede a concentração de cloreto no suor, sendo considerado um

teste padrão ouro para o diagnóstico da doença (DE BOECK, VERMEULEN & DUPONT, 2017; CASTELLANI *et al.*, 2019; SHTEINBERG *et al.*, 2021).

Dados do Registro Brasileiro de Fibrose Cística (Grupo de Estudos Brasileiros em Fibrose Cística, GBEFC) coletados até 31/12/2020 apresentam que na ocasião, haviam 6.112 indivíduos registrados, dos quais 5.869 (96%) possuíam algum dado de seguimento. A Figura 1 evidencia o crescente número de registros de brasileiros com FC e também a diminuição do número de seguimentos, muito possivelmente devido a pandemia de Covid-19.

Figura 1 – Registros e seguimentos de indivíduos portadores de fibrose cística no Brasil entre os anos de 2009 e 2020.



Fonte: GBEFC (www.portalgbeffc.org.br), 2020.

Ainda de acordo com o GBEFC (2020), o estado de São Paulo é o estado com a maior distribuição de indivíduos, tendo um número de 1.523 (25%) indivíduos, seguido por Minas Gerais, com 711 (11,7%) e Rio Grande do Sul, com 634 (10,4%). O Rio de Janeiro fica na quinta posição, acolhendo 457 (7,5%) indivíduos. O registro também data o sexo dos mesmos, tendo 3.138 (51,34%) indivíduos do sexo masculino e 2.974 (48,66%) do sexo feminino, dos quais 4.228 (69,18%) eram das seguintes etnias: Brancos, 1.483 (24,26%) Pardos, 377 (6,17%) Pretos, 18 (0,29%) Amarelos e 6 (0,10%) Indígenas.

Dentre as diversas manifestações clínicas observadas nos indivíduos com FC, podemos destacar as infecções pulmonares, que podem levar a complicações frequentes, causadas por microrganismos tipicamente recuperados nesses indivíduos. Essas infecções podem levar a diminuição da função pulmonar e até sua perda permanente, piorando a qualidade de vida destes indivíduos (GOSS, 2019).

O levantamento também abrange os dados microbiológicos das secreções respiratórias de pessoas com FC, evidenciando que o patógeno *Staphylococcus aureus*, apresentando o perfil de sensibilidade à oxacilina, esteve presente em 1.658 (52,6%) dos 3.152 indivíduos com dados de seguimento, seguido por *P. aeruginosa*, com 1.044 (33,1%) e pelo Complexo *Burkholderia cepacia* (cBc), com 214 (6,8%) indivíduos apresentando este microrganismo. O microrganismo com a menor identificação nas amostras destes pacientes foi o *Mycobacterium tuberculosis*, com presença em 5 (0,2%) indivíduos dos 3.152.

Fisiopatologia

A proteína CFTR é formada por um arranjo de dois domínios transmembrana, cada um composto de seis subunidades, formando um poro que controla a passagem de ânions. Outros domínios são os de ligação de nucleotídeos e o domínio R, responsável pela abertura do canal mediante a interação com os domínios transmembrana e da hidrólise de ATP. Em um funcionamento normal, a proteína regula o transporte de íons de cloreto e de bicarbonato, afetando o muco e o pH em células epiteliais (BERGERON & CANTIN, 2019).

A CFTR regula o canal ENaC (*Epithelial sodium channel*), que é responsável pelo transporte e reabsorção de sal e água nas vias aéreas. No caso da proteína CFTR defeituosa, a reabsorção do canal ENaC aumenta e a combinação desse aumento de reabsorção e diminuição de secreção, resulta em poucos fluídos nas vias aéreas de pacientes com FC, gerando muco espesso e viscoso e a redução da atividade mucociliar, além de inflamação e infecções (CHMIEL & DAVIS, 2003; BERGERON & CANTIN, 2019).

Além dos pulmões, o pâncreas também sofre com o muco espesso. Enzimas digestivas, como a IRT, produzidas pelo pâncreas são bloqueadas de passarem pelo ducto pancreático por conta do muco espesso, tornando difícil a quebra e absorção de nutrientes, podendo levar os indivíduos com FC a quadros de desnutrição. Além disto, a produção contínua e o excesso destas enzimas podem levar a danos no órgão e até câncer pancreático (ONG *et al.*, 2018).

O muco normal funciona como uma barreira protetora das vias aéreas, protegendo a superfície de órgãos e realizando a limpeza de microrganismos, porém, com o defeito no transporte de íons e alta viscosidade do muco, ele torna-se ideal para a adesão de microrganismos, além de tornar-se uma barreira contra a entrada de drogas inalatórias, as quais são a escolha primária para o tratamento nos pulmões (ONG *et al.*, 2018).

Através da falha na limpeza do muco, microrganismos como *P. aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* e *S. aureus* colonizam os pulmões, secretando proteínas tóxicas pró-inflamatórias, levando a problemas pulmonares como a bronquiectasia, que ocorre devido ao aumento da concentração de elastases de neutrófilos, e, com a progressão da doença e danos no epitélio, outras bactérias tornam-se colonizadoras do indivíduo com FC (ELBORN, 2016).

Genética

Existem mais de 2.000 variantes reportadas do gene CFTR, contudo, não é de conhecimento se em todas as variantes reportadas há a presença da doença e nem em quantas destas (<https://cftr2.org/>).

A variante mais comum destas reportadas, é a variante F508del (encontrada também sob os nomes $\Delta F508$ e Phe508del), sendo caracterizada pela deleção de três bases nucleotídicas, resultando na remoção da fenilalanina no aminoácido 508. É a variante mais comum na Europa e representava cerca de 70% dos casos de FC nos Estados Unidos (ONG *et al.*, 2018; DE BOECK, 2020; SANDERS *et al.*, 2021).

No estudo do GBEFC, de 2020, dos 6.112 casos registrados no Brasil, 5.083 (83,2%) realizaram a pesquisa por genótipo e aproximadamente metade deles (2.682,

52,8%) tem pelo menos uma cópia da variante F508del, sendo esta a variante mais frequente nos indivíduos brasileiros com FC cadastrados.

Microbiota pulmonar

Em adição a todas as complicações que o CFTR defeituoso acrescenta, são observadas também as infecções por microrganismos, muitas vezes sendo patógenos oportunistas. Dentre os principais estão *H. influenzae*, *S. aureus*, espécies do cBc, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans* e *P. aeruginosa*, havendo correlação da idade do paciente com o microrganismo que está infectando-o (CUTHBERTSON *et al.*, 2020).

H. influenzae, é considerado um patógeno oportunista e um dos colonizadores iniciais dos pulmões de pacientes com FC. A espécie é classificada entre seis sorotipos (Hia até Hif) e é capaz de produzir cápsulas. Com a criação de uma vacina para o sorotipo Hib, a maior prevalência das cepas relacionadas ao microrganismo é de cepas não capsulares, conhecidas como NTHi (*Nontypeable H. influenzae*), as quais estão associadas a inflamação crônica nos pulmões devido ao recrutamento de neutrófilos e citocinas pró-inflamatória (SALIU *et al.*, 2021; WATTS *et al.*, 2021).

O patógeno *S. aureus*, é um dos microrganismos mais detectados nas vias aéreas de pacientes com FC nas idades iniciais, tendo sua prevalência em cerca de 50% entre as crianças de até dois anos e até 80% entre os adolescentes e é associado a aumento na atividade inflamatória e piora na capacidade nutricional. Devido à alta competição e diversos fatores externos, a bactéria sofre uma grande pressão seletiva, necessitando de adaptação para competir com outros patógenos e burlar a ação de antimicrobianos. Uma destas adaptações é representada no perfil de resistência à meticilina (MRSA), o qual é caracterizado por piora na função pulmonar, altas taxas de mortalidade e aumento nas taxas de hospitalização (RUMPF *et al.*, 2021).

O cBc, é um grupo de microrganismos composto de diversas espécies fenotipicamente muito similares, diferenciados apenas por testes moleculares. São espécies causadoras de FC e raras em infecções nosocomiais, entretanto, espécimes

deste complexo são capazes de produzir diversos fatores de virulência e apresentar resistência a antimicrobianos e desinfetantes (LORD, JONES & HORSLEY, 2020).

Outro patógeno oportunista que também está entre os causadores de FC é o bacilo gram-negativo não fermentador *S. maltophilia*, conhecido por sua alta capacidade de resistir a drogas antimicrobianas e sua presença em culturas é associada à diminuição na resposta imune de hospedeiros e função pulmonar comprometida (BROOKE, 2021). O microrganismo apresenta resistência intrínseca a diversos agentes β -lactâmicos através da apresentação de β -lactamases, bombas de efluxo e baixa permeabilidade de membrana externa (TRIFONOVA & STRATEVA, 2018).

Espécies do gênero *Achromobacter* também são responsáveis por causar infecções em pacientes com FC, sendo *A. xylosoxidans* a espécie mais frequentemente encontrada em pacientes com FC, seguido por *Achromobacter ruhlandii*. Sua presença está relacionada a infecções crônicas e devido a seu maquinário de proteínas, que permite injetar toxinas em outras células bacterianas, e sua resistência a antimicrobianos peptídicos, a espécie se adapta ao ambiente pulmonar de pacientes com FC (ESPOSITO *et al.*, 2021; GABRIELAITE *et al.*, 2021).

Finalizando a lista dos principais microrganismos associados a FC, temos *P. aeruginosa*, sendo uma das principais bactérias associadas a FC junto de *S. aureus*. Sua taxa de infecção aumenta com a idade, podendo ser identificada na grande maioria de amostras de pacientes com FC adultos. Sua progressão da doença pode levar a exacerbação pulmonar e danos pulmonares irreversíveis além de ser associada mais frequentemente a complicações da FC, como desnutrição e diabetes dos pacientes (MIELKO *et al.*, 2019).

Pseudomonas aeruginosa

P. aeruginosa é uma bactéria ubíqua, gram-negativa, bacilar, móvel, aeróbica e não formadora de esporos, sendo capaz de se adaptar a uma grande variedade de ambientes e possui grande variedade de enzimas metabólicas, concedendo ao

microrganismo versatilidade metabólica e adaptação a mudanças do ambiente (AZAM & KHAN, 2018; PANG *et al.*, 2019).

Como patógeno oportunista é a bactéria mais comum associada a infecções IRAS (Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde), como por exemplo, pneumonias associadas a ventilação mecânica (PANG *et al.*, 2019).

No ano de 2016, o microrganismo foi incluído na categoria de prioridade crítica na lista de prioridades para pesquisa e desenvolvimento de novos antimicrobianos para bactérias resistentes, da OMS (Organização Mundial da Saúde) junto de *Acinetobacter baumannii* e outras enterobactérias (TACCONELLI *et al.*, 2017).

A *P. aeruginosa*, além de exibir alta resistência a diversos antimicrobianos, é capaz de produzir e secretar diversos fatores de virulência, denominados como estratégias para exercer competitividade e obtenção de nutrientes, sendo os principais o lipopolissacarídeo (LPS), flagelo, pili, sideróforos e seis tipos de sistemas de secreção. Também é capaz de formar biofilmes e se utilizar de quorum-sensing (LEITÃO, 2020; QIN *et al.*, 2022).

Em adição a estes, a bactéria também é capaz de produzir pigmentos como a piocianina, uma fenazina azul e não fluorescente; a pioverdina, um sideróforo fluorescente com papel na obtenção de ferro; e piorrubina e piomelanina, pigmentos não fluorescentes na coloração vermelho e marrom (LAU *et al.*, 2004; ORLANDI *et al.*, 2015).

Além da resistência, virulência e pigmentação, o microrganismo pode estar presente também nas variantes mucoides, não mucoides e SCV (*Small colony variant*) (WEI *et al.*, 2011).

Na aquisição inicial da bactéria, a mesma apresenta sua morfologia não-mucoide, isto é, sem a presença de mutações que causam a superprodução do exopolissacarídeo alginato. Na sua variante mucoide, diversas mutações causam esta produção excessiva do alginato. Esta variante é associada com má prognose de FC, manifestando-se como declínio na função pulmonar e mortalidade aumentada. Culturas onde ambas variantes estejam presentes apresentam maior resistência a antimicrobianos inatos, como espécies reativas de oxigênio e antibióticos peptídicos catiônicos (MALHOTRA, HAYES JR & WOZNIK, 2019). A variante SCV, quando comparada a forma selvagem, demonstra resistência a antibióticos aumentada, melhora na capacidade de formação de biofilmes, motilidade reduzida e

comportamento de crescimento agregado lento. É associada a infecções crônicas em pacientes com FC, tornando quase impossível sua erradicação (WEI *et al.*, 2011).

Resistência aos antimicrobianos

A grande capacidade de *P. aeruginosa* perdurar em diferentes ambientes, deve-se não só a seu grande repertório metabólico e mecanismos patogênicos, mas também, a sua reduzida susceptibilidade a diversos antimicrobianos e desinfetantes (SUBEDI, VIJAY & WILLCOX, 2017).

As bactérias podem usar de diversos meios para apresentarem-se resistentes a ação de drogas antimicrobianas, como a diminuição na permeabilidade de membrana, expressão de sistemas de efluxo, produção de enzimas que inativam os antimicrobianos e modificações no sítio alvo da droga. *P. aeruginosa* exibe grande parte destes mecanismos através de determinantes intrínsecos ou através de DNA exógeno e plasmidial, afetando grande parte das classes de antimicrobianos, como β -lactâmicos, como os carbapenêmicos, aminoglicosídeos, quinolonas e polimixinas (MIYOSHI-AKIYAMA *et al.*, 2017; BASSETTI *et al.*, 2018).

As cepas de *P. aeruginosa* podem ser classificadas em resistente a múltiplas drogas (*multidrug-resistant*, *MDR*), quando a resistência é observada em um ou mais agentes, em três ou mais classes de drogas testadas; resistência extensiva (*extensively drug-resistant*, *XDR*), quando apresenta sensibilidade a um ou mais agentes em até duas categorias de antimicrobianos testadas; e pandroga resistente (*pandrug-resistant*, *PDR*), quando a cepa não é sensível a nenhuma droga antimicrobiana testada (MAGIORAKOS *et al.*, 2012; BASSETTI *et al.*, 2018).

Dentre as opções terapêuticas no tratamento de *P. aeruginosa*, os carbapenêmicos são considerados terapias de primeira linha para doenças causadas por *P. aeruginosa*. Contudo, com o uso contínuo destes, houve a seleção de mecanismos de resistência aos carbapenêmicos (LABARCA *et al.*, 2014). A resistência a esta classe, pode ser mediada por mecanismos como a produção de enzimas hidrolíticas, como as carbapenemases, diminuição da permeabilidade devido a

mutações em porinas e superexpressão de bombas de efluxo (GNIADEK, CARROLL & SIMNER, 2016).

O estudo de Cai e colaboradores (2017), além de reiterar o reconhecimento da OMS sobre a importância tanto de *A. baumannii* quanto de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos, aponta que ambos estão associados a piora no quadro de doença e maior mortalidade quando comparados a *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenêmicos, como *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*.

As carbapenemases são enzimas hidrolíticas utilizadas para impedir a ação de drogas carbapenêmicas, inativando ou hidrolisando seu meio de ação. Os genes para as mesmas normalmente estão codificados em plasmídeos auto conjugativos (NORDMANN & POIREL 2013). A classificação de Ambler (1980) é utilizada como uma forma de classificar essas β -lactamases de A à D.

Na classe A, há baixa prevalência de enzimas consideradas carbapenemases, com a mais prevalente dentro destas a KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*) (DUIN & DOI, 2017); as β -lactamases de classe B, são conhecidas como metallo- β -lactamases (MBL) e as principais carbapenemases dentro desta classificação são VIM (*Verona Imipenemase*), NDM (*New Delhi metallo- β -lactamase*) e IMP (*Imipenemase*); as β -lactamases de classe C, amplamente distribuídas em gram-negativos, os quais codificam no cromossomo o gene *ampC*, que em condições normais não é expresso, porém, por indução de β -lactâmicos, o mesmo poderá ser. As β -lactamases de classe C não são carbapenemases, porém, sua ação combinada com a redução da permeabilidade por porinas, as permite sequestrarem os carbapenêmicos antes de atingirem as PBPs (*Penicillin binding proteins*); as β -lactamases de classe D, são conhecidas como oxacilinase (OXA). Deste grupo OXA, cinco exemplares são conhecidos como carbapenemases, OXA-23, OXA-24/40, OXA-48, OXA-51 e OXA-58 (NORDMANN & POIREL, 2019; TOOKE *et al.*, 2019).

Dentre as β -lactamases capazes de inativar os carbapenêmicos em *P. aeruginosa*, a revisão epidemiológica de Escandón-Vargas e colaboradores (2017) reportou a presença de KPC, GES (*Guiana extended-spectrum β -lactamase*), IMP, VIM, NDM e SPM (*São Paulo metallo- β -lactamase*) em *P. aeruginosa* na América Latina e Caribe. Além destas, o microrganismo também pode apresentar enzimas da classe D, como as enzimas OXA-48 (TENOVER, NICOLAU & GILL, 2022).

Na membrana externa de *P. aeruginosa* há canais especializados em realizar troca de nutrientes com o meio interno com formatos similares a poros, denominados porinas. Devido à ausência de porinas gerais e largas, *P. aeruginosa* possui apenas 8% de permeabilidade da membrana externa quando comparada com *E. coli*, conferindo além da baixa permeabilidade para absorção de nutrientes, resistência a algumas classes de antimicrobianos (CHEVALIER *et al.*, 2017).

Em *P. aeruginosa* estão presentes diversas porinas, como oprF, oprG, oprH, oprO, oprP e oprD. Dentre estas, a família oprD, compostas por 19 membros, são responsáveis por facilitar a difusão de aminoácidos básicos, pequenos peptídeos e de drogas carbapenêmicas para a célula (CHEVALIER *et al.*, 2017; MUDERRIS *et al.*, 2017).

A produção de porinas da família oprD deficientes resulta em alterações na permeabilidade de antimicrobianos absorvidos por esta família, como os carbapenêmicos, levando ao microrganismo a apresentar baixa susceptibilidade a esta classe. O aumento da não susceptibilidade do microrganismo a classe pode aumentar em diversas vezes quando apenas a modificação nas porinas está presente, sendo capaz de aumentar a concentração inibitória mínima (CIM) de imipenem de 1-2 mg/L para 8-32 mg/L e de meropenem de 0,12-0,25 para 2-4 mg/L (LIVERMORE, 2001; FLUIT *et al.*, 2018; NGUYEN *et al.*, 2018).

Outra classe de porinas, as opdP, são extremamente similares as porinas oprD, possuindo a mesma função de facilitar a difusão de aminoácidos básicos, pequenos peptídeos e drogas carbapenêmicas, e quando estão ausentes devido a alguma mutação, junto das porinas oprD, diminuem drasticamente a susceptibilidade aos carbapenêmicos, porém, sua ausência por si só, não gera mudanças na susceptibilidade, visto que a principal entrada para estas drogas são as porinas oprD (SONNLEITNER *et al.*, 2020).

Outra importante forma de resistência aos antimicrobianos, são as bombas de efluxo, proteínas transportadoras envolvidas na excreção de substâncias tóxicas para as células. Além disto, contribuem para a resistência intrínseca a antimicrobianos e podem ser divididas em cinco classes: MFS (*Major facilitator superfamily*), família RND (*Resistance-nodulation division*), família ABC (*ATP binding cassette*), família SMR (*Small multidrug resistance*) e família MATE (*Multi-drug and toxic compound extrusion*) (PUZARI & CHETIA, 2017).

Dentre as famílias de bombas de efluxo, a mais comum em *P. aeruginosa* é a família RND. Bombas de efluxo desta família abrangem o espaço periplásmico com três proteínas, uma transportadora de membrana citoplasmática RND, uma proteína de membrana de fusão e uma proteína de membrana externa e sua ação ocorre através do monitoramento dos níveis de metabólitos acumulados e expulsão dos mesmos antes que cheguem a níveis tóxicos (PUZARI & CHETIA, 2017; NGUYEN *et al.*, 2018; TAFTI *et al.*, 2020).

As principais bombas de efluxo da família RND encontradas em *P. aeruginosa* ligadas a resistência aos antimicrobianos são as MexAB-oprM, MexCD-oprJ, MexEF-oprN e MexXY-oprM. A capacidade de excreção de antimicrobianos por estas bombas de efluxo está em grande parte relacionada a mutações em genes e proteínas reguladoras das mesmas. Todas estão relacionadas com a expulsão de β -lactâmicos e carbapenêmicos, exceto MexEF-oprN, a qual não exporta β -lactâmicos, apenas imipenem (GLEN & LAMONT, 2021).

Devido ao aumento da resistência aos antimicrobianos, as polimixinas têm sido reintroduzidas na clínica com o intuito de eliminar infecções ocasionadas principalmente por bacilos gram-negativos com perfil de resistência MDR, como *P. aeruginosa* e *A. baumannii* resistente a carbapenêmicos (SCOTT *et al.*, 2019).

Duas drogas desta família estão disponíveis para uso clínico, a polimixina B e a colistina (polimixina E). Seu uso é extremamente controlado e em pacientes com FC, recomendado apenas como última escolha de tratamento, visto que ambas possuem efeitos nefrotóxicos (HORCAJADA *et al.*, 2019).

Ambas as drogas possuem estruturas moleculares similares, com apenas um aminoácido alterado em seu anel peptídico. As polimixinas são positivamente carregadas, permitindo a interação com fosfatos no lipídio A do LPS bacteriano, que é carregado negativamente. Esta interação resulta na ruptura da membrana celular bacteriana (HORCAJADA *et al.*, 2019).

A resistência as polimixinas em *P. aeruginosa* podem ocorrer através de alterações no lipídio A do LPS bacteriano, através da expressão de bombas de efluxo e proteínas de membrana externa, para a expulsão da droga do meio e pode ocorrer através da aquisição de DNA exógeno, como o gene *mcr* (*Mobilized colistin resistance*), codificados normalmente em DNA plasmidial (TAHMASEBI, DEHBASHI & ARABESTAN, 2019; KIM *et al.*, 2021).

Alterações na interação necessária das polimixinas com o LPS são as formas mais comuns de resistência as polimixinas. A superexpressão, através de mutações, do operon *arn*, o qual codifica enzimas para a adição de L-Ara4N (4-amino-4-deoxy-L-arabinosa) ao lipídio A, resulta em redução da afinidade por cargas positivas do LPS e por conseguinte, aumento da resistência contra a droga (LO SCIUTO *et al.*, 2020).

Outra alteração é a ativação de sistemas de dois componentes (*Two-component systems*, TCSs) como *phoP/phoQ*, *pmrA/pmrB*, *colR/colS*, *cprR/cprS* e *parR/parS* presentes em *P. aeruginosa* através de mutações. A ativação de *pmrAB*, leva a regulação positiva do operon *arnBCADTEF-pmrE*, o qual medeia a síntese e transferência de L-Ara4N para o lipídio A; o sistema *phoPQ*, através de alterações, é capaz de ativar a regulação positiva do operon *arnBCADTEF-pmrE*; os sistemas *colRS* e *cprRS*, são capazes de realizar interações com o sistema *phoPQ*, ativando este; e por último, o sistema *parRS* é capaz de ativar o operon *arnBCADTEF-pmrE* independente do sistema *pmrAB*, resultando a resistência a polimixinas (OLAITAN, MORAND & ROLAIN, 2014).

Em acréscimo das modificações no lipídio A, *P. aeruginosa* também pode utilizar a proteína de membrana externa *oprH* para adquirir resistência a polimixinas. A transcrição de *oprH* pode ser induzida pelo TCSs *phoP/phoQ* e sua resistência se dá através da ligação a sítios catiônicos de Mg^{2+} do LPS, esta ligação incapacitará a polimixina de se ligar nestes sítios, impedindo sua ação (SKIADA *et al.*, 2011; OLAITAN, MORAND & ROLAIN, 2014).

O estudo de Puja e colaboradores (2020) obteve sucesso em comprovar a participação positiva da bomba de efluxo *MexXY-oprM* na resistência a polimixina, uma vez que mutações no gene *parR*, podem ativar a expressão tanto da bomba quanto do operon *arn*. Caso o LPS bacteriano entre em contato com a droga, este será carregado com Ara4N e ocorrerá a ativação da bomba de efluxo por *parR* e expulsão da droga.

Além de resistência intrínseca, Liu e colaboradores (2016) detectaram a presença de genes móveis de resistência a colistina presente em plasmídeos em amostras *E. coli* oriundas de carne animal na China entre os anos de 2011 à 2014. Verificou-se também, a capacidade desses plasmídeos serem mobilizados para *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* através de conjugação.

O gene *mcr* já foi detectado em cinco continentes diferentes e em diversos países além da China, como Brasil, Alemanha e Vietnã, e além disto, genes de resistência a colistina, foram detectados em plasmídeos carregando carbapenemases e β -lactamases de espectro estendido, podendo desenvolver perfis de resistência a diversas classes de antimicrobianos (WANG *et al.*, 2018; HUSSEIN *et al.*, 2021).

Até o presente momento, 10 genes relacionados a *mcr* já foram datados (1-10), sendo o *mcr-1*, o primeiro e mais abundante destes. Todos os genes *mcr* têm maneiras homólogas de tornar o microrganismo resistente a colistina, visto que codificam enzimas fosfoetanolamina transferase, que são capazes de se ligar a fração fosfoetanolamina (PEtN) do lipídio A em gram-negativos, diminuindo a carga negativa e assim, a ação das polimixinas (HUSSEIN *et al.*, 2021).

O estudo de Hameed e colaboradores (2019) obteve sucesso ao reportar pela primeira vez a presença de plasmídeos codificando o gene *mcr-1* em cepas clínicas resistentes de *A. baumannii* e *P. aeruginosa* no Paquistão. No Brasil, o estudo de Nitz e colaboradores (2021) investigou o perfil de resistência de 99 isolados de *P. aeruginosa* com os perfis MDR e XDR de dois hospitais de São Luiz, Maranhão. Os pesquisadores reportaram a presença de uma cepa carregando o gene *mcr-1*, que apresentava o perfil de resistência a colistina e sensibilidade apenas a imipenem e meropenem.

Um dos principais mecanismos de resistência a antimicrobianos em *P. aeruginosa* identificado em pacientes com FC, são as mutações cromossômicas e aquisição de DNA exógeno. A resistência a carbapenêmicos, ocorre principalmente devido alterações no gene codificante da porina oprD, as quais podem gerar uma proteína ausente ou sem função e devido a aquisição de enzimas carbapenemases (TAI *et al.*, 2015; SHERRARD *et al.*, 2021). Em relação as polimixinas, não é do nosso conhecimento a existência de publicações reportando cepas de *P. aeruginosa* oriundas de indivíduos com FC carregando o gene *mcr*, até o momento. Baseado nos mecanismos exibidos pelo microrganismo, o principal meio de resistência a esta classe exibido por *P. aeruginosa* recuperadas de indivíduos com FC, possivelmente torna-se as alterações em genes dos TCS (MOSKOWITZ *et al.*, 2012; OLAITAN, MORAND & ROLAIN, 2014; PEDERSEN *et al.*, 2018).

Sequenciamento do Genoma Total

O sequenciamento do genoma total (SGT) têm se tornado a técnica padrão para a investigação de surtos e de tipagem bacteriana. Seus métodos além de permitirem rápida identificação de infecções com alto nível de precisão, também permitem a identificação de genes associados a resistência de antimicrobianos e fatores de virulência relevantes, garantindo velocidade na identificação e manuseio de surtos, não necessitando de múltiplas técnicas moleculares para caracterizar um isolado (BOGAERTS *et al.*, 2021).

Em surtos, diversos protocolos devem ser seguidos, como a realização de técnicas fenotípicas e moleculares para a caracterização e vigilância de patógenos resistentes. Entretanto, estes métodos podem falhar em distinguir cepas muito similares ou características de resistência e virulência devido às limitações nestes testes convencionais, como testes que detectam apenas resistência, mas não genes de virulência. O SGT permite a identificação de características genômicas relevantes, proporcionando a identificação rápida e precisa em surtos (QUAINOO *et al.*, 2017).

Apesar das vantagens do uso do SGT, um dos problemas do mesmo é a necessidade de banco de dados de confiança e profissionais capacitados para suas análises, visto que há a necessidade do manuseio dos dados obtidos. Outro problema na clínica é o fato de os dados obtidos serem apenas qualitativos, prevendo a capacidade do isolado de ser resistente, mas não medindo seu nível de resistência a droga e nem fatores do meio em que se encontra o microrganismo (BALLOUX *et al.*, 2018).

Um exemplo a ser citado do benefício do uso do SGT aliado a clínica, é o trazido por Magalhães e colaboradores (2021), que realizou a combinação de uma técnica de tipificação aliada ao SGT, a fim de tipificar cepas de *P. aeruginosa* obtidas entre os anos de 2010 e 2014. A técnica foi capaz de identificar três tipos de cepas relacionadas a surtos, e então, com a aplicação do SGT, foi possível confirmar suspeitas epidemiológicas acerca das cepas, além da capacidade de diferenciar as cepas relacionadas a surtos e as que não eram relacionadas com grande eficácia. Outros exemplos a serem citados, são os estudos em que foi realizado o SGT em cepas de *P. aeruginosa* e sua eficácia em determinar perfis MDR e XDR e a presença

de genes de resistência transferidos horizontalmente (HERNÁNDEZ-GARCÍA *et al.*, 2021; RUEDAS-LÓPEZ *et al.*, 2021; SINGH *et al.*, 2021).

Clones epidêmicos de *Pseudomonas aeruginosa* em fibrose cística

A aquisição da *P. aeruginosa* em indivíduos com FC ocorre majoritariamente através do contato com ambientes naturais, como água e solo contaminados, porém, estes não são os únicos veiculadores do microrganismo, visto que hospitais, ambientes domésticos, nebulizadores e infecções cruzadas entre pacientes e/ou membros da família também são capazes de veicular e propagar o microrganismo (JACKSON & WATERS, 2020; MOORE *et al.*, 2021).

Acreditava-se que a infecção cruzada de *P. aeruginosa* não ocorria, porém, Pedersen e colaboradores, em 1986, reportaram a disseminação de um clone de *P. aeruginosa* resistente a antimicrobianos no ambiente pediátrico e em seguida, em 1996, Cheng e colaboradores, provaram através de técnicas moleculares a existência de cepas de *P. aeruginosa* compartilhada entre pacientes, denominada de *Liverpool epidemic strain* (LES) (PARKINS, SOMAYAJI & WATERS, 2018).

O clone LES é a linhagem mais comum entre os pacientes com FC do Reino Unido e pode ser encontrado em amostras de pacientes da América do Norte, estando presente em mais de um continente. Esta linhagem é associada com maior virulência *in vitro* e piora no quadro do paciente quando comparado com as linhagens selvagens (WILLIAMS *et al.*, 2018).

As linhagens do clone LES (ST146 ou ST683) são competitivas, substituindo outras cepas de *P. aeruginosa*. Dentre as diferentes linhagens, LESB58, foi notificada como uma cepa com maior competitividade *in vivo*, tornando a infecção crônica; LES431 é a cepa com a capacidade de transmissão de pacientes com FC para pacientes não portadores de FC e até animais domésticos como gatos, tornando-os sintomáticos. Ambas possuem alta produção de produtos regulados por quorum-sensing, como piocianina e proteases LasA (CARTER *et al.*, 2010).

O clone MES (*Manchester epidemic strain*, ST217), foi reportado por Jones e colaboradores (2001) em um centro de fibrose cística de Manchester, apresentando resistência a β -lactâmicos, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas sendo apenas

recuperado de amostras de ar e não sendo observado em pacientes não apresentadores de FC; outro clone que circula no Reino Unido é o Midlands-1 (ST148), o qual não demonstra a capacidade de infectar pacientes que apresentem FC e não apresenta concordância em seu perfil de resistência a antimicrobianos (SCOTT & PITT, 2004; CHAMBERS *et al.*, 2005; MARTIN *et al.*, 2013; PARKINS, SOMAYAJI & WATERS, 2018).

O clone C (ST17) compõe um grupo clonal de *P. aeruginosa* encontradas em habitats naturais, principalmente aquático, e clínicos. Comparado a outros clones, não é considerado o mais virulento, entretanto, possui a capacidade de secretar exotoxinas e proteases. É um dos mais abundantes clones de *P. aeruginosa* no mundo, sendo reportado em diversos continentes (KAMAL *et al.*, 2019; LEE *et al.*, 2020).

Outros notáveis clones de *P. aeruginosa* também podem ser citados, como os clones australianos AES-01 (ST649), AES-02 (ST775) e AES-03 (ST242), afetando pacientes com FC na Austrália e Tasmânia. Estes clones afetam apenas pacientes com FC e não foram encontrados em reservatórios ambientais. AES-01 e AES-03 são associados com a resistência a β -lactâmicos, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas enquanto AES-02, a β -lactâmicos e aminoglicosídeos (SMITH *et al.*, 2016; PARKINS, SOMAYAJI & WATERS, 2018).

No Brasil, há a detecção de cepas endêmicas, como relatado por Turano e colaboradores (2016), realizando a detecção da cepa ST277, descrita como endêmica e associada a surtos hospitalares. Costa-Júnior e colaboradores (2021) relataram contaminação cruzada entre pacientes de três clones (C1, C2 e C3) entre os pacientes, entretanto, não há a descrição de clones epidêmicos no Brasil até o presente momento.

1 JUSTIFICATIVA

Pseudomonas aeruginosa isoladas de secreções respiratórias em pacientes com fibrose cística no Brasil, de forma geral, apresentavam-se sensíveis aos antimicrobianos, com poucos casos de amostras resistentes a múltiplas drogas. Entretanto, nos últimos anos, nosso grupo de estudos tem observado um aumento nas taxas de resistência em *P. aeruginosa* obtidas de pacientes assistidos em dois centros de referência na cidade do Rio de Janeiro, incluindo o aumento de amostras resistentes a carbapenêmicos e polimixina B.

Um dos grandes problemas deste cenário, é o aparecimento de microrganismos exibindo uma alta capacidade de resistência a diversas drogas, resultando em dificuldade no tratamento e na erradicação dos microrganismos especialmente para polimixina B, que além de ser usada por via inalatória no esquema de erradicação quando da primo infecção por *P. aeruginosa*, também faz parte dos esquemas de associação de drogas nos quadros de exacerbações pulmonares.

A análise do ambiente genético de amostras de *P. aeruginosa* com resistência a polimixina B, permitirá o entendimento dos diversos mecanismos de resistência aos antimicrobianos, além de subsidiar o entendimento da circulação desses perfis entre os pacientes brasileiros e possíveis relações com cepas epidêmicas de FC observado em outros países.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar o ambiente genético da resistência aos antimicrobianos de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a polimixina B obtidas de secreções respiratórias de pacientes com fibrose cística.

2.2 Objetivos específicos

- a) Estabelecer o perfil de susceptibilidade das amostras aos antimicrobianos de interesse clínico e estabelecer a ocorrência de perfis de resistente a múltiplas drogas ou resistência extensiva;
- b) Determinar a concentração inibitória mínima para a polimixina B através do teste padrão ouro e um teste comercial;
- c) Realizar o sequenciamento do genoma total (SGT) nas amostras selecionadas;
- d) Depositar o genoma completo das cepas de *P. aeruginosa* sequenciadas no banco de dados genômicos GenBank;
- e) Analisar nas amostras de *P. aeruginosa* quanto a presença de genes de resistência e presença de plasmídeos com o uso de ferramentas de bioinformática;
- f) Determinar o *sequence type* (ST) das cepas de *P. aeruginosa* por meio de SGT e sua relação com clones epidêmicos de FC.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Pacientes e critério de seleção

Para a realização deste estudo, 10 amostras de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a polimixina B foram selecionadas de um estudo previamente conduzido em nosso grupo (ALMEIDA *et al.*, 2021) sendo oriundas de cinco pacientes com fibrose cística (FC) e coletadas em dois centros hospitalares de referência no atendimento a pacientes com FC do Rio de Janeiro, a Policlínica Piquet Carneiro (PPC) do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE), e o Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira (IFF/Fiocruz). As amostras foram obtidas entre os períodos de 2010 a 2014, sendo 9 amostras obtidas de escarro e 1 de *swab*. Este projeto de estudo foi aprovado pelo comitê de ética do Hospital Universitário Pedro Ernesto sob o CAAE: 79547616.1.0000.5259.

Quadro 1 – Distribuição dos pacientes e amostras de *Pseudomonas aeruginosa* entre as clínicas de origem.

Paciente	Nº de amostras	Nº da amostra	Data do isolamento	Origem
1	1	9876	27/01/2010	IFF
2	4	10705	16/08/2010	IFF
		17138	12/11/2013	
		17749	31/03/2014	
		17801	07/04/2014	
3	3	11227	03/12/2010	PPC
		14297	23/02/2012	
		17973	21/05/2014	
4	1	14339	01/03/2012	IFF
5	1	17828	24/04/2014	IFF

Fonte: O autor, 2023.

3.2 Estoque bacteriano

Todas as amostras utilizadas neste estudo foram estocadas no meio *Skin Milk* (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, Estados Unidos), composto de leite desnatado a 10% e glicerol a 10% e mantidas na temperatura de -20°C até a realização de testes para avaliar sua pureza e identificação em *P. aeruginosa* através de provas fenotípicas.

3.3 Identificação das amostras

As amostras estudadas foram previamente identificadas no Laboratório de Bacteriologia do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE) da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), utilizando-se de provas fenotípicas como a capacidade de metabolizar a glicose por via oxidativa (não fermentadora), produção de oxidase (positiva), a motilidade (positiva), a descarboxilação da lisina (negativa), descarboxilação de arginina (positiva) e crescimento a 42°C (positiva) (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA, 2004).

3.4 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

3.4.1 Teste Disco-Difusão

O teste disco-difusão (TDD) foi realizado através da metodologia indicada no manual M02 *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests* do *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2018) utilizando o meio de cultura Müeller-Hinton Ágar (Kasvi, Paraná, Brasil). Os seguintes antimicrobianos foram testados piperacilina-tazobactam (100-10 µg), ceftazidima (30 µg), cefepime (30 µg), meropenem (10 µg), imipenem (10 µg), doripenem (10 µg), aztreonam (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), amicacina (30 µg) e tobramicina (10 µg) (Becton, Dickinson and Company, BD, Sparks, Nevada, Estados Unidos). A interpretação dos resultados foi feita através da indicada no manual M100 *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing* do CLSI (2021) utilizando a cepa de referência *P. aeruginosa* ATCC® 27853 para o controle de qualidade.

3.4.2 Concentração Inibitória Mínima

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada para aferir a sensibilidade das amostras ao sulfato de polimixina (Sigma, St. Louis, Missouri,

Estados Unidos) seguindo as recomendações do manual M07 *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically* (CLSI, 2018). Foi utilizado o sistema de triplicatas a fim de se obter um resultado preciso do teste.

A técnica empregada foi a de microdiluição em caldo, sendo transferido o volume de 100 µL de caldo Müller-Hinton cátion-ajustado (CAMHB) nos poços de uma placa de poliestireno de 96 poços com fundo em “U”. Nesta placa são dispostos 8 poços na vertical, sendo estes referentes as amostras testadas e 12 poços na horizontal, referentes as concentrações do antimicrobiano.

Todos os poços devem conter o CAMHB e as concentrações do antimicrobiano testado, com exceção de um poço em cada fileira vertical, o qual deverá conter apenas o caldo, livre do antimicrobiano, sendo este chamado de controle de crescimento positivo. Os demais poços, foram inoculados com as concentrações de antimicrobiano definidas no Quadro 2.

Quadro 2 – Descrição da cepa controle utilizada, concentrações do sulfato de polimixina definidas para o uso entre as amostras e faixa de crescimento aceitável da cepa controle na determinação da concentração inibitória mínima.

Cepa controle	Diluições (µg/mL)	Faixa aceitável de crescimento da cepa controle
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853	128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25 e 0,125	0,5 µg/mL – 2,0 µg/mL

Fonte: O autor, 2023.

3.4.2.1 Preparo do meio de cultura

O preparo do caldo CAMHB foi realizado seguindo instruções do manual M07 (CLSI, 2018). O meio utilizado foi o caldo Müller-Hinton (HiMedia Laboratories®, Pensilvânia, Estados Unidos) havendo necessidade de suplementar os cátions de Ca^{++} e Mg^{++} .

Para a suplementação do CAMHB, foram dissolvidas 3,68g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em 100 mL de água deionizada e 8,36g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ em 100 mL de água deionizada, obtendo-se duas soluções com 10 mg de Ca^{++}/mL e 10 mg de Mg^{++}/mL .

Deve-se adicionar 0,1 mL da solução de Ca^{++} e 0,05 mL da solução de Mg^{++} para cada litro de caldo Müeller-Hinton a fim de se obter o CAMHB.

3.4.2.2 Preparo da solução do agente antimicrobiano

O preparo da solução do agente antimicrobiano foi realizado através da equação abaixo. As diluições do agente antimicrobiano no CAMHB utilizadas foram as de 128 $\mu\text{g/mL}$, 64 $\mu\text{g/mL}$, 32 $\mu\text{g/mL}$, 16 $\mu\text{g/mL}$, 8 $\mu\text{g/mL}$, 4 $\mu\text{g/mL}$, 2 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$, 0,5 $\mu\text{g/mL}$, 0,25 $\mu\text{g/mL}$ e 0,125 $\mu\text{g/mL}$ de sulfato de polimixina.

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

Para as diluições, 200 μL de CAMHB foram adicionados no primeiro poço da placa de poliestireno de 96 poços com fundo em “U” contendo o agente antimicrobiano e 100 μL livres do agente antimicrobiano nos outros poços. Realizou-se então uma diluição seriada, recolhendo 100 μL do primeiro poço e adicionando aos demais sucessivamente até o penúltimo poço, que após a diluição, o excedente foi descartado, mantendo o último poço como o controle de crescimento livre do agente antimicrobiano.

3.4.2.3 Preparo do inóculo

O preparo do inóculo se deu através da suspensão direta de colônias bacterianas. Utilizando culturas bacterianas recentes (<24 horas), foram realizadas suspensões em soluções de salina 0,9% a fim de obter a turbidez padronizada 0,5 McFarland (1×10^8 UFC/mL). A suspensão foi então diluída a 1:10 para se obter a diluição de 10^7 UFC/mL.

Após o preparo do inóculo, foi utilizado 5 μL da diluição de 10^7 UFC/mL das amostras bacterianas em seus respectivos poços pré-determinados na placa de poliestireno de 96 poços para a inoculação.

3.4.2.4 Incubação da placa e identificação da Concentração Inibitória Mínima

A incubação da placa de poliestireno de 96 poços com fundo em “U”, após a inoculação, ocorreu a 35°C em uma estufa em aerobiose por 16-20 horas. A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida pela observação do crescimento bacteriano, onde a menor concentração capaz de inibir o crescimento dos microrganismos era determinada como a CIM para a amostra.

3.4.3 Teste comercial POLICIMBAC

O teste comercial POLICIMBAC (Probac do Brasil, São Paulo, SP, Brasil) é um sistema de microdiluição que é destinado à determinação da CIM de polimixina B para bacilos gram-negativos, sendo composto por um painel com 12 cavidades horizontais e 2 linhas verticais, onde cada linha possibilita o teste para uma amostra bacteriana. A cavidade identificada como CC é destinada ao controle de crescimento positivo da amostra, onde não há inserção de antimicrobiano e a cavidade de número 12, é o controle negativo, onde não se deve inocular o microrganismo (Figura 2).

Figura 2 – Painel do teste POLICIMBAC para a determinação da concentração inibitória mínima de polimixina B.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
B	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	CC	
	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	CC	

Fonte: Probac do Brasil.

O teste foi realizado conforme instruções do fabricante. Disponível em probac.com.br/Anexos/Bulas/Meios%20Susceptibilidade/Policimbac%20-%20Rev%2000.pdf e descrito resumidamente abaixo.

3.4.3.1 Preparo do inóculo

Culturas bacterianas recentes (<24 horas) foram suspensas em salina 0,9% a fim de obter a turbidez padronizada de McFarland (1×10^8 UFC/mL). Uma diluição 1:100 foi realizada neste tubo, obtendo a suspensão de 10^6 UFC/mL e uma nova diluição foi operada em um novo tubo de ensaio, obtendo a suspensão de 10^5 UFC/mL.

3.4.3.2 Inoculação, incubação e identificação da Concentração Inibitória Mínima

A inoculação no painel foi feita através da suspensão de 10^5 UFC/mL, inoculando 100 µL da suspensão nas cavidades de controle de crescimento (CC) e nas cavidades de 0,125 µg/mL a 64 µg/mL. A cavidade “12” não deve ser inoculada no intuito de se realizar o controle negativo do teste.

Para incubação, o teste deve ser colocado na embalagem original e incubado por 24 horas em aerobiose numa estufa a $35^\circ \pm 2^\circ\text{C}$. A cepa de referência de controle de qualidade utilizada foi a ATCC® *P. aeruginosa* 27853 com a faixa de crescimento aceitável entre 0,5 µg/mL e 2 µg/mL.

O meio de cultura do teste dispõe do Cloreto de 2,3,3- Trifeniltetrazólio, que facilita a determinação da CIM pela modificação da coloração para vermelho do crescimento microbiano.

A CIM foi definida através da observação do crescimento bacteriano, onde a menor concentração capaz de inibir o crescimento dos microrganismos era determinada como a CIM para a amostra.

3.5 Classificação das amostras de *Pseudomonas aeruginosa* em resistente a múltiplas drogas (MDR) e resistência extensiva (XDR)

Para esta etapa, foram adotados critérios adaptados a partir dos estabelecidos por Magiorakos e colaboradores (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 resistentes a um ou mais agentes, em três ou mais categorias de antimicrobianos testados; e XDR, amostras sensíveis a um ou mais agentes em até duas categorias de antimicrobianos testadas (Quadro 3).

Quadro 3 – Categorias e agentes antimicrobianos testados e aplicados para classificação de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a polimixina B nos perfis MDR e XDR.

Categoria de antimicrobiano	Agente antimicrobiano
Aminoglicosídeos	Tobramicina e Amicacina
Carbapenêmicos antipseudomonais	Imipenem, Meropenem e Doripenem
Cefalosporinas antipseudomonais	Ceftazidima e Cefepime
Fluoroquinolonas antipseudomonais	Ciprofloxacina
Penicilinas antipseudomonais + inibidores de β -lactamase	Piperacilina-Tazobactam
Monobactâmicos	Aztreonam
Polimixinas	Polimixina B

Fonte: Adaptado de Magiorakos *et al.*, 2012.

3.6 Obtenção e purificação do DNA

A obtenção e purificação do DNA bacteriano foi realizada a partir de culturas bacterianas recentes (<24 horas) crescidas no meio Müller-Hinton Ágar (Kasvi, Paraná, Brasil) utilizando o kit QIAmp DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Alemanha) seguindo as orientações de protocolo disponíveis em

qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=62a200d6-faf4-469b-b50f-2b59cf738962&lang=en.

Para a realização do método, uma alça de inoculação foi utilizada para transferir a massa bacteriana (2 a 3 colônias) para um tubo de 2 mL contendo o tampão ATL (180 µL) e Proteinase K (20 µL) sendo homogeneizados e incubados a 56°C objetivando a lise celular. Posterior a lise, adicionou-se RNase A (100mg/mL) e novamente o tubo foi homogeneizado e incubado em temperatura ambiente por 2 minutos. Ocorreu a adição do tampão AL (200 µL) ao material seguido de incubação a 70°C por 10 minutos. Adicionou-se 200 µL de etanol (96-100%) ao material e uma nova homogeneização foi necessária. O material homogeneizado foi transferido para um novo tubo com a coluna de filtração fornecida pelo fabricante e centrifugado por 1 minuto. Este tubo contendo o material centrifugado foi descartado, mantendo apenas a coluna, a qual estava presente o material biológico. Este processo de centrifugação e descarte de tubo contendo o material filtrado se deu para os tampões AW1 (500 µL), AW2 (500 µL) e AE (200 µL), sendo que neste último, a coluna foi descartada e o tubo contendo o DNA purificado foi armazenado.

3.7 Sequenciamento do genoma total de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a polimixina B

Após a obtenção do DNA purificado, as amostras de *P. aeruginosa* foram submetidas ao sequenciamento do genoma total (SGT), sendo inicialmente, o DNA armazenado quantificado através do sistema QuantiFluor® (Promega, Madison, Wisconsin, Estados Unidos) e diluído até a concentração final de 2 ng/µL seguindo o protocolo disponível no endereço <https://www.promega.com.br/products/rna-analysis/dna-and-rna-quantitation/quantifluor-one-dsdna-system/?catNum=E4870#protocols>.

Para a quantificação do DNA, foi realizada uma solução de trabalho com o reagente disponibilizado e em seguida, 200 µL desta solução foram adicionados a tubos do tipo Eppendor de 0,5 mL. Posterior, 2 µL de DNA foram adicionados ao tubo que foi homogeneizado e incubado a 25°C por 5 minutos em temperatura ambiente, protegido da luz, para então o DNA ser quantificado.

3.7.1 Preparo das bibliotecas genômicas

As bibliotecas genômicas foram criadas por meio do kit Nextera XT DNA Library Preparation (Illumina Inc, Califórnia Estados Unidos) seguindo as recomendações do fabricante disponível em <https://www.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/nextera-xt-dna.html>. Posterior a isto, foram sequenciadas pelo método de sequenciamento por síntese da plataforma Illumina no equipamento *MiSeq System* (Illumina Inc, Califórnia, Estados Unidos) no Laboratório de Genoma Bacteriano (LabGen) da Faculdade de Ciências Médicas/HUPE.

3.7.2 Fragmentação e marcação do DNA genômico

O material genético foi fragmentado e marcado de forma simultânea com adaptadores específicos nas extremidades 5' e 3' dos fragmentos recém-criados. Esta etapa ocorreu por reação enzimática, com a adição posterior a reação de 10 µL de tampão TD e 5 µL de DNA genômico diluído à concentração de 2 ng/µL em cada poço de uma placa de microtitulação de 96 poços. Em seguida, foram adicionados 5 µL de uma mistura para PCR (ATM), homogeneizado e centrifugado por 1 minuto. A placa foi então disposta em um termociclador (*Applied Biosystems™, Waltham, Massachusetts*, Estados Unidos) e foi iniciado o ciclo "Tagmentação" a 55°C por 5 minutos. Após este ciclo, foram adicionados 5 µL de tampão *Neutralize Tagment* (NT) em cada poço da placa de microtitulação e homogeneizados com uma micropipeta e em seguida, centrifugados por 1 minuto e então, incubados a 25°C por 5 minutos.

3.7.3 Amplificação do DNA fragmentado

Para a amplificação do DNA fragmentado e marcado, foi utilizado um programa de PCR de ciclo limitado, adicionando os índices adaptadores para a geração dos *clusters* no sequenciamento, sendo adicionados 5 μ L dos adaptadores Index, que realizaram a identificação das amostras e favoreceram a ligação do DNA. Posterior a esta, 15 μ L da mistura para PCR Master Mix (NPM) foram adicionados em cada poço contendo os adaptadores e então, homogeneizados e centrifugados por 1 minuto. Após a centrifugação, a placa de microtitulação foi condicionada em pré-programa para a realização da PCR, sendo 72°C por 3 minutos, 95°C por 30 segundos, seguido de 12 ciclos de amplificação (95°C por 10 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos) e então, 72°C por 5 minutos e mantida a 4°C.

3.7.4 Purificação das bibliotecas genômicas

As bibliotecas de DNA recém preparadas foram purificadas através do kit *AMPure XP beads* (Illumina Inc, Califórnia, Estados Unidos), sendo as beads homogeneizadas inicialmente a fim de se garantir sua distribuição uniforme. Após este passo, a placa de microtitulação de 96 poços contendo a biblioteca de DNA foi mantida em temperatura ambiente por 1 minuto e então, 50 μ L de cada poço foram transferidos para novos poços da placa de microtitulação e 30 μ L de *AMPure XP beads* foram adicionados em cada poço. A placa foi incubada a 25°C por 5 minutos e então colocada em um suporte magnético até que o conteúdo se clarifique (aproximadamente 2 minutos) e posterior a isto, o sobrenadante foi removido. Após a remoção do sobrenadante, foi realizada uma lavagem de cada poço da placa, adicionando 200 μ L de álcool etílico a 80% (Sigma, São Paulo, Brasil) para sua evaporação completa em temperatura ambiente. Foram então, adicionados 50 μ L do tampão de ressuspensão (RSB) e o material homogeneizado e incubado a 25°C por 2 minutos. A placa foi condicionada no suporte magnético novamente até que seu conteúdo clarifique e então, 50 μ L do sobrenadante foram transferidos para uma nova placa de 96 poços.

3.7.5 Normalização e mistura das bibliotecas

As bibliotecas genômicas foram quantificadas como descrito no tópico 3.7 e normalizadas em 725 pb (pares de base), a fim de garantir uma representação homogênea na amostra agrupada. Foi então realizado uma mistura destas, consistindo na transferência de volumes iguais de cada biblioteca normalizada para um microtubo de 1,5 mL e então, homogeneizado por inversão. O volume final de 1,3 mL de mistura de bibliotecas a 15 pM, diluídas e desnaturadas, foram então, adicionados ao *MiSeq Reagent Kit* v2 (500-cycles) e introduzidas no equipamento *MiSeq Systema* (Illumina Inc, Califórnia, Estados Unidos), com a cobertura de 40 x, gerando dois arquivos do tipo *paired-end* contendo a fita *foward* (*read 1*) e a fita *reverse* (*read 2*) na extensão “fastq”.

3.7.6 Trimagem das reads e montagem dos genomas

Os arquivos do tipo *paired-end* contendo as *reads* obtidos pelo sequenciamento tiveram a qualidade avaliada através do programa FastQC v.0.11.9 (ANDREWS, 2010), a fim de identificar potenciais problemas através da análise do conteúdo GC e excessos de sequências repetitivas.

As *reads* foram trimadas e os genomas montados *de novo* utilizando a plataforma *Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center* (BV-BRC) (bv-brc.org) a qual utilizou a ferramenta TrimGalore (bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/) para a trimagem, e os métodos *Unicycler* v.0.4.8 (WICK *et al.*, 2017) e o *SPAdes* v.3.13.0 (BANKEVICH *et al.*, 2012) para a montagem, optando pelo tamanho mínimo dos *contigs* de 500 pb. A montagem teve sua qualidade avaliada pela ferramenta *QUAST* v.5.0.2 (GUREVICH *et al.*, 2013) na plataforma BV-BRC.

3.8 Análise de Bioinformática

Após a trimagem e montagem, os genomas foram submetidos a anotação nas plataformas *Rapid Annotation Subsystem Technology* (RAST) (rast.nmpdr.org/rast.cgi) e BV-BRC, o que permitiu a identificação de diversos componentes do mesmo, como genes de RNA transportador (tRNA), genes de RNA ribossômico (rRNA), genes codificadores de proteínas e a investigação de genes relacionados a resistência a antimicrobianos.

Para a investigação da integridade de sequências de nucleotídeos e aminoácidos, o serviço *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) foi empregado, utilizando suas ferramentas BLASTn (nucleotídeos) e BLASTp (proteínas).

Na busca de genes de resistência extrínseca, a ferramenta *ResFinder* (cge.food.dtu.dk/services/Resfinder/) pertencente ao *Center for Genomic Epidemiology* (CGE) foi empregada. Para a busca de resistência intrínseca, as bases de dados *Applying Pathosystems Resource Integration Center* (PATRIC), *Comprehensive Antibiotic Resistance Database* (CARD) (<https://card.mcmaster.ca/>), e *National Database of Antibiotic Resistance Organisms* (NDARO) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/antimicrobial-resistance/>) foram utilizadas através da plataforma BV-BRC, obtendo-se a sequência de nucleotídeos dos genes de interesse e permitindo seu alinhamento com a cepa de referência *P. aeruginosa* PAO1 (GCA_000006765.1) através do programa de alinhamento *Bioedit* (bioedit.software.informer.com/7.2/), permitindo então a busca de mutações nas sequências gênicas analisadas.

A presença de plasmídeos foi averiguada através da plataforma *Galaxy Australia* (usergalaxy.org.au) a qual abriga diversas ferramentas de análises de bioinformática. Dentre estas, as ferramentas *plasmidSPAdes* v.3.9.0 (ANTIOPOV *et al.*, 2016) foi utilizada para a montagem dos plasmídeos e a ferramenta *Bakta* v.1.5.0 (SCHWENGERS *et al.*, 2021) para a anotação dos mesmos, possibilitando a identificação de genes de interesse dentro dos plasmídeos.

A ferramenta *DNAPlotter* (CARVER *et al.*, 2009) foi executada dentro do programa *Artemis* (sanger.ac.uk/tool/artemis/) permitindo a visualização dos

plasmídeos encontrados de forma circular e viabilizando a geração de mapas de plasmídeos circulares nas dez amostras pesquisadas.

Para a tipificação molecular, a plataforma *Public Databases for Molecular Typing and Microbial Genome Diversity* (PubMLST) (pubmlst.org/) foi empregada a fim de se determinar o *sequence type* (ST) das amostras, assim como sua diversidade genômica, realizando a comparação de relação dos STs encontrados com os de clones epidêmicos relacionados a FC, utilizando a ferramenta *Grapetree* (ZHOU *et al.*, 2018) presente na própria plataforma.

4 RESULTADOS

4.1 Perfil de resistência aos antimicrobianos

4.1.1 Teste Disco-Difusão

Foram estudadas dez amostras de *P. aeruginosa* resistentes a polimixina B isoladas de cinco pacientes, oriundas de dois centros de referência para o tratamento a pacientes com FC.

Entre os antimicrobianos testados, os maiores números de amostras resistentes, foram observados para imipenem (9 de 10) e meropenem (8 de 10). Excluindo ceftazidima, os demais antimicrobianos apresentaram resistência em pelo menos metade das amostras. Não se observou nenhuma amostra sensível a todos os antimicrobianos testados (Tabela 1).

Tabela 1 – Número de amostras resistentes aos antimicrobianos em *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a polimixina B.

Agente antimicrobiano	IFF (n)	PPC (n)	Total (n)
Piperacilina-tazobactam (PPT)	4	2	6
Ceftazidima (CAZ)	2	2	4
Cefepime (FEP)	4	2	6
Meropenem (MER)	5	3	8
Imipenem (IMP)	6	3	9
Doripenem (DOR)	4	1	5
Tobramicina (TOB)	1	4	5
Aztreonam (ATM)	3	2	5
Ciprofloxacina (CIP)	4	1	5
Amicacina (AMI)	4	2	6

Legenda: IFF – Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira, PPC – Policlínica Piquet Carneiro.
Fonte: O autor, 2023.

Avaliando a susceptibilidade das 10 amostras de *P. aeruginosa* aos 10 antimicrobianos testados, pela técnica de difusão em ágar, foram construídos nove perfis de resistência. Os números de marcadores de resistência variaram na faixa de 1 a 10 antimicrobianos. Um único perfil de resistência foi observado em mais de uma amostra, o perfil PPT-CAZ-FEP-MER-IMP-DOR-TOB-ATM-CIP-AMI, com duas amostras, oriundas de um paciente (paciente 2) atendido no IFF. Todos os outros perfis foram presentes em apenas uma amostra. Por instituição hospitalar, observamos seis perfis para IFF e três para PPC (Tabela 2).

Tabela 2 – Perfis de resistência aos antimicrobianos em cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a polimixina B, determinados pelos resultados obtidos com o método de difusão em ágar.

Perfil de resistência	Número de amostras
PPT-CAZ-FEP-MER-IMP-DOR-TOB-ATM-CIP-AMI	2
PPT-FEP-MER-IMP-DOR-TOB-ATM-CIP-AMI	1
PPT-CAZ-FEP-MER-IMP-ATM-CIP-AMI	1
PPT-CAZ-FEP-MER-IMP-DOR-ATM	1
PPT-FEP-MER-DOR	1
MER-IMP-TOB-AMI	1
MER-IMP-CIP	1
IMP-TOB-AMI	1
IMP	1

Legenda: AMI – Amicacina, ATM – Aztreonam, CAZ – Ceftazidima, CIP – Ciprofloxacina, DOR – Doripenem, FEP – Cefepime, IMP – Imipenem, MER – Meropenem, PPT – Piperacilina-tazobactam, TOB – Tobramicina.

Fonte: O autor, 2023.

4.1.2 Concentração Inibitória Mínima

Todas as amostras selecionadas apresentaram resistência para polimixina B (CIM ≥ 4 µg/mL). Os resultados variaram de 4 µg/mL a 8 µg/mL. Dentre as dez amostras testadas, nove apresentaram a CIM de 4 µg/mL e apenas uma amostra a CIM de 8 µg/mL. Apesar de apresentar a maior CIM observada em nosso estudo, esta apresentou apenas três marcadores fenotípicos de resistência a antimicrobianos (IMP, TOB e AMI) (Tabela 3).

Tabela 3 – Distribuição das concentrações inibitória mínima para polimixina B, perfil de resistência aos antimicrobianos em *Pseudomonas aeruginosa*.

Amostra	Paciente	Perfil de resistência aos antimicrobianos	Polimixina B (µg/mL)
9876	1	MER-IMP-CIP	4
10705	2	IMP	4
11227	3	MER-IMP-TOB-AMI	4
14297	3	PPT-CAZ-FEP-MER-IMP-ATM-CIP-AMI	4
14339	4	IMP-TOB-AMI	8
17138	2	PPT-CAZ-FEP-MER-IMP-DOR-TOB-ATM-CIP-AMI	4
17749	2	PPT-CAZ-FEP-MER-IMP-DOR-TOB-ATM-CIP-AMI	4
17801	2	PPT-FEP-MER-IMP-DOR-TOB-ATM-CIP-AMI	4
17828	5	PPT-FEP-MER-DOR	4
17973	3	PPT-CAZ-FEP-MER-IMP-DOR-ATM	4

Legenda: AMI – Amicacina, ATM – Aztreonam, CAZ – Ceftazidima, CIP – Ciprofloxacina, DOR – Doripenem, FEP – Cefepime, IMP – Imipenem, MER – Meropenem, PPT – Piperacilina-tazobactam, TOB – Tobramicina.

Fonte: O autor, 2023.

4.1.3 Teste comercial POLICIMBAC

Todas as amostras testadas pelo método comercial POLICIMBAC, para a determinação da CIM de polimixina B, foram classificadas na categoria intermediária ($CIM \leq 2 \mu\text{g/mL}$). Os resultados variaram de 1 µg/mL (duas amostras) a 2 µg/mL (oito amostras). Quando comparado com o resultado obtido na técnica de microdiluição, observa-se uma discrepância nos dados de três amostras (14339, 17138 e 17973), exibindo um aumento na CIM em mais de uma concentração de diluição do antimicrobiano. Nas demais amostras, a diferença observada foi de apenas uma concentração de diluição (Tabela 4).

Tabela 4 – Comparação entre as metodologias utilizadas para a determinação da concentração inibitória mínima para polimixina B.

Amostra	Paciente	Origem	Microdiluição	Teste comercial*
9876	1	IFF	4	2
10705	2	IFF	4	2
11227	3	PPC	4	2
14297	3	PPC	4	2
14339	4	IFF	8	2
17138	2	IFF	4	1
17749	2	IFF	4	2
17801	2	IFF	4	2
17828	5	IFF	4	2
17973	3	PPC	4	1

Legenda: IFF – Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira, PPC – Policlínica Piquet Carneiro, * – POLICIMBAC.

Fonte: O autor, 2023.

4.2 Classificação das amostras de acordo com os perfis de resistência: resistente a múltiplas drogas (MDR) e resistência extensiva (XDR)

Seguindo os critérios adaptados a partir de Magiorakos e colaboradores (2012), o perfil de resistência das dez amostras de *P. aeruginosa* foi traçado baseando-se no perfil MDR como aquela amostra que seja não sensível a um ou mais agentes em três ou mais categorias de antimicrobianos testados; e XDR como a amostra sensível a um ou mais agentes em até duas categorias de antimicrobianos testadas.

Nesta classificação, uma amostra (10705) não exibiu nenhum dos perfis de resistência apresentado pelo autor. O perfil MDR foi identificado em cinco amostras (9876, 11227, 14339, 17828 e 17973), sendo o perfil que esteve presente no maior número de amostras deste estudo. Quatro amostras (14297, 17138, 17749 e 17801), exibiram o perfil de resistência XDR.

Tabela 5 – Classificação das amostras de *Pseudomonas aeruginosa* em resistente a múltiplas drogas e resistência extensiva baseado nos marcadores fenotípicos de resistência aos antimicrobianos.

Amostra	Marcador de resistência	Perfil de resistência
9876	IMP, MER CIP e POL	MDR
10705	IMP e POL	–
11227	IMP, MER, AMI, TOB e POL	MDR
14297	PPT, ATM, CAZ, FEP, IMP, MER, AMI, CIP e POL	XDR
14339	IMP, AMI, TOB e POL	MDR
17138	PPT, ATM, CAZ, FEP, IMP, MER, DOR, AMI, TOB, CIP e POL	XDR
17749	PPT, ATM, CAZ, FEP, IMP, MER, DOR, AMI, TOB, CIP e POL	XDR
17801	PPT, ATM, FEP, IMP, MER, DOR, AMI, TOB, CIP e POL	XDR
17828	PPT, FEP, MER, DOR e POL	MDR
17973	PPT, ATM, CAZ, FEP, IMP, MER, DOR e POL	MDR

Legenda: AMI – Amicacina, ATM – Aztreonam, CAZ – Ceftazidima, CIP – Ciprofloxacina, DOR – Doripenem, FEP – Cefepime, IMP – Imipenem, MDR – Resistente a múltiplas drogas, MER – Meropenem, POL – Polimixina B, PPT – Piperacilina-tazobactam, TOB – Tobramicina, XDR – Resistência extensiva.

Fonte: O autor, 2023.

4.3 Sequenciamento do genoma total

4.3.1 Montagem e anotação dos genomas

As *reads* das amostras pesquisadas foram trimadas e seus genomas montados pelo método *de novo* através da plataforma BV-BRC, utilizando a ferramenta *TrimGalore* para a trimagem e para a montagem, o método *Unicycler* v.0.4.8 como o padrão, contudo, na montagem das amostras 14339 e 17828, o método falhou em montar o genoma destas, sendo então, utilizado o método *SPAdes* v.3.13.0.

Para a anotação dos genomas, as plataformas RAST e BV-BRC foram empregadas, gerando dados sobre o tamanho total de cada genoma, que variou entre

6.250.921 pb (14339) a 6.738.939 pb (17801), o conteúdo GC, que apresentou em média 66,40% e o número dos *contigs* que variaram entre 45 (14339) a 120 (17801) (Tabela 6).

Em relação ao tamanho e número de *contigs*, a ferramenta também analisou o N50 e o L50, cálculos utilizados para avaliar a qualidade das montagens dos genomas. O N50, é o número definido pelo comprimento do menor *contig* para qual *contigs* de comprimento iguais ou maiores cubram pelo menos 50% dos pares de base da montagem e o L50, é o número definido pelo número de *contigs* de sequência maior ou igual ao comprimento do N50 e sua soma chegará a 50% do tamanho total das bases da montagem (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/help/>).

A amostra que apresentou o maior N50, foi a 11227, exibindo um N50 de 389.101 e a que apresentou o menor, foi a 17801, exibindo um N50 de 143.939. Em contra partida, a amostra que exibiu o maior L50, foi 17801, com um L50 de 15 e a que mostrou o menor foi 11227, exibindo um L50 de 6 (Tabela 6). Outros valores foram observados na Tabela 6, como o número de sequências codificadoras, RNAs e subsistemas.

As sequências de nucleotídeos das amostras apresentadas neste estudo foram depositadas no banco de dados *Genbank* através do portal de submissão do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) sob os números de acesso JAPTHH000000000 (9876), JAOYMC000000000 (10705), JAOYMD000000000 (11227), JAOYME000000000 (14297), JAOYMF000000000 (14339), JAOYMG000000000 (17138), JAOYMG000000000 (17749), JAOYMI000000000 (17801), JAOYMJ000000000 (17828) e JAOYMK000000000 (17973). Na submissão destes genomas, foi optado pela liberação dos dados referentes aos mesmos serem disponibilizados após a publicação dos genomas ou na data 14/10/2026.

Tabela 6 – Dados da composição genômica das amostras de *Pseudomonas aeruginosa*.

	Amostras									
	9876	10705	11227	14297	14339	17138	17749	17801	17828	17973
Tamanho do genoma (pb)	6.303.06 1	6.339.91 6	6.476.31 1	6.421.79 7	6.250.92 1	6.447.19 5	6.439.48 9	6.738.93 9	6.476.33 3	6.448.35 9
Conteúdo GC (%)	66.46	66.46	66.29	66.41	66.57	66.52	66.52	66.13	66.34	66.35
Número de contigs	77	65	72	75	45	72	88	120	70	81
<i>Reads</i>	990.698	1.058.74 8	1.201.39 6	1.464.91 6	1.178.61 5	1.288.79 0	1.075.18 3	815.261	1.011.63 0	1.278.22 1
N50 (pb)	216.648	224.008	389.101	218.940	335.192	201.436	192.273	143.939	280.403	234.939
L50	9	11	6	9	7	11	14	15	9	11
CDS	5.970	5.997	6.145	6.110	5.944	6.142	6.143	6.566	6.150	6.138
RNAs	61	62	63	72	64	62	58	62	64	62
Número de subsistema s	389	390	396	396	391	395	397	399	396	396

Legenda: GC – Guanina e Citosina, pb – pares de base, CDS – Sequências Codificadoras

Fonte: O autor, 2023.

4.3.2 Genes associados a resistência aos antimicrobianos

4.3.2.1 Genes intrínsecos

Na detecção de genes de resistência intrínseca, a plataforma BV-BRC vasculhou através das anotações dos genomas nas bases de dados PATRIC, CARD e NDARO a presença de genes de interesse e então, os genes foram alinhados no programa *Bioedit* com a cepa de referência *P. aeruginosa* PAO1.

Cada gene de interesse foi englobado dentro de uma categoria que se relacionava com a sua função. Foram criadas seis categorias para melhor divisão da pesquisa, sendo estas a de sistemas de efluxo multidroga, porinas, sistemas de dois componentes (TCS), subunidades enzimáticas de DNA girase e Topoisomerase IV, subunidade ribossomal 30S e síntese de folato (Apêndice 1 e 2).

Na categoria relacionada aos sistemas de efluxo multidroga, ou bombas de efluxo, foram pesquisados genes relacionados as quatro principais bombas de efluxo em *P. aeruginosa*, MexAB, MexCD, MexEF e MexXY. Nesta categoria, a análise foi realizada apenas nos genes reguladores dos sistemas de efluxo multidroga, sendo estes os responsáveis pela superexpressão das mesmas.

Para a bomba de efluxo MexAB, a pesquisa se estendeu aos seus genes reguladores *mexR*, *nalC* e *nalD*. Dentre os genes reguladores de MexAB, o que exibiu mais mutações em aminoácidos foi o gene *nalC*, enquanto o que menos exibiu, foi *nalD*. A mutação mais frequente observada foi no gene *nalC*, onde a alteração 71G→E, se estendeu por todas as amostras deste estudo, com exceção da amostra 10705. As amostras 17138 e 17749, foram as que exibiram o maior número de mutações em relação a estes genes reguladores, enquanto a amostra 10705 não exibiu nenhuma alteração.

O sistema de efluxo multidroga MexCD, foi investigado através da verificação de mutações em seu gene regulador da transcrição *nfxB*. Este sistema é capaz de expelir fluoroquinolonas e alguns β -lactâmicos, com exceção de cefalosporinas, aztreonam e imipenem, apresentando também baixa afinidade para outros antimicrobianos da classe dos carbapenêmicos.

No gene regulador da transcrição *nfxB*, apenas as amostras 14339, 17138, 17749, 17828 e 17973 exibiram alterações de aminoácidos, das quais as amostras 17138 e 17749, foram as que exibiram um maior número de mutações nos aminoácidos.

O gene regulador da bomba de efluxo MexEF, *mexS*, também foi alinhado em busca de mutações relacionados com a superexpressão da bomba. Todas as amostras exibiram alterações de aminoácidos neste gene, com a mutação mais frequente, vista em todas as amostras deste estudo, sendo a 249D→N.

Por fim, no sistema de efluxo multidroga MexXY, o gene repressor desta *mexZ* foi avaliado em busca de mutações em aminoácidos. Esta bomba está relacionada com a extrusão de aminoglicosídeos, tetraciclinas e alguns β-lactâmicos, com exceção de algumas penicilinas, cefalosporinas, aztreonam e imipenem.

Na busca de mutações no gene *mexZ*, é possível identificar que quatro amostras (9876, 10705, 11227 e 14297) não apresentaram nenhuma mutação. As amostras 17138 e 17749, foram as que exibiram um maior número de alterações de aminoácidos, enquanto que a amostra 14339, exibiu apenas uma alteração, sendo essa um códon de parada prematuro no aminoácido 134Q.

Para a categoria das porinas, a pesquisa se estendeu apenas àquelas relacionadas com a entrada de antimicrobiano descritas previamente em *P. aeruginosa*, sendo estas as porinas *oprD*, *opdP*, *opdH*, *opdD*, *oprE* e *oprF*.

Na busca por mutações no gene *oprD*, todas as amostras exibiram alterações, tendo a amostra 11227, exibido o maior número de alterações (30 alterações de aminoácidos). As amostras 9876, 10705, 11227 e 14339, apresentaram as deleções *frameshift* 372M→Δ, 373S→Δ e 383G→Δ; as amostras 17138, 17749 e 17801, exibiram a presença de códons de parada prematuros relacionado ao aminoácido 277W.

Um ponto relevante a ser investigado é o observado nas amostras 9876, 10705, 11227 e 14339, onde é possível verificar uma cadeia de mutações que se estende do aminoácido 375N até o aminoácido 382Y.

As porinas *opdP* e *opdD*, são as outras porinas, além da *oprD*, relacionadas com a entrada de drogas carbapenêmicas em *P. aeruginosa*, contudo, a resistência gerada por estas, quando não é acompanhada da ausência de *oprD* ou de uma defeituosa, normalmente não é de grande relevância.

Em *opdP*, todas as amostras exibiram a mesma quantidade de alterações nos mesmos aminoácidos, com exceção das amostras 17138 e 17749, que não exibiram nenhuma modificação. Na análise da porina *opdD*, o que chama atenção é a ausência deste gene na anotação das amostras 17138 e 17749.

As porinas *opdH* e *oprE*, são portas de entrada para ceftazidima, cefalosporina de terceira geração. Na análise de *opdH*, foi possível observar que apenas as amostras 11227, 14339, 17138 e 17749 exibiram alterações nesta porina e em *oprE*, apenas as amostras 17138, 17749, 17801, 17828 e 17973, exibiram modificações, sendo as amostras 17138 e 17749, as únicas a exibirem alterações em ambas as porinas.

Um ponto a ser citado, é o de que as amostras 17801, 17828 e 17973, apresentaram inserções 108Ins→G, 109Ins→L e 110Ins→D, inserindo uma nova trinca de leitura. Foi possível também a identificação de uma inserção *frameshift* nas amostras 17828 e 17973 no aminoácido 443Ins→A. A amostra 17801, exibiu um códon de parada relacionado ao aminoácido 388Y.

Ainda sobre as porinas, a *oprF*, relacionada com a entrada de drogas β -lactâmicas, foi investigada, contudo, todas as amostras com exceção da 11227, não apresentaram nenhuma mutação em aminoácidos.

Para a categoria dos TCS os genes pesquisados foram os *phoP*, *phoQ*, *pmrA*, *pmrB*, *parR*, *parS*, *colR*, *colS*, *cprR* e *cprS*. Estes são capazes de gerar resistência a drogas da classe das polimixinas através da síntese e de transferência de L-Ar4N (4-amino-4-deoxy-L-arabinose) para o lipídeo A, gerando redução de sua afinidade por cargas positivas e por conseguinte, resistência a classe.

No TCS *phoP*, é possível identificar que apenas as amostras 17138 e 17749 exibiram alterações e em *phoQ*, além destas duas, 17828 e 17973, também apresentaram modificações, contudo, apenas exibiram uma mutação.

Em *pmrA*, todas as amostras exibiram modificações, com exceção da 17801. A mutação mais frequente foi 71L→R, presente em todas as amostras que foram identificadas mutações. Em *pmrB*, todas as amostras exibiram alterações, sendo a mais frequente a 345Y→H. As amostras 17138 e 17749, foram as que exibiram uma frequência maior de mutações neste gene, incluindo um códon de parada no aminoácido 468R.

Na análise de *parR*, as amostras 9876, 10705 e 14297 não exibiram nenhuma mutação, tendo a modificação 153L→R como a mais frequente nas amostras. Em *parS*, todas as amostras exibiram alterações em seus aminoácidos, com a modificação 398H→R a mais frequente, estando presente em todas as amostras.

Em *colR* e *colS*, as amostras 9876, 10705, 11227, 14297, 14339 e 17801 não exibiram nenhuma modificação em nenhum aminoácido. 17138 e 17749 exibiram diversas mutações em ambos os genes e 17828 e 17973, apenas apresentaram a modificação 316A→T em *colS*.

Por fim, no TCS *cprR* e *cprS*, as amostras 9876, 10705, 14297 e 17801, não apresentaram nenhuma modificação em aminoácido. Em *cprR*, apenas 17138 e 17749 exibiram mutações e em *cprS*, 11227, 14339, 17138, 17749, 17828 e 17973 estavam apresentando alterações.

Na categoria das subunidades enzimáticas de DNA girase e Topoisomerase IV, a pesquisa se estendeu aos genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* e *parE*, estando relacionados a resistência a ciprofloxacina e outras fluoroquinolonas através de mutações.

Em *gyrA*, as amostras 17138 e 17749, foram as que mais exibiram mutações, enquanto que 10705, 11227, 14297 e 14339, não exibiram nenhuma alteração em aminoácidos. As amostras 9876, 17828 e 17973 apresentaram duas deleções *frameshift* relacionadas aos aminoácidos 912S→Δ e 913E→Δ. A amostra 17801, exibiu apenas uma alteração, a 83T→I. Na análise do gene *gyrB*, notou-se que nenhuma amostra exibiu nenhum tipo de modificação, exceto as amostras 17138 e 17749, que exibiram sete alterações cada.

Na Topoisomerase IV *parC*, a distribuição de modificações foi homogênea entre as amostras, com apenas as amostras 17138 e 17749 apresentando alterações repetidas. Excluindo estas amostras, as modificações exibidas foram 262H→Q (9876), 595P→L (10705), 359Q→R (14297), 485S→A (14339) e 87S→L (17801). Em *parE*, a modificação 533D→E se repetiu nas amostras 14339, 17801, 17828 e 17973. As amostras 9876, 10705, 11227 e 14297 não exibiram nenhuma alteração.

Na categoria da subunidade ribossomal 30S, apenas o gene *s12P* foi investigado. Este é relacionado a resistência a certos aminoglicosídeos em patógenos do grupo ESKAPE e *M. tuberculosis*. Na análise deste gene, nenhuma alteração foi identificada em nenhuma das amostras deste estudo.

Por fim, a última categoria a ser investigada foi a relacionada a síntese de folato, que teve o gene *folA*, analisado. Este gene é alvo da ação da combinação de drogas sulfametoxazol-trimetropim, que agem inibindo o *dihydrofolate reductase* (DHFR) e por conseguinte, a síntese de folato. Mutações neste gene podem levar a diminuição da susceptibilidade a esta combinação de drogas.

Com exceção das amostras 14297, 17138 e 17749, nenhuma das outras exibiram mutações neste gene. Na amostra 14297, apenas uma modificação foi identificada (70G→A), enquanto que nas outras duas amostras, seis modificações foram identificadas.

4.3.2.2 Genes extrínsecos

Na pesquisa de genes extrínsecos, a ferramenta da plataforma do CGE, *Resfinder*, obteve êxito em identificar diversos genes associados a esta resistência. Essa análise se baseou apenas no quesito de presença ou ausência dos genes, entendendo que apenas a presença dos genes basta para gerar resistência, não havendo necessidade de buscar mutações dos mesmos.

Foram identificados genes extrínsecos em todas as amostras em antimicrobianos das classes penicilinas, aminoglicosídeos, carbapenêmicos, cefalosporinas, fluoroquinolonas, cloranfenicol, ácidos fosfônicos e sulfonamidas.

O gene *ampC*, relacionado a resistência a drogas β-lactâmicas, foi associado junto dos genes *OXA-50* e *OXA-395*, a resistência aos antimicrobianos da classe das penicilinas (amoxicilina e ampicilina) pela ferramenta *Resfinder*. Esta, também atribuiu os genes *ampC* a resistência a classe das cefalosporinas (ceftazidima e cefepime), *OXA-395* a resistência a meropenem e *OXA-4* e *OXA-486*, a um antimicrobiano β-lactâmico desconhecido (Tabela 7).

Para a classe dos aminoglicosídeos, dois genes distintos foram identificados o *aph(3')-IIb* e o *aadA24*, ambos relacionados a inativação da droga. O primeiro foi relacionado a resistência a gentamicina, kanamicina, neomicina, paromicina, ribostamicina e um possível aminoglicosídeo desconhecido. O segundo, foi relacionado a resistência contra espectinomicina (Tabela 7).

Nas classes das fluoroquinolonas e sulfonamidas, os genes *crpP*, responsável pela resistência contra ciprofloxacina, e *sul1*, relacionado a resistência contra sulfametoxazol, foram identificados estando associados a possível resistência contra estas classes (Tabela 7).

Em relação as drogas cloranfenicol e a fosfomicina, os genes *catB7* e *fosA*, ambos relacionados a inativação de drogas, foram identificados estando associados a resistência as mesmas (Tabela 7).

As amostras 17138 e 17749, foram as que exibiram o menor número de genes relacionados a resistência extrínseca, exibindo resistência apenas a ciprofloxacina. Com exceção destas, apenas 17801 também exibiu resistência a este antimicrobiano (Tabela 7).

Dentre as amostras que mais exibiram genes nesta análise, 17828 e 17973, apresentaram sete genes de um total de 11 relacionados a esta resistência. Destes sete, os genes *OXA-4*, *aph(3')-IIb* e *aadA24*, foram únicos a estas amostras (Tabela 7).

Os genes *OXA-50* e *sul1*, também foram outros genes encontrados em apenas uma amostra, sendo o primeiro encontrado na amostra 14339, e o segundo, na amostra 17801 (Tabela 7).

Um ponto relevante a se destacar, é de que as amostras 17801, 17828 e 17973, foram as únicas a apresentarem o gene *OXA-395*, o qual está relacionado a resistência a meropenem (Tabela 7).

Tabela 7 – Análise dos genes de resistência extrínseca encontrada nas amostras de *Pseudomonas aeruginosa* pesquisadas através da ferramenta *ResFinder*.

Genes extrínsecos	9876	10705	11227	14297	14339	17138	17749	17801	17828	17973
<i>ampC</i>	P	P	P	P	P	A	A	P	P	P
<i>OXA-4</i>	A	A	A	A	A	A	A	A	P	P
<i>OXA-50</i>	A	A	A	A	P	A	A	A	A	A
<i>OXA-395</i>	A	A	A	P	A	A	A	P	P	P
<i>OXA-486</i>	P	P	P	P	A	A	A	A	A	A
<i>aph(3')-Ib</i>	A	A	A	A	A	A	A	A	P	P
<i>aadA24</i>	A	A	A	A	A	A	A	A	P	P
<i>crpP</i>	A	A	A	A	A	P	P	P	A	A
<i>sul1</i>	A	A	A	A	A	A	A	P	A	A
<i>catB7</i>	P	P	P	P	P	A	A	P	P	P
<i>fosA</i>	P	P	P	P	P	A	A	P	P	P

Legenda: P – Gene presente na amostra; A – Gene ausente na amostra.

Fonte: O autor, 2023.

4.3.3 Análise de plasmídeo

Na análise plasmidial, o programa *plasmidSPAdes* foi utilizado para realizar a montagem dos plasmídeos nas dez amostras pesquisadas e em seguida, o programa *Bakta* foi empregado para realizar a anotação dos plasmídeos e identificar possíveis genes de interesse relacionados a resistência a antimicrobianos nos mesmos.

Todas as amostras pesquisadas exibiram DNA plasmidial, contudo houve grande divergência quanto ao tamanho e presença de genes encontrados nestes plasmídeos. A amostra que exibiu o menor plasmídeo foi a 9876, com 15.805 pb, enquanto que a amostra 17801, exibiu o maior plasmídeo, com 414.162 pb.

Durante a análise da anotação dos plasmídeos, as amostras 17138, 17801, 17828 e 17973, exibiram genes relacionados a resistência as classes fluoroquinolonas (*crpP*), β -lactâmicos (*OXA-1 like* e *OXA-395*) e aminoglicosídeos (*aaC(6')Ib*) (Figuras 3, 4, 5 e 6).

O gene *crpP*, relacionado com a resistência a ciprofloxacina, e *OXA-395*, relacionado a resistência a β -lactâmicos, além de identificados na anotação dos plasmídeos, também foram identificados pela busca de resistência extrínseca no programa *ResFinder* (Tabela 8).

Tabela 8 – Presença de genes relacionados a resistência a antimicrobianos nos plasmídeos das amostras de *Pseudomonas aeruginosa* pesquisadas.

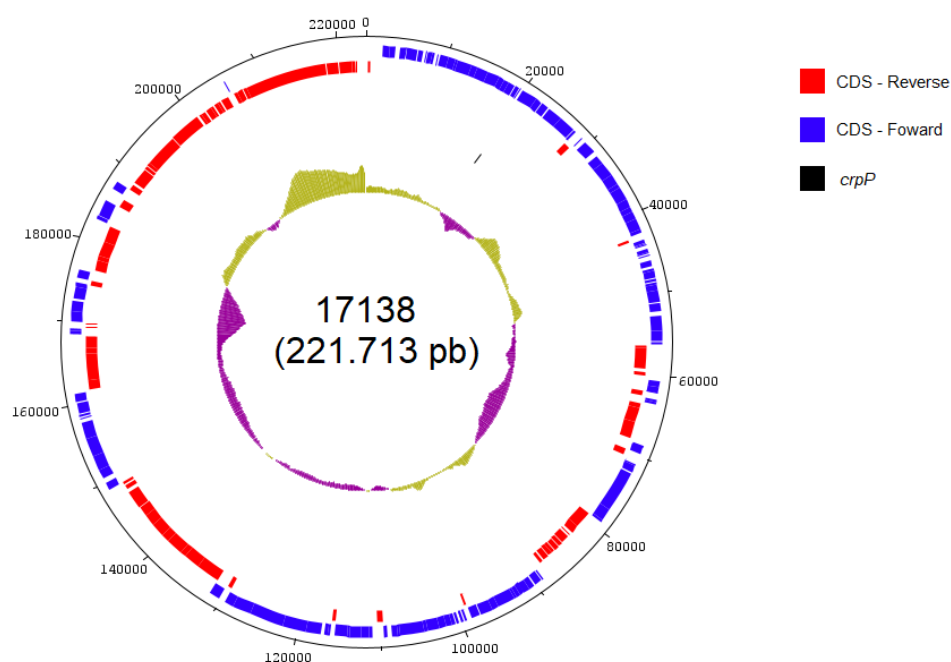
Amostra	Gene	Resistência
17138	<i>crpP</i>	Ciprofloxacina
17801	<i>blaOXA-395</i>	β -lactâmicos
17828	<i>blaOXA(OXA-1 like); aaC(6')Ib</i>	β -lactâmicos e Aminoglicosídeos
17973	<i>blaOXA(OXA-1 like); aaC(6')Ib</i>	β -lactâmicos e Aminoglicosídeos

Fonte: O autor, 2023.

A ferramenta *DNAPlotter* foi utilizada dentro do programa *Artemis* para gerar a imagem circular do genoma dos plasmídeos encontrados nas amostras e exibir a

localização dos genes de resistência a antimicrobianos identificados nas amostras 17138, 17801, 17828 e 17973.

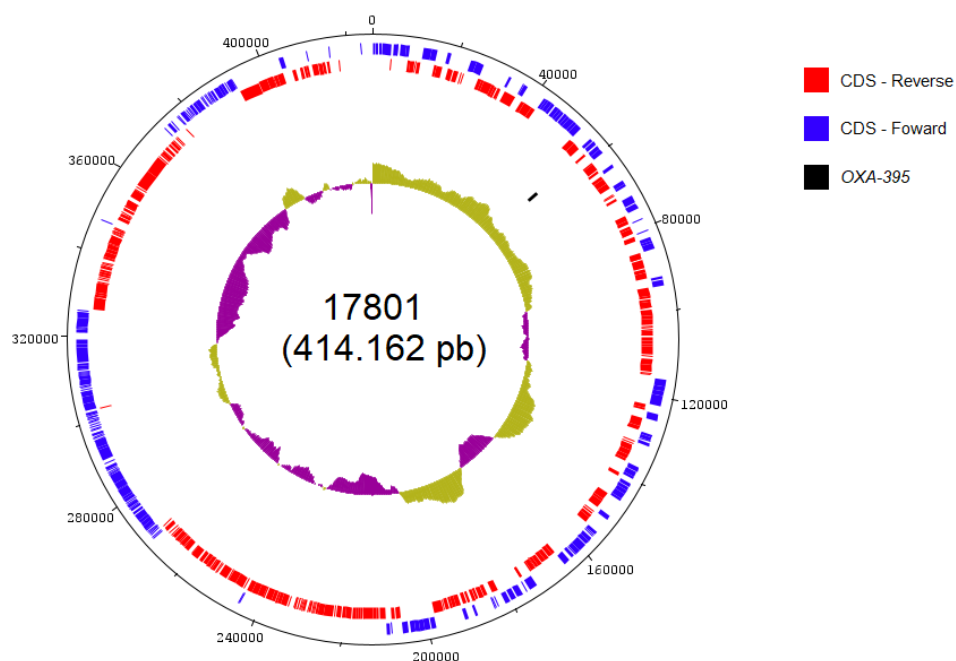
Figura 3 – Mapa do plasmídeo obtido na amostra 17138 através da ferramenta *DNAPlotter*.



Legenda: CDS – Sequências codificadoras; *crpP* – gene relacionado a resistência a ciprofloxacina

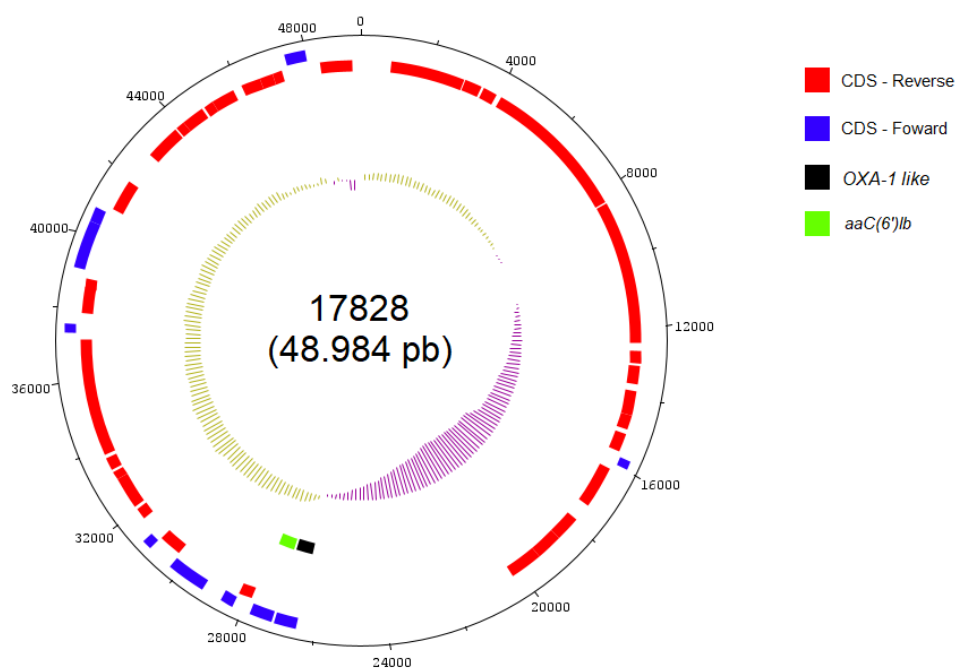
Fonte: O autor, 2023.

Figura 4 – Mapa do plasmídeo obtido na amostra 17801 através da ferramenta *DNAPlotter*.



Legenda: CDS – Sequências codificadoras; OXA-395 – gene relacionado a resistência a β -lactâmicos
Fonte: O autor, 2023.

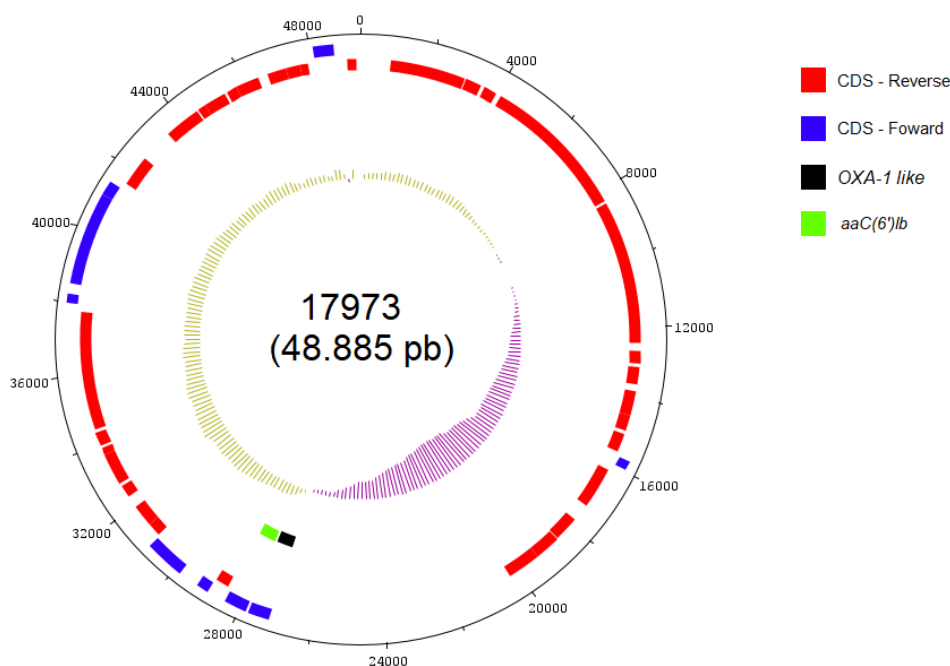
Figura 5 – Mapa do plasmídeo obtido na amostra 17828 através da ferramenta DNAPlotter.



Legenda: CDS – Sequências codificadoras; *OXA-1 like* – gene relacionado a resistência a β -lactâmicos; *aaC(6')lb* – gene relacionado a resistência a aminoglicosídeos.

Fonte: O autor, 2023.

Figura 6 – Mapa do plasmídeo obtido na amostra 17973 através da ferramenta DNAPlotter.



Legenda: CDS – Sequências codificadoras; OXA-1 like – gene relacionado a resistência a β -lactâmicos; aaC(6')lb – gene relacionado a resistência a aminoglicosídeos.

Fonte: O autor, 2023.

4.3.4 Tipificação molecular

Para a tipificação molecular, a plataforma online *PubMLST* foi utilizada a fim de se determinar o *sequence type* (ST) das amostras. Com exceção das amostras 11227, 14339, 17828 e 17749, todas as amostras tiveram um ST atribuídos a si, sendo este 9876 (ST252), 10705 (ST865), 14297 (ST871), 17138 (ST2211), 17749 (ST2211) e 17801 (ST1560) (Tabela 9).

As amostras que não apresentaram um ST na análise da plataforma, foram atribuídas como pertencentes a um ST desconhecido, sendo necessária a submissão do perfil alélico das mesmas para a plataforma. Após essa submissão, três novos STs foram atribuídos a estas amostras, sendo eles o ST4051 (11227), ST4052 (14339) e o ST4053 (17828 e 17973) (Tabela 9).

Tabela 9 – Identificação do *sequence type* através do perfil alélico das amostras de *Pseudomonas aeruginosa* pesquisadas neste estudo e de cepas epidêmicas de fibrose cística (continua).

Identificação	ST	<i>acsA</i>	<i>aroE</i>	<i>guaA</i>	<i>mutL</i>	<i>nuoD</i>	<i>ppsA</i>	<i>trpE</i>
9876	252	6	28	4	3	3	4	7
10705	865	15	5	83	11	4	4	7
11227	4051*	16	3	20	71	4	7	1
14297	871	16	3	1	5	1	55	61
14339	4052*	125	5	5	11	4	15	19
17138	2211	87	34	114	37	86	100	170
17749	2211	87	34	114	37	86	100	170
17801	1560	9	8	5	67	95	20	9
17828	4053*	142	152	65	165	16	16	198
17973	4053*	142	152	65	165	16	16	198
LES	146	6	5	11	3	4	23	1
MES	217	28	5	11	18	4	13	3
Midlands-1	148	17	5	1	3	13	6	7
PES	192	1	5	7	5	4	4	2
AES-01	649	11	84	11	3	4	4	7
AES-02	775	28	5	11	5	4	4	7

Tabela 9 – Identificação dos *sequence type* através do perfil alélico das amostras de *Pseudomonas aeruginosa* pesquisadas neste estudo e de cepas epidêmicas de fibrose cística (conclusão).

Identificação	ST	<i>acsA</i>	<i>aroE</i>	<i>guaA</i>	<i>mutL</i>	<i>nuoD</i>	<i>ppsA</i>	<i>trpE</i>
AES-03	242	28	5	5	11	3	15	44
DK-1	387	28	5	11	11	4	12	3
DK-2	386	17	5	11	18	4	10	3
Clone C	17	11	5	1	7	9	4	7
DES	406	40	5	11	3	4	13	7

Legenda: LES – *Liverpool epidemic strain*; MES – *Manchester epidemic strain*; PES – *Praire epidemic strain*; AES – *Australian epidemic strain*; DK – *Denmark strain*; DES – *Dutch epidemic strain*; * – Novos STs descritos.

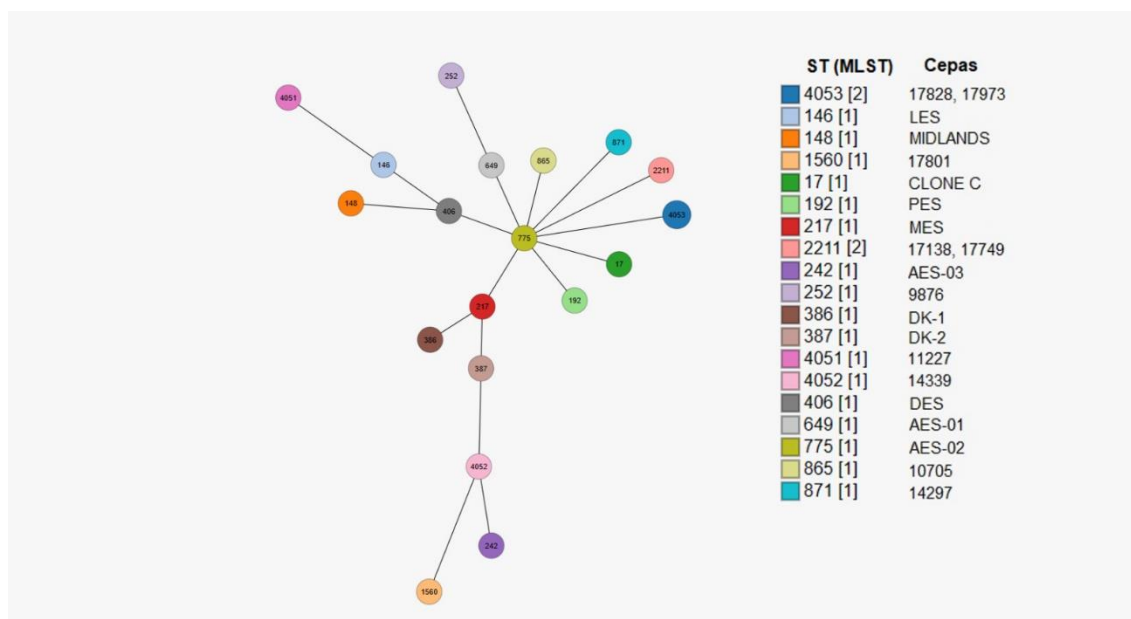
Fonte: O autor, 2023.

Um ponto interessante a ser mencionado, é o de que nenhum dos STs epidêmicos de FC foram relacionados com o ST das amostras pesquisadas neste estudo, sugerindo que não estão relacionadas entre si.

Os únicos STs a se relacionarem entre si, foram os das amostras 17138 e 17749, que ambas exibiram o ST 2211, e o das amostras 17828 e 17973, que tiveram um novo ST descrito na plataforma por este estudo, o ST 4053.

Após a identificação do perfil alélico das amostras pesquisadas e das cepas epidêmicas e seus respectivos STs, a ferramenta *Grapetree* foi empregada com a finalidade de relacionar as amostras de *P. aeruginosa* pesquisadas com clones epidêmicos de FC. Para isto, o perfil alélico da combinação dos genes *acsA*, *aroE*, *guaA*, *mutL*, *nuoD*, *ppsA* e *trpE* foi traçado, gerando a árvore filogenética disponível na Figura 7.

Figura 7 – Árvore filogenética das amostras de *Pseudomonas aeruginosa* deste estudo e das cepas epidêmicas de fibrose cística.



Fonte: O autor, 2023.

Através da análise da Figura 7, é possível identificar que apenas as amostras sob os STs 2211 (17138 e 17749) e 4053 (17828 e 17973) podem ser consideradas próximas.

Apesar de todas as amostras pesquisadas serem de *P. aeruginosa* oriundas de pacientes com FC, nenhuma das amostras apresentadas neste estudo apresentam

similaridades com as cepas epidêmicas de FC, sendo possível afirmar que nenhuma das cepas apresentadas neste estudo tem correlação com clones epidêmicos de FC (Figura 7).

5 DISCUSSÃO

Pseudomonas aeruginosa é um dos principais patógenos relacionados a FC, junto de *S. aureus*, contribuindo para piora no prognóstico da doença através de inflamação e danos nas vias aéreas (REECE, BETTIO & RENWICK, 2021). A erradicação da *P. aeruginosa* tem se tornado cada vez mais difícil devido à sua notável capacidade de resistência aos antimicrobianos. Amostras de *P. aeruginosa* são conhecidas por utilizarem diversos mecanismos de resistência intrínsecos e adquiridos para combater a maioria dos antimicrobianos. Além disso, a resistência antimicrobiana adaptativa, que inclui resistência mediada por biofilme e formação de células persistentes tolerantes a múltiplas drogas, é responsável pela persistência e recaída de infecções (PANG *et al.*, 2019; LABORDA *et al.*, 2022).

Dada a importância de *P. aeruginosa* na FC e a necessidade de rápido tratamento desses pacientes com antimicrobianos, é essencial identificar o padrão exato de resistência em *P. aeruginosa* nesse grupo de pacientes. Portanto, neste estudo, examinamos o padrão de resistência a antimicrobianos de diferentes classes em 10 amostras de *P. aeruginosa*, previamente identificadas como resistentes a polimixina B, recuperadas de pacientes com FC acompanhados em dois centros hospitalares de referência no atendimento a estes pacientes entre os períodos de 2010 a 2014.

Observamos que a quase totalidade das amostras exibiram resistência aos carbapenêmicos, contudo, este era um resultado já esperado, uma vez que as amostras deste estudo são pré-selecionadas e apresentam resistência a polimixina B. Comumente, as amostras com esse fenótipo tendem a apresentar perfis de resistência a múltiplas drogas, visto que seus mecanismos de resistência, em geral, são inespecíficos, como as bombas de efluxo, as quais podem gerar resistência a diversas classes de antimicrobianos e inclusive, contribuir para a tolerância a polimixinas (PUJA *et al.*, 2020; GLEN & LAMONT, 2021).

O perfil de resistência aos carbapenêmicos em pacientes com FC, torna-se preocupante, visto que a classe é comumente utilizada para o tratamento desses pacientes cronicamente infectados por *P. aeruginosa*. Esse perfil de resistência

dificulta a erradicação do microrganismo do ambiente pulmonar desses pacientes (ELBORN, 2016).

O estudo conduzido por Lucca e colaboradores (2018), evidencia a evolução do perfil de resistência de *P. aeruginosa* oriundas de indivíduos italianos com FC apresentando infecção pulmonar crônica entre os anos de 2010 a 2013. Os autores relatam uma diminuição na susceptibilidade à ciprofloxacina (de 47,11% para 30,87%), levofloxacina (de 41,66% para 30,87%) e ceftazidima (de 82,61% para 79,34%). Ao mesmo tempo, o mesmo relata aumento na susceptibilidade a colistina (de 93,12% para 98,47%) e estabilidade em meropenem (72%).

Como já mencionado anteriormente, nossos dados, contrariamente ao que foi apresentado por Lucca e colaboradores (2018), se destacam pela alta taxa de resistência aos carbapenêmicos. Por outro lado, são corroborados por uma avaliação do perfil de resistência realizada na Escócia, também com amostras de *P. aeruginosa* de pacientes com FC, recuperadas entre os anos de 2015 e 2016, que destacou que, entre as amostras analisadas, 83,3% foram resistentes a ceftazidima e aos carbapenêmicos meropenem e imipenem (ZAMUDIO *et al.*, 2019).

Em um estudo utilizando 153 amostras de *P. aeruginosa* oriundas de pacientes com FC recuperadas entre os anos de 2006 a 2012 de centros hospitalares de países do norte da Europa, cerca de 60% das amostras apresentavam numerosos marcadores de resistência a múltiplas drogas (PPT, CAZ, IMP, MER, AMI, TOB, CIP e colistina) (MUSTAFA *et al.*, 2016). Outro trabalho com dados similares é o de Sader e colaboradores (2021), o qual reuniu 273 amostras de *P. aeruginosa* oriundas de 17 países, obtidas entre os anos de 2018 e 2019 e identificou cerca de 36,3% isolados apresentando diversos marcadores de resistência (CAZ, FEP, PPT, MER, IMP, TOB, AMI e colistina).

É sabido que amostras de *P. aeruginosa* de centros hospitalares brasileiros especializados no atendimento de indivíduos com FC apresentavam baixo número de marcadores de resistência a antimicrobianos (HERMES *et al.*, 2013; LUTZ *et al.*, 2013; FERREIRA *et al.*, 2015), contudo, um trabalho mais recente, conduzido por nosso grupo de estudo, realizado com 179 amostras de *P. aeruginosa* de pacientes com FC atendidos em dois centros de referência no Rio de Janeiro detectou a presença de 71 (36,6%) e 8 (4,4%) isolados apresentando perfil de resistência a múltiplas drogas e resistência extensiva respectivamente (ALMEIDA *et al.*, 2021). Esse aumento no

índice de resistência chamou a nossa atenção e nos motivou a investigar os mecanismos de resistência aos antimicrobianos relacionados as amostras MDR.

Esse aumento na resistência exibida por *P. aeruginosa* está relacionado a diversos mecanismos de resistência que o microrganismo exibe em prol da sobrevivência contra antimicrobianos. Além da resistência intrínseca, mutações também são capazes de ampliar a resistência a antimicrobianos (sendo esta forma particularmente relevante em caso de infecções crônicas) e ainda a aquisição de genes de resistência. Vale ressaltar que além destas, *P. aeruginosa* também pode exibir resistência transitória, a qual pode conferir ao microrganismo o fenótipo de resistência a antibióticos através da indução da expressão de genes de resistência intrínseca por condições ou compostos que a bactéria possa enfrentar no curso da infecção, prejudicando a eficácia das drogas. Além disso, células tolerantes, capazes de sobreviver durante a exposição de antimicrobianos bactericidas, também são encontradas nestes microrganismos e podem determinar um prelúdio para evolução da resistência aos antimicrobianos. Por fim, os biofilmes de *P. aeruginosa*, são frequentemente encontrados nos pulmões de pacientes com FC, em próteses ou em cateteres e apresentam baixa susceptibilidade aos antimicrobianos e estão associados à persistência e piora da doença (LABORDA *et al.*, 2022).

A classe das polimixinas é considerada como última opção no tratamento a patógenos gram-negativos resistentes a múltiplas drogas, contudo, seu uso é desencorajado devido a efeitos colaterais nefrotóxicos (HORCAJADA *et al.*, 2019; LO SCIUTO *et al.*, 2020). Na FC, esta classe tem suma importância devido ao uso de sua forma inalatória, que exibe vantagens sobre a administração intravenosa pois a droga é entregue no sítio da infecção com maior concentração, minimizando possíveis efeitos colaterais e diminui o risco de exacerbações pulmonares causadas por infecções crônicas. Além disso, parece apresentar melhor penetração nos microrganismos que estão em condição de biofilmes, estrutura comum no ambiente pulmonar dos indivíduos com FC, principalmente aqueles com quadro de infecção crônica (QUON, GOSS & RAMSEY, 2014; TACCETTI *et al.*, 2021).

Devido ao aumento na resistência a diversas drogas exibido por *P. aeruginosa* em pacientes tanto de IRAS quanto de FC do Brasil e do mundo, o uso de polimixinas tem se elevado, graças a sua eficácia contra exemplares da espécie exibindo características de multirresistência. Entretanto, com o uso elevado da classe, tem se

observado diversos relatos de *P. aeruginosa* resistentes a polimixina B. Essa resistência tem origem, principalmente, devido a mutações em genes que alteram a polaridade do lipídeo A. Além desta, a descoberta de plasmídeos carreadores do gene *mcr* (*mobilized colistin resistance*) também se apresenta como um fator na capacidade do microrganismo em resistir a classe (TAHSEMABI, DEHBASHI & ARABESTAN, 2019; KIM *et al.*, 2020). Em exemplares oriundos de pacientes com FC, entretanto, não há relatos, até o momento, da presença deste gene nas cepas recuperadas deste grupo.

Além destas formas de resistência citadas acima, a capacidade de formação de biofilmes em *P. aeruginosa* é um ponto relevante a ser mencionado, uma vez que a eficácia de polimixina B em exemplares sensíveis formadores de biofilmes foi qualificada como concentração-dependente (LIMA *et al.*, 2019) e o uso da droga em exemplares resistentes formadores de biofilme se demonstrou ineficaz (WICKREMASINGHE *et al.*, 2021).

Para confirmar a resistência a polimixina B, a CIM foi realizada nas amostras deste estudo. Todas as amostras apresentaram o perfil de resistência a droga, onde nove exibiram a CIM de 4 µg/mL e apenas uma amostra a CIM de 8 µg/mL. Mesmo que o nosso estudo utilize amostras sabidamente resistentes a polimixina B, este é um resultado preocupante, visto que no passado recente, raramente eram reportadas amostras de *P. aeruginosa* recuperadas de pacientes com FC exibindo resistência a polimixinas (JOHANSEN *et al.*, 2008). Outro estudo que alerta sobre a crescente resistência a classe, é o conduzido por Pedersen e colaboradores (2018), que utilizou amostras dinamarquesas recuperadas entre os períodos de 2008 à 2016 e identificaram um aumento na resistência de 7% para 13%. Eles ainda alertam que em nenhuma de suas amostras identificaram o gene *mcr*, o que poderia contribuir para um maior aumento na resistência exibida.

A microdiluição, embora seja considerada o método de referência, é um procedimento trabalhoso e demorado que requer material pouco encontrado na rotina do laboratório de microbiologia. Por esta razão, produtos comerciais que sejam mais exequíveis a rotina laboratorial vem sendo desenvolvidos para avaliar a susceptibilidade a polimixina B (DALMOLIN *et al.*, 2020).

O teste comercial para determinar a CIM de polimixina B em painel com antimicrobiano liofilizado, POLICIMBAC, foi executado nas amostras deste estudo e

as incluiu na categoria de resistência intermediária, entrando em desacordo com o resultado obtido através do método de referência, que categorizou todas as amostras como resistentes.

Como mencionado anteriormente, o teste comercial exerce vantagem sobre o método de referência devido a melhor adaptabilidade a rotina laboratorial, contudo, alguns laboratórios podem confiar apenas no resultado obtido através do método comercial e essa discrepância pode acabar influenciando o uso de concentrações ineficazes da droga e falha no tratamento clínico de pacientes. Um dos possíveis motivos para a discrepância entre os resultados pode ser explicado pelo fato apresentado relatando que as polimixinas podem se aderir a parede das placas em virtude da presença do poliestireno na composição da placa de ambos os métodos (SINGHAL *et al.*, 2018; PINHEIRO, 2020). Além disso, Pinheiro (2020) também chama atenção para o fato de que no teste comercial, devido a data de validade de quatro meses, esta aderência pode impactar o resultado obtido.

Resultados conflitantes entre as metodologias, que corroboram com nosso estudo, também foram demonstrados por Dalmolin e colaboradores (2020), relatando que apenas 16,4% das amostras analisadas apresentaram um resultado idêntico ao observado no método de referência. Todavia, em seu estudo, o teste comercial além de elevar a CIM das amostras, não modificou a categoria de classificação de resistência para polimixina B, contrário ao que se foi observado neste estudo.

Na determinação da CIM para polimixina B, é comum a observação do fenômeno de poços saltados, o qual se define por um poço com concentração de antimicrobiano não demonstrar crescimento, apesar de um poço de concentração maior exibi-lo (SCHUREK *et al.*, 2009). Com exceção de três, todas as amostras deste estudo apresentaram a diferença de uma concentração de diluição do antimicrobiano (entre 2 µg/mL e 4 µg/mL) entre o método de referência e o teste comercial. Não foram encontrados relatos na literatura da apresentação do fenômeno de poços saltado referentes ao teste POLICIMBAC, contudo, a hipótese da ocorrência de poços saltados nestas amostras não pode ser descartada.

Dada a importância da classificação de resistência em *P. aeruginosa* de pacientes com FC, as amostras deste estudo tiveram seu perfil de resistência traçados por meio dos resultados obtidos pelos testes de sensibilidade aos antimicrobianos executados, o TDD, e a CIM. Através do resultado destes, a classificação de

Magiorakos e colaboradores (2012) pôde qualificar as amostras entre os perfis MDR e XDR.

Dentre as dez amostras pesquisadas, apenas a amostra 10705 não pôde ser enquadrada na classificação adaptada de Magiorakos e colaboradores (2012) utilizada neste estudo, pois não alcançava os critérios para ser considerada como MDR. Contudo, os autores descrevem em seu trabalho que outro método para caracterizar uma bactéria no perfil MDR, seria a resistência a um antimicrobiano chave, permitindo a inclusão desta amostra neste perfil pois a mesma apresenta resistência a polimixina B.

As amostras 14297, 17138, 17749 e 17801, apresentaram o perfil de resistência XDR. Vale ressaltar que no estudo de Magiorakos e colaboradores (2012), para a categorização do perfil pandroga-resistente (PDR), há necessidade de a amostra apresentar resistência a todos os agentes testados, entretanto, neste estudo, a droga fosfomicina, pertencente a classe dos ácidos fosfônicos, não foi testada, não possibilitando a classificação neste perfil. Caso essa droga fosse testada e resistente para as amostras 17138 e 17749, estas poderiam ser classificadas no perfil PDR.

Mesmo se tratando de amostras previamente selecionadas e sabidamente resistentes a polimixina B, nossos resultados são preocupantes, visto que em pacientes com FC colonizados por *P. aeruginosa*, o perfil MDR, pode ser um fator prejudicial na expectativa de vida destes pacientes, devido a diminuição das opções terapêuticas para o tratamento, podendo apresentar menos de 60% de chances de superarem os 30 anos. Nos perfis XDR e PDR, a expectativa de vida após os 20 anos apresenta um rápido decréscimo, pois há ainda mais escassez de drogas capazes de tratar estes pacientes (DURDA-MASNY *et al.*, 2021).

Em nossa amostragem, apenas uma amostra não pôde ser qualificada como MDR, cinco foram classificadas no perfil MDR e quatro no perfil XDR, com a possibilidade de duas destas quatro serem apontadas ao perfil PDR. Isto reitera outro resultado apresentado pelo nosso grupo (ALMEIDA *et al.*, 2021), o qual mais da metade do número de perfis de resistência estudados em *P. aeruginosa* de pacientes com FC era classificado como MDR.

Devido ao aumento do número de amostras exibindo o perfil MDR, XDR e PDR, alternativas para tratamento de amostras de *P. aeruginosa* multirresistente vem sendo descritas, como por exemplo o que destaca Ferry e colaboradores (2022) que

reportam que para uma infecção de *P. aeruginosa* resistente a todos os antimicrobianos, foi optado pelo tratamento com bacteriófagos líticos, o qual gerou sucesso no tratamento da amostra. Outra forma de tratamento para amostras de *P. aeruginosa* resistentes a múltiplas drogas, inclusive polimixina B, é o apresentado por Hussein e colaboradores (2018), que identificou a viabilidade da combinação de polimixina B e tamoxifen, um modulador seletivo do receptor de estrogênio, para cepas de *P. aeruginosa* oriundas de pacientes com FC.

Diante do quadro de resistência apresentado por nossas amostras a classes de drogas de importância contra *P. aeruginosa* oriundas de pacientes com FC, como os carbapenêmicos e as polimixinas, optou-se pela realização do SGT e através deste, a busca por mutações em genes determinantes de resistência a classes de antimicrobianos de interesse e a busca por genes de resistência extrínseca, como o gene *mcr* (oriundo de plasmídeos) e possíveis carbapenemases adquiridas. Além disso, também foi investigada a ocorrência de plasmídeos carreando genes de resistência e possíveis relações com clones epidêmicos de FC no Brasil pela determinação do ST das amostras e confecção de uma árvore filogenética.

Através das métricas de qualidade N50 e L50, é possível comparar a qualidade da montagem exibida pelos genomas, onde apesar da amostra 11227 ter exibido o menor L50, a amostra que exibiu melhor qualidade de montagem foi a 14339, uma vez que esta apresentou *contigs* de tamanho maior e em menor número quando comparado com outras amostras. A amostra 14339 foi uma das quais não tiveram o seu genoma montado através da ferramenta *Unicycler*, e, possivelmente, esta diferença de ferramenta pode ter impactado na qualidade da montagem. Lembrando que esta comparação apenas pode ser realizada pois todas as amostras deste estudo possuem um tamanho similar e são oriundas do mesmo organismo.

As sequências nucleotídicas de genes de interesse foram alinhadas com a cepa de referência *P. aeruginosa* PAO1 e analisadas manualmente utilizando o programa *Bioedit*, de forma que todas as mutações em nucleotídeos que alterassem os aminoácidos relacionados foram averiguadas através da busca na literatura, objetivando identificar autores que previamente tenham descrito as mutações encontradas e, investigado, caso estas tenham alterado alguma função do gene ou de seu produto, gerando resistência a antimicrobianos.

Na busca por mutações nos genes relacionados a sistemas multidroga de efluxo, os genes reguladores de MexAB (*mexR*, *nalC* e *nalD*), não exibiram nenhuma mutação correlacionada com a superexpressão desta bomba de efluxo. Algumas alterações observadas como a 126V→E, exibida nas amostras 11227, 17138, 17749, 17801, 17828 e 17973 no gene *mexR* e 71G→E, exibida em todas as amostras com exceção da 10705, e 209S→R, presente em 11227, 17138, 17749, 17801, 17828 e 17973 em *nalC* já haviam sido encontradas descritas por autores como mutações comuns e insignificantes (HAKKI *et al.*, 2018; AGUILAR-RODEA *et al.*, 2022).

Para a bomba de efluxo MexCD, foi analisado o gene regulador da transcrição desta bomba, *nfxB*. Nas amostras 17828 e 17973, as alterações 21R→H e 56D→G foram apontadas como relacionadas a resistência para ciprofloxacina (ESQUISABEL *et al.*, 2011). No entanto, Ding e colaboradores (2022) relataram ambas as mutações em cepas MDR e cepas não MDR, e concluíram que nenhuma modificação relacionada a inativação de *nfxB* foi identificada. A conclusão alcançada corrobora com o resultado obtido no TDD deste estudo, o qual enquadrou as cepas 17828 e 17973 no perfil de sensibilidade para ciprofloxacina.

No gene regulador de MexEF, *mexS*, assim como nos reguladores de MexAB, nenhuma mutação correlacionada com a superexpressão da bomba de efluxo foi identificada. A alteração 249D→N foi exibida em todas as amostras pesquisadas e já havia sido citada por outros autores como sem impacto na ação repressora de *mexS* (LLANES *et al.*, 2011; SINGH *et al.*, 2017).

Em relação a bomba de efluxo MexXY, o gene repressor *mexZ* foi averiguado em busca de alterações já descritas em amostras apresentando superexpressão da bomba. Apesar de nenhuma mutação encontrada no gene em questão estar relacionada por outros autores, a amostra 14339 reportou uma mutação no aminoácido 134Q, a qual originou um códon de parada (CAA→TAA). Mesmo não sendo observada em outros trabalhos na literatura, é sabido que a presença de inserções, deleções e códons de parada prematuros no gene *mexZ* podem gerar perda de função na proteína (PRICKETT *et al.*, 2017).

Singh e colaboradores (2017) encontraram uma deleção *frameshift* de 17 pb aproximadamente no aminoácido 146E em uma amostra superexpressando *mexY*. É reportado que esta alteração modificou a ligação de *mexZ* ao sítio alvo, perdendo sua função repressora. É seguro afirmar que um códon de parada no aminoácido 134

também esteja relacionada com a superexpressão da bomba visto que a ligação de *mexZ* ao sítio alvo também seria afetada.

A amostra 14339, a qual apresenta o códon de parada no aminoácido 134Q, apresentou o perfil de resistência aos antimicrobianos da classe dos aminoglicosídeos testados, corroborando com a suposição de que este códon de parada impacte na ação repressora do gene *mexZ*, uma vez que a bomba de efluxo MexXY, é considerada como um importante determinante na resistência aos aminoglicosídeos em amostras de *P. aeruginosa*, principalmente nas recuperadas de pacientes com FC (SURESH *et al.*, 2018).

Ainda em relação a *mexZ*, Ding e colaboradores (2022) descreveram as mutações 138L→R (presente em 17828 e 17973) e 196L→I (presente em 17138 e 17749) em cepas MDR, contudo, não relacionaram se estas alterações estavam modificando a função repressora do gene. Esquisabel e colaboradores (2011) identificaram a alteração 137G→D (presente em 17828 e 17973) em uma amostra que estava superexpressando *mexY*, entretanto, não realizaram nenhuma correlação entre a mutação e a superexpressão da bomba.

Curiosamente, as amostras 17138 e 17749, também exibiram resistência a todos os aminoglicosídeos testados, contudo, não é possível correlacionar sua resistência com a super expressão da bomba de efluxo MexXY. Apesar disto, ambas as amostras exibiram diversas modificações reportadas por outros autores que podem estar impactando a ação do gene repressor *mexZ* e gerando superexpressão da bomba de efluxo.

Na busca de alterações nos genes reguladores de bombas de efluxo, as amostras 9876, 10705, 11227 e 14297, não exibiram nenhuma mutação citada por outros autores na literatura como impactante para a superexpressão destas, ainda assim, as amostras 9876 e 11227 foram classificadas no perfil MDR e 14297, no perfil XDR.

A busca por mutações em genes codificadores de porinas em *P. aeruginosa* se deve ao fato destas serem portas de entrada para diversas drogas antimicrobianas, e, portanto, mutações que gerem uma proteína ausente ou não funcional, podem impedir a entrada destas drogas (UDE *et al.*, 2021). Na busca por genes de interesse relacionados, as porinas oprD, opdP, opdH, opdD, oprE e oprF, tiveram suas

sequências de nucleotídeos e aminoácidos analisadas em busca de mutações que pudessem gerar resistência aos antimicrobianos que transpassem estas.

A porina *oprD* é a principal porina relacionada a resistência a drogas carbapenêmicas em *P. aeruginosa* quando apresentando mutações relacionadas a perda de sua função ou de sua ausência, podendo conferir resistência a imipenem, meropenem e doripenem (HAENNI *et al.*, 2017; PETROVA *et al.*, 2019).

Durante a busca por mutações relevantes nesta porina, as amostras 9876, 10705, 11227 e 14339, apresentaram as deleções *frameshift* 372M→Δ, 373S→Δ e 383G→Δ; as amostras 17138, 17749 e 17801, exibiram a presença de códons de parada prematuros no aminoácido 277W (TGG→TGA). Horna e colaboradores (2018) classificam mutações *frameshift* e códons de parada prematuros no gene *oprD*, como mutações relevantes em relação a resistência a carbapenêmicos. Haenni e colaboradores (2017) apontam ainda que deleções entre os aminoácidos 410-420 geraram a proteína ausente. Uma vez que as três amostras exibiram códons de parada no aminoácido 277W e apresentam resistência para as três drogas carbapenêmicas testadas, é possível correlacionar este códon de parada com a ausência ou perda de função da proteína.

Em relação as deleções apresentadas nas amostras 9876, 10705, 11227 e 14339, todas as quatro apresentaram o perfil de resistência para imipenem e apenas as amostras 10705 e 14339 apresentaram o perfil de susceptibilidade para meropenem, sendo as duas únicas amostras deste estudo a apresentarem sensibilidade para esta droga.

Além destas mutações citadas, autores reportaram a presença de mutações em cepas de *P. aeruginosa* com *oprD* defeituosas ou ausentes as quais são exibidas em todas as amostras pesquisadas deste estudo (FARRA *et al.*, 2008; KIM *et al.*, 2016).

Nas amostras 9876, 10705, 11227 e 14339 há a presença de uma sequência de mutações do aminoácido 375N até o 382Y. A presença desta sequência de mutações nestes aminoácidos é relacionada com o aumento da susceptibilidade a meropenem (KAO *et al.*, 2016; HORNA *et al.*, 2018). Das amostras apresentando esta sequência de mutações, apenas a 10705 é sensível ao antimicrobiano.

As mutações identificadas no gene codificador da porina *opdP*, responsável pela entrada de meropenem e imipenem (SONNLEITNER *et al.*, 2020), 29E→A e

159L→I foram reportadas por Savinova e colaboradores (2021) em amostras não sensíveis as drogas carbapenêmicas imipenem, meropenem ou a ambas as drogas. O autor não especificou se apenas estas mutações isoladas seriam o suficiente para gerar a resistência nas amostras, uma vez que em seu estudo, mutações em *oprD* e *opdD* também foram encontradas.

Isabella e colaboradores (2015) advertiram que alterações apenas no gene *opdP* não são capazes de impactar de forma significativa a resistência a carbapenêmicos, contudo, mutações em *opdP* e *oprD* em uma mesma amostra, são capazes de aumentar de forma notável a resistência a esta classe.

Na busca de mutações no gene codificador da porina *opdD*, a qual é responsável pelo transporte de meropenem, todas as amostras, com exceção da 17801, apresentaram mutações reportadas pelo estudo de Savinova e colaboradores (2021), em amostras não sensíveis a droga, contudo, os genes *oprD* e *opdP* também apresentavam mutações, impossibilitando definir a origem da resistência. O gene relacionado a esta porina não foi encontrado na anotação das amostras 17138 e 17749, podendo estar relacionado com uma falha na montagem ou a ausência desta porina e aumento de resistência a meropenem, visto que ambas apresentam o perfil de não sensibilidade a droga.

As porinas *opdH* e *oprE*, relacionadas a translocação de ceftazidima (UDE et al., 2017; SAMANTA et al., 2018), e *oprF*, relacionada a resistência a antimicrobianos β -lactâmicos e inibidores de β -lactamases caso ausente ou sem função (IDOWU et al., 2019), não apresentaram nenhuma mutação em seus genes codificadores já descrita que tenha relação com a alteração da função ou perda da porina.

Em relação ao gene *oprE*, o mesmo apresentou inserções nos aminoácidos 108Ins→G, 109Ins→L, 110Ins→D nas amostras 17801, 17828 e 17973, inserindo uma nova trinca de aminoácidos para a leitura. Além destas, a inserção *frameshift* 443Ins→A, a qual altera a leitura também foi notificada nas amostras 17828 e 17973, além do códon de parada no aminoácido 388Y da amostra 17801. Nenhuma destas mutações foi encontrada na literatura sendo descrita como modificadora da função da porina ou relacionada a sua perda. Curiosamente, apenas as amostras 14297, 17138, 17749 e 17973 apresentaram não sensibilidade a ceftazidima, indicando que possivelmente estas mutações não afetaram a funcionalidade da porina e outra forma de resistência a droga pode estar atuando nas amostras resistentes.

Todas as amostras deste estudo apresentaram alterações relacionadas a perda de função ou ausência nas porinas relacionadas a entrada de carbapenêmicos. Isto corrobora com o resultado encontrado no TDD, visto que as drogas carbapenêmicas imipenem e meropenem foram as que apresentaram a maior resistência nas amostras. Não foram identificadas mutações já descritas por outros autores nos genes das porinas relacionadas a entrada de ceftazidima, o que ratifica o resultado do TDD, que classifica esta droga como a que foi exibida a menor taxa de resistência nas amostras pesquisadas.

Os genes modificadores do lipídeo A, são capazes de realizar a síntese e transferência de L-Ara4N (4-amino-4-deoxy-L-arabinosa) para o lipídeo A, o qual apresenta afinidade por cargas positivas. Através desta adição, há redução desta afinidade por cargas positivas e consequentemente, diminuição da sensibilidade às polimixinas, que atuam rompendo a membrana celular (GENTHE, THODEN & HOLDEN, 2016; LO SCIUTO *et al.*, 2020).

Na busca por mutações descritas que afetem a resistência de *P. aeruginosa* a polimixina B, nenhuma das encontradas nos genes *phoP*, *phoQ*, *pmrA*, *parR*, *cprR*, *cprS*, *colR* e *colS* foram reportadas por outros autores apenas em cepas resistentes. No gene *pmrA*, Lee e Ko (2014) reportam que a mutação no aminoácido 71L→R, presente em todas as amostras com exceção de 17138, 17749 e 17801, estaria relacionada a não sensibilidade as polimixinas, contudo, os mesmos identificaram a alteração em amostras sensíveis a colistina.

O gene *pmrB*, exibiu mutações descritas por Lee e Ko (2014) apenas em cepas resistentes a colistina, como 15V→I, 68G→S, presente nas amostras 11227 e 17801 e 343T→A, presente nas amostras 17138 e 17749. Assim como no gene *pmrA*, estes autores citam que a alteração 345Y→H, encontrada em todas as amostras com exceção de 17138 e 17749, seria relacionada a não sensibilidade a colistina, entretanto, a mutação foi identificada em amostras sensíveis a mesma.

Outro gene que também exibiu mutações descritas por Lee e colaboradores (2014) foi *parS*, o qual exibiu a mutação 398H→R em todas as amostras pesquisadas e descrita pelo autor como uma mutação que possivelmente ocorre devido a estresse externo por colistina e que gera impacto quanto a resistência a esta droga. O autor ainda descreveu a mutação em uma cepa mutante resistente a colistina.

Em relação aos genes capazes de conferir resistência às polimixinas através de alteração no lipídeo A, todas as amostras demonstraram pelo menos uma mutação relacionada a esta capacidade, sendo essa, no gene *parS*. As amostras 11227, 17138, 17749 e 17801, ainda apresentaram mutações no gene *pmrB* descritas apenas em cepas resistentes a droga.

Um ponto a se ressaltar que é citado por Olaitan, Morand e Rolain (2014), é o de que outros fatores além de mutações em TCS podem estar envolvidos na resistência de *P. aeruginosa* a drogas da classe das polimixinas e que alguns permanecem desconhecidos. Vale lembrar que este estudo foi realizado antes da identificação do plasmídeo *mcr-1* (LIU *et al.*, 2016), e, portanto, estes fatores citados pelos autores podem estar relacionados a presença do gene em plasmídeos.

As subunidades enzimáticas do DNA, DNA girase (*gyrA* e *gyrB*) e Topoisomerase IV (*parC* e *parE*), as quais auxiliam a replicação do DNA, são alvos dos antimicrobianos da classe das fluoroquinolonas, alvejando as enzimas DNA girase primeiro e então, as enzimas Topoisomerase IV. A resistência através de mutações nos genes codificadores destas enzimas se dá principalmente através de alterações em *gyrA* e *parC* e mutações em *gyrB* e *parE*, são normalmente modificações complementares (NOURI *et al.*, 2016; ARABAMERI *et al.*, 2021).

Na busca de mutações nos genes citados, nenhuma das alterações presentes em *gyrB* e *parE* foram descritas como capazes de gerar resistência a nenhum antimicrobiano da classe das fluoroquinolonas. A modificação 529I→V em *gyrB* nas amostras 17138 e 17749, ambas resistentes a ciprofloxacina, foi citada por López e colaboradores (2022) como uma mutação relevante para fluoroquinolonas. Apesar desta relevância dada pelo autor, a mutação se fez presente em cepas tanto resistentes quanto sensíveis aos antimicrobianos da classe, não podendo ser qualificada como determinante para a resistência as drogas.

Os genes *gyrA* e *parC* apresentaram mutações que são descritas por outros autores como capazes de conferir alto nível de resistência a ciprofloxacina e levofloxacina em uma amostra que apresente ambas as alterações 83T→I de *gyrA* e a 87S→L de *parC* (DOMITRIVIC *et al.*, 2016; NGUYEN *et al.*, 2018; TEO *et al.*, 2021). Ambas estas mutações estão presentes na amostra 17801, a qual exibe o perfil de resistência para ciprofloxacina. Ainda sobre *gyrA*, as amostras 9876, 17138, 17749, 17828 e 17973, exibiram deleções *frameshift* nos aminoácidos 912S→Δ e 913E→Δ,

contudo, não foram encontradas correlações de outros autores quanto a estas deleções. As amostras 9876, 17138 e 17749 apresentaram o perfil de resistência a ciprofloxacina, entretanto, as amostras 17828 e 17973, apresentaram o perfil de sensibilidade, não sendo possível correlacionar as deleções com a resistência a droga.

A busca por genes de resistência extrínseca também foi empregada, uma vez que nossas amostras demonstraram um perfil de resistência a múltiplas drogas e que apesar de ser justificado devido a ocorrência de mutações relacionadas a resistência em diversos genes pesquisados, a transferência horizontal de genes pode acelerar a disseminação de resistência em *P. aeruginosa* (YOON & JEONG, 2021).

É comum a presença de genes extrínsecos de β -lactamases nos genomas de *P. aeruginosa*, contudo, a incidência de carbapenemases tem se elevado, gerando resistência não só a essa importante classe de antimicrobianos antipseudomonais, como também alterando a eficácia de outras classes de antibióticos eficazes contra o microrganismo, como cefalosporinas e combinações de β -lactâmicos com inibidores de β -lactamases (TENOVER, NICOLAU & GILL, 2022).

Tai e colaboradores (2015) realizaram a busca por carbapenemases em cerca de 55% dos pacientes com FC colonizados por cepas de *P. aeruginosa* na Austrália e não identificaram nenhuma amostra de seu estudo carreando carbapenemases adquiridas. Em um outro ponto de vista, no estudo realizado na China por Li e colaboradores (2015) utilizando cepas de *P. aeruginosa* oriundas de pacientes com FC, de 112 amostras deste estudo, 63 (56,25%) exibiram a presença de *metallo- β -lactamases* e curiosamente, todas eram resistentes a meropenem. Baseado no que foi apresentado em ambos os estudos, é possível presumir que na FC, a presença de genes de transferência horizontal capazes de hidrolisar carbapenêmicos ainda é um fator regional.

Um ponto a ser levado em consideração no estudo de Tai e colaboradores (2015) é o de que quando o estudo foi realizado, cerca de 60% dos pacientes com FC da Austrália que estavam colonizados por *P. aeruginosa*, carreavam cepas compartilhadas que possivelmente não eram associadas a presença destes genes extrínsecos.

No Brasil, Almeida e colaboradores (2021) buscaram em aproximadamente 78 amostras de *P. aeruginosa* de pacientes com FC resistentes a carbapenêmicos a

presença de carbapenemases adquiridas, contudo, nenhuma amostra se mostrou positiva para estas.

A β -lactamase de classe C, *ampC* foi identificada na busca de genes de resistência extrínseca e também na identificação de genes de resistência intrínseca deste estudo. É sabido que grande parte das bactérias gram-negativas apresentam essa β -lactamase codificada em seu cromossomo (GLEN & LAMONT, 2021), contudo, devido à presença desta na busca extrínseca, não foi realizada uma análise por mutações no gene.

Um ponto a ser citado é de que a combinação da inativação do gene codificante da porina *oprD* aliado da super produção da β -lactamase *ampC* pode desencadear mecanismos de resistência em *P. aeruginosa* contra a grande maioria dos antimicrobianos β -lactâmicos antipseudomoniais (TENOVER, NICOLAU & GILL, 2022).

Neste estudo, todas as amostras exibiram alterações relevantes citadas por outros autores no gene *oprD* e grande parte das amostras se mostrou resistente as drogas carbapenêmicas imipenem e meropenem, contudo, a menor frequência de resistência nas amostras foi exibida justamente na cefalosporina de terceira geração ceftazidima, que é considerada um antimicrobiano β -lactâmico antipseudomonal, não sendo possível conciliar essa forma de resistência citada por Tenover, Nicolau e Gill (2022).

Durante a busca extrínseca, a oxacilinase OXA-395 foi identificada como causadora de resistência para meropenem. Esta é relacionada como sendo parte da subfamília OXA-50 like, a qual é associada com a resistência a imipenem, contudo, estudos apontam que essa oxacilinase não é eficaz na resistência a meropenem (GIRLICH, NAAS & NORDMANN, 2004; PETROVA *et al.*, 2019; YOON & JEONG, 2020).

O antimicrobiano ciprofloxacina, oriundo da classe das fluoroquinolonas, com ação inibitória da DNA girase e Topoisomerase IV é o principal antimicrobiano dentro de sua classe em relação a eficácia contra *P. aeruginosa* em pacientes com FC e, que não apresentem a doença. Sua forma inalatória se mostrou eficaz contra o patógeno, sendo capaz de penetrar inclusive biofilmes. Mutações em genes codificadores das enzimas citadas e em genes relacionados a bombas de efluxo, podem gerar

resistência a esta droga (REHMAN, PATRICK & LAMONT, 2019; BASSETTI *et al.*, 2020).

O gene horizontalmente adquirido *crpP*, relacionado com a resistência a ciprofloxacina, foi identificado em três amostras resistentes a droga deste estudo, contudo, um ponto a ser comentado, é o trazido por Hernández-García e colaboradores (2021), o qual concluiu que nem sempre a presença deste gene é associada com a resistência a ciprofloxacina. Neste estudo, apesar da presença deste gene em três amostras resistentes, outras duas amostras exibiram o perfil de resistência para a droga sem estarem apresentando o gene. É sabido que a resistência a fluoroquinolonas pode surgir devido a superexpressão de bombas de efluxo, sendo essa a possível origem da resistência nestas amostras.

Aminoglicosídeos antipseudomonais e fosfomicinas são antimicrobianos aliados no tratamento de pacientes com FC colonizados por *P. aeruginosa* e se mostram eficazes no tratamento destes pacientes em quadros de exacerbações pulmonares. Os aminoglicosídeos, contudo, podem apresentar efeitos colaterais nos rins. Entretanto, a combinação de ambas as drogas se mostrou eficaz na diminuição desses efeitos colaterais por conta de ambos antimicrobianos competirem pelos sítios de ligação renal nestes pacientes (AL-ALOU, NAZARETH & WALSHAW, 2019).

Ainda na busca extrínseca, o gene *fosA*, relacionado a resistência a fosfomicina através de inativação enzimática, foi identificado em todas as amostras deste estudo, com exceção de 17138 e 17749. Sua presença, indica contribuição para a resistência a droga (ITO *et al.*, 2017) e neste caso, permitiria a caracterização da amostra 10705 ao perfil MDR, em razão da mesma apresentar resistência a imipenem e polimixina B, nos testes de sensibilidade aos antimicrobianos executados neste estudo e também permitiria a caracterização da amostra 17973 no perfil XDR, uma vez que a mesma apresente sensibilidade a apenas duas classes de antimicrobianos (aminoglicosídeos e fluoroquinolonas).

Dois genes identificados na busca extrínseca, *OXA-486* e *aph(3')-IIB*, foram respectivamente associados a resistência a antimicrobianos β -lactâmicos e aminoglicosídeos desconhecidos. *OXA-486* é membro da subfamília *OXA-50 like* e *aph(3')-IIB*, é relacionado com a resistência a aminoglicosídeos através da inativação da droga (WOEGERBAUER *et al.*, 2014; YOON & JEONG, 2021).

Durante a análise plasmidial, apenas os genes relacionados a resistência a antimicrobianos foram selecionados para o estudo. Nenhuma das amostras apresentou o gene *mcr* em nenhum plasmídeo identificado, sugerindo então que a resistência a polimixina B, apresentada pelas amostras pesquisadas sejam relacionadas aos genes modificadores do lipídeo A.

Curiosamente, na busca plasmidial, as amostras 17828 e 17973, exibiram o gene *aaC(6')/lb*, relacionado a resistência contra aminoglicosídeos, contudo, estas não apresentaram o perfil de resistência aos antimicrobianos desta classe.

A presença deste gene não é incomum em amostras de *P. aeruginosa* de pacientes com FC e sua presença deveria ser capaz de inativar antimicrobianos da classe dos aminoglicosídeos, como tobramicina (POOLE, 2005; VAZIRI *et al.*, 2011), entretanto, este não foi o resultado obtido. Diante deste cenário, é possível supor que o gene esteja presente nas amostras, mas não esteja sendo expresso.

Numerosos clones epidêmicos de *P. aeruginosa* em pacientes com FC associados a resistência a antimicrobianos têm sido descritos pelo mundo (PARKINS, SOMAYAJI & WATERS, 2018). Apesar disto, não há relatos até o presente momento da circulação destes clones em amostras brasileiras.

Ferreira e colaboradores (2015) descrevem em seu estudo uma alta diversidade clonal exibida em cepas brasileiras de *P. aeruginosa* oriundas de pacientes com FC, dos quais 274 isolados estudados, 224 exibiam perfis distintos, o que não se vê em outros países, como citado por Tai e colaboradores (2015) que identificaram que 60% das cepas de *P. aeruginosa* de pacientes com FC da Austrália ancoravam cepas compartilhadas, sendo as predominantes, os clones epidêmicos AES-01 e AES-02.

Neste estudo, quatro amostras exibiram perfis idênticos entre si, as amostras 17138 e 17749, exibindo o ST 2211, o qual foi armazenado na base de dados do PubMLST em 2019 de um país desconhecido e as amostras 17828 e 17973, descritas pela primeira vez neste estudo e cadastradas sob o ST 4053, disponíveis no ID de busca da base de dados 8447 e 8448 respectivamente.

Além da classificação de três novos STs (4051, 4052 e 4053), a tipificação molecular nos permitiu endossar, ainda que com um número baixo de amostras, a ausência de clones epidêmicos *P. aeruginosa* de pacientes com FC, como já reportado por estudos anteriores no Brasil (LEÃO *et al.*, 2010; FERREIRA *et al.*, 2015).

Entretanto, a vigilância quanto a estes deve ser constante, vide a alta capacidade de circulação pelo mundo e de carrear diversos genes de resistência e exibir virulência apresentado por estes.

A descoberta e o desenvolvimento de estratégias terapêuticas alternativas que apresentem novos caminhos contra as infecções por *P. aeruginosa* são cada vez mais exigidas e estão ganhando cada vez mais atenção. Embora principalmente nos estágios pré-clínicos, muitos estudos recentes relataram várias tecnologias terapêuticas inovadoras que demonstraram eficácia pronunciada no combate a cepas de *P. aeruginosa* resistentes a medicamentos (PANG *et al.*, 2019).

O SGT se mostra como uma destas ferramentas de extrema eficácia no auxílio do conhecimento para alavancar o combate a esses microrganismos exibindo diversos mecanismos de resistência. O entendimento da origem tanto dos mecanismos de resistência quanto da própria cepa, pode direcionar uma melhor forma de tratamento ao paciente e garantir que o controle da infecção ou mesmo a erradicação, melhorando a qualidade de vida destes.

CONCLUSÃO

A análise do perfil de resistência observado em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* recuperadas de pacientes com fibrose cística exibindo resistência a polimixina B expôs um alto perfil de resistência principalmente aos antimicrobianos da classe dos carbapenêmicos.

Duas amostras oriundas de um mesmo paciente e apresentando o mesmo ST, exibiram um resultado de extrema importância, visto que demonstraram resistência a todas as drogas testadas. Este é um perfil extremamente prejudicial aos pacientes, uma vez que a escassez de antimicrobianos eficazes para o tratamento prejudica tanto a qualidade de vida quanto a expectativa de vida dos pacientes.

O teste comercial POLICIMBAC utilizado neste estudo apresentou divergências com os resultados obtidos no método de referência. A maioria das amostras em que se observou essa divergência foi de apenas de uma concentração de diluição do antimicrobiano. Entretanto, com o uso do sistema comercial, todas as amostras foram enquadradas na categoria intermediária, diferentemente do teste de referência que classificou as amostras como resistentes. Essa discrepância pode influenciar em uma má administração clínica do antimicrobiano com o uso de concentrações ineficazes para o tratamento dos pacientes.

Ainda que as amostras de *P. aeruginosa* resistentes a polimixinas tenham tendência a exibir perfis de resistência a múltiplas drogas, nove das dez amostras foram classificadas nos perfis MDR (5) e XDR (4) e apenas uma não pôde ser categorizada por não apresentar resistência nos testes exercidos, contudo, esta apresentou o gene *fosA*, capaz de conferir resistência a fosfomicina, e caso expresse este, poderia ser enquadrada no perfil MDR.

A análise molecular no gene repressor da expressão do sistema de efluxo MexXY, *mexZ*, identificou um códon de parada prematuro, relacionado com a perda da função repressora do gene na amostra 14339. Esta bomba, quando superexpressa, é capaz de exportar aminoglicosídeos com excelência, fato que pode ser relacionado com a resistência da amostra aos antimicrobianos da classe deste estudo.

A capacidade de resistência aos carbapenêmicos foi relacionada principalmente a mutações nos genes codificadores das porinas oprD, opdP e opdD, sendo encontradas modificações relacionadas a amostras expressando resistência a esta classe em toda a amostragem deste estudo. Apesar disto, não foi possível definir com precisão quais genes foram responsáveis pela resistência a classe, uma vez que todos apresentaram alterações descritas por outros autores em cepas resistentes.

Em relação a busca de resistência a polimixinas, genes codificadores dos sistemas de dois componentes, relacionados com a resistência a classe via modificação do lipídeo A, foram analisados e modificações relevantes para a resistência e tolerância a classe foram identificadas nos genes *parS*, e *pmrB*.

Para as fluoroquinolonas, modificações consideradas como capazes de conferir alto nível de resistência a classe foram identificadas nos genes codificadores das enzimas DNA girase (*gyrA*) e Topoisomerase IV (*parC*) na amostra 17801, a qual expressa resistência as drogas da classe investigadas no estudo.

Apesar da identificação do gene *aph(3')-IIB* nas amostras 17828 e 17973 nas buscas extrínsecas e plasmidiais, ambas as amostras não exibiram o perfil de resistência as drogas deste estudo, possibilitando a hipótese do gene estar presente mas não expresso nas amostras.

Além destes, genes conferindo resistência a aminoglicosídeos (*aph(3')-IIB*) e β -lactâmicos (*OXA-4* e *OXA-486*) desconhecidos, não foi possível conciliar sua presença com a expressão da resistência nas amostras.

Outros genes relacionados a resistência de fosfomicina (*fosA*), sulfonamidas (*sul1*) e cloranfenicol (*catB7*) também foram identificados, exibindo características de multirresistência nestas amostras, contudo, estas classes não foram avaliadas na determinação do perfil de resistência das amostras.

Quatro amostras incluídas neste estudo, apresentaram STs compartilhados, sendo duas do ST2211 e duas do ST4053, sendo o primeiro, exibido em duas amostras isoladas do mesmo paciente, sugerindo cronicidade.

Tomando como base os STs relacionados a amostras epidêmicas de FC, não foram encontradas evidências que pudessem associar as amostras deste estudo a esses clones, comumente observados em pacientes com FC ao redor do mundo. Ainda assim, é essencial que os indivíduos com FC sejam monitorados regularmente na busca de possíveis clones compartilhados.

Através da investigação do ambiente genético destes microrganismos pelo SGT, há melhor possibilidade do entendimento dos mecanismos de resistência exercidos por *P. aeruginosa* e melhor capacidade do manuseio e tratamento de exacerbações pulmonares ocasionadas pelo microrganismo em indivíduos com FC, assim como a vigilância da ocorrência de clones epidêmicos de FC no Brasil, os quais ainda não se fazem presente.

REFERÊNCIAS

- AGUILAR-RODEA, P., *et al.* Nucleotide substitutions in the *mexR*, *nalC* and *nalD* regulator genes of the MexAB-OprM efflux pump are maintained in *Pseudomonas aeruginosa* genetic lineages. *PloS One*, v. 17, n. 5., maio 2022. DOI: 10.1371/journal.pone.0266742.
- AL-ALOUL, M., NAZARETH, D., WALSHAW, M. The renoprotective effect of concomitant fosfomycin in the treatment of pulmonary exacerbations in cystic fibrosis. *Clinical Kidney Journal*, v. 12, n. 5, p. 652-658., fev 2019. DOI: 10.1093/ckj/sfz005.
- ALMEIDA, M. M., *et al.* Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Chronic Lung Infection: Current Resistance Profile and Hypermutability in Patients with Cystic Fibrosis. *Current Microbiology*, v. 78, n. 2, p. 696-704., fev 2021. DOI: 10.1007/s00284-020-02337-0.
- AMBLER, R. P. The structure of β -lactamases. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* (Great Britain, England), p. 321-331., maio 1980. DOI: doi: 10.1098/rstb.1980.0049.
- ANDREWS, S. FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence, 2010. Disponível em: < bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>. Acesso em 03 de abril de 2023.
- ANVISA. Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde. *Agencia Nacional de Vigilância Sanitária*, 1. ed., Salvador, 2004.
- ANTIPOV, D., *et al.* plasmidSPAdes: assembling plasmids from whole genome sequencing data. *Bioinformatics*, v. 32 n. 22, p. 3380-3387., julho 2016. DOI: 10.1093/bioinformatics/btw493.
- ARABAMERI, N., *et al.* The role of Gene Mutations (*gyrA*, *parC*) in Resistance to Ciprofloxacin in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Iran Journal of Pathology*, v. 16, n. 4, p. 426-432., julho 2021. DOI: 10.30699/IJP.2021.520570.2542.
- AZAM, M. W., KHAN, A. U. Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. *Drug Discovery Today*, v. 24, n. 1, p. 350-359., Jan 2019. DOI: 10.1016/j.drudis.2018.07.003.
- BALLOUX, F., *et al.* From Theory to Practice: Translating Whole-Genome Sequencing (WGS) into the Clinic. *Trends in Microbiology*, v. 26, n. 12, p. 1035-1048., dez 2018. DOI: 10.1016/j.tim.2018.08.004.
- BANKEVICH, A., *et al.* SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology*, v. 19, n. 5, p. 455-477., maio 2012. DOI: 10.1089/cmb.2012.0021.

BASSETTI M., *et al.* How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs in Context*; 7: 212527., maio 2018. DOI: 10.7573/dic.212527.

BASSETTI, M., *et al.* Inhaled Liposomal Antimicrobial Delivery in Lung Infections. *Drugs*, v. 80, n. 13, p. 1309-1318., set 2020. DOI: 10.1007/s40265-020-01359-z.

BERGERON, C., CANTIN, A. M. Cystic Fibrosis: Pathophysiology of Lung Disease. *Semin. Respir. Crit. Car. Med.*, v. 40, n. 6, p. 715-726., dez 2019. DOI: 10.1055/s-0039-1694021.

BOGAERTS, B., *et al.* Evaluation of WGS performance for bacterial pathogen characterization with the Illumina technology optimized for time-critical situations. *Microbial Genomics*, v. 7, n. 11., nov 2021. DOI: 10.1099/mgen.0.000699.

BROOKE, J. S. Advances in the Microbiology of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 34, n. 3, 2021. DOI: 10.1128/CMR.00030-19.

BV-BRC. BACTERIAL AND VIRAL BIOINFORMATICS RESOURCE CENTER. Disponível em: <bv-brc.org>. Acesso em 03 de abril de 2023.

CAI, B., *et al.* Prevalence of Carbapenem-Resistant Gram-Negative Infections in the United States Predominated by *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Open Forum Infectious Diseases*, v. 4, n. 3., ago 2017. DOI: 10.1093/ofid/ofx176.

CARTER, M. E. K., *et al.* A Subtype of a *Pseudomonas aeruginosa* Cystic Fibrosis Epidemic Strain Exhibits Enhanced Virulence in a Murine Model of Acute Respiratory Infection. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 202, n. 6, p. 935-942., set 2010. DOI: 10.1086/655781.

CARVER, T., *et al.* DNAPlotter: circular and linear interactive genome visualization. *Bioinformatics*, v. 25, n. 1, p. 119-120., nov 2009. DOI: 10.1093/bioinformatics/btn578.

CASTELLANI, C., ASSAEL, B. M. Cystic fibrosis: a clinical view. *Cell. Mol. Life Sci.*, v. 74, n. 1, p. 129-140., out. 2016. DOI: 10.1007/s00018-016-2393-9.

CASTELLANI, C., *et al.* Cystic Fibrosis Diagnosis in Newborns, Children, and Adults. *Semin. Respir. Care Med.* (Genoa, Italy), v. 40, n. 5, p. 701-714, 2019. DOI: 10.1055/s-0039-1697961.

CFTR2. The Clinical and Functional Translation of CFTR. Disponível em: <https://cftr2.org/>. Acesso em 03 de abril 2023.

CHAMBERS, D., *et al.* Factors associated with infection by *Pseudomonas aeruginosa* in adult cystic fibrosis. *European Respiratory Journal*, v. 26, n. 4, p. 651-656., out 2005. DOI: 10.1183/09031936.05.00126704.

CHENG, K., *et al.* Spread of β -lactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a cystic fibrosis clinic. *The Lancet*, v. 348, n. 9028, p. 639-642., set 1996. DOI: 10.1016/S0140-6736(96)05169-0.

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

CHMIEL, J. F., DAVIS, P. B. State of the Art: Why do the lungs of patients with cystic fibrosis become infected and why can't they clear the infection?. *Respiratory Research*, v. 4, n. 1, ago 2003. DOI: 10.1186/1465-9921-4-8.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. M02-A12.** 13th ed., v. 38, n. 1, Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically M07-A10.** 11th ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.** 31st ed., v. 41, n. 3. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2021.

COSTA-JÚNIOR, S. D., *et al.* Emergence of *rmtD1* gene in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* carrying *blaKPC* and/or *blaVIM-2* genes in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 52, n. 4, p. 1959-1965., dez 2021. DOI: 10.1007/s42770-021-00576-2.

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

DALMOLIN, T. V., *et al.* Evaluation of the susceptibility test of polymyxin B using the commercial test Policimbac®. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 51, n. 3, p. 1135-1137., set 2020. DOI: 10.1007/s42770-020-00246-9.

DE BOECK, K., VERMEULEN, F., DUPONT, L. The diagnosis of cystic fibrosis. *Presse med.*, junho 2017. DOI: 10.1016/j.lpm.2017.04.010.

DE BOECK, K. Cystic fibrosis in the year 2020: A disease with a new face. *Acta Paediatrica*, v. 109, n. 5, p. 893-899., jan 2020. DOI: 10.1111/apa.15155.

DING, F., *et al.* Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* is predisposed to *lasR* mutation through up-regulated activity of efflux pumps in non-cystic fibrosis bronchiectasis patients. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 12., julho 2022. DOI: 10.3389/fcimb.2022.934439.

DOMITROVIC, T. N., *et al.* Multidrug Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Causing Prosthetic Valve Endocarditis: A Genetic-Based Chronicle of Evolving Antibiotic

Resistance. *Open Forum Infectious Diseases*, v. 3, n. 4., out 2016. DOI: 10.1093/ofid/ofw188.

DOURAGHI, M., *et al.* Molecular identification of *Pseudomonas aeruginosa* recovered from cystic fibrosis patients. *Journal of preventive medicine and hygiene*, v. 55, n. 2, junho 2014.

DUIN, D. V., DOI, Y. The global epidemiology of carbapenemase- producing *Enterobacteriaceae*. *Virulence*, v. 8, n. 4, 460-469., 2017. DOI: 10.1080/21505594.2016.1222343.

DURDA-MASNY, M., *et al.* The determinants of survival among adults with cystic fibrosis – a cohort study. *Journal of Physiological Anthropology*, v. 40, n. 1., nov 2021. DOI: 10.1186/s40101-021-00269-7.

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

ESCANDÓN-VARGAS, K., *et al.* The epidemiology of carbapenemases in Latin America and the Caribbean, *Expert Review of Anti-infective Therapy*, v. 15, n. 3, p. 277-297., mar 2017. DOI: 10.1080/14787210.2017.1268918.

ESPOSITO, S. *et al.* What is the role of *Achromobacter* species in patients with cystic fibrosis?. *Frontiers in Bioscience-Landmark ed*), v. 26, n. 12, p. 1613-1620., dez 2021. DOI: 10.52586/5054.

ESQUISABEL, A. B., *et al.* Mechanisms of resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* less susceptible to cefepime than to ceftazidime. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v. 17, n. 12, p. 1817-1822., dez 2011. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2011.03530.x.

FARRA, A., *et al.* Role of outer membrane protein OprD and penicillin-binding proteins in resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to imipenem and meropenem. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 31, n. 5, p. 427-433., maio 2008. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2007.12.016.

FERREIRA, A. G., *et al.* Low-level resistance and clonal diversity of *Pseudomonas aeruginosa* among chronically colonized cystic fibrosis patients. *APMIS*, v. 123, n. 12, p. 1061-1068., dez 2015. DOI: 10.1111/apm.12463.

FERRY, T., *et al.* Personalized bacteriophage therapy to treat pandrug-resistant spinal *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Nature Communications*, v. 13, n. 1., julho 2022. DOI: 10.1038/s41467-022-31837-9.

FLUIT, A. C., *et al.* Fatal Carbapenem Resistance Development in *Pseudomonas aeruginosa* Under Meropenem Monotherapy, Caused by Mutations in the OprD Outer Membrane Porin. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, v. 38, n. 4, p. 398-399. abril 2018. DOI: 10.1097/INF.0000000000002244.

GABRIELAITE, M. *et al.* *Achromobacter* spp. Genetic adaptation in cystic fibrosis. *Microbial Genomics*, v. 7, n. 7, julho 2021. DOI: 10.1099/mgen.0.000582.

GBEFC. Grupo de Estudos Brasileiros em Fibrose Cística. *Registro Brasileiro de Fibrose Cística*, 2020. <http://portalgbefc.org.br/>.

GENTHE, N. A., THODEN, J. B., HOLDEN, H. M. Structure of the *Escherichia coli* ArnA N-formyltransferase domain in complex with N⁵-formyltetrahydrofolate and UDP-Ara4N. *Protein Science*, v. 25, n. 8, p. 1555-1562., ago 2016. DOI: 10.1002/pro.2938.

GIRLICH, D., NAAS, T., NORDMANN, P. Biochemical Characterization of the Naturally Occurring Cxacillinase OXA-50 of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v. 48, n. 6, p. 2043-2048., junho 2004. DOI: 10.1128/AAC.48.6.2043-2048.2004.

GLEN, K. A., LAMONT, I. L. β -lactam Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Current Status, Future Prospects. *Pathogens*, v. 10, n. 12., dez 2021. DOI: 10.3390/pathogens10121638.

GNIADAK, T. J., CARROLL, K. C., SIMNER, P. J. Carbapenem-Resistant Non-Glucose-Fermenting Gram-Negative Bacilli: the Missing Piece to the Puzzle. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 54, n. 7, p. 1700 –1710., julho 2016. DOI: 10.1128/JCM.03264-15.

GOSS, C. H. Acute pulmonary exacerbation in cystic fibrosis. *Semin Respir Crit Care Med*, v. 40, n. 6, p. 792-803., dez 2019. DOI: 10.1055/s-0039-1697975.

GUREVICH, A., *et al.* QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*, v. 29, n. 8, p. 1072-1075., fev 2013 DOI: 10.1093/bioinformatics/btt086.

HAENNI, M., *et al.* Resistance of Animal Strains of *Pseudomonas aeruginosa* to Carbapenems. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, n. 1847. set 2017. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01847.

HAKKI, M., *et al.* Fluoroquinolone Prophylaxis Selects for Meropenem-nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa* in Patients With Hematologic Malignancies and Hematopoietic Cell Transplant Recipients. *Clinical Infectious Diseases*, v. 68, n. 12, p. 2045-2052., maio 2019. DOI: 10.1093/cid/ciy825.

HAMEED, F., *et al.* Plasmid-mediated *mcr-1* gene in *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*: first report from Pakistan. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 52., set 2019. DOI: 10.1590/0037-8682-0237-2019.

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

HERNÁNDEZ-GARCÍA, M., *et al.* Distinct epidemiology and resistance mechanisms affecting ceftolozane/tazobactam in *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from ICU patients in Spain and Portugal depicted by WGS. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 76, n. 2, p. 370-379., jan 2021. DOI: 10.1093/jac/dkaa430.

HERNÁNDEZ-GARCÍA, M., *et al.* Presence of Chromosomal *crpP*-like Genes Is Not Always Associated with Ciprofloxacin Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates Recovered in ICU Patients from Portugal and Spain. *Microorganisms*, v. 9, n. 2., fev 2021. DOI:10.3390/microorganisms9020388.

HORCAJADA, J. P., *et al.* Epidemiology and Treatment of Multidrug-Resistant and Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 32, n. 4, P. e00031-00019., ago 2019. DOI: 10.1128/CMR.00031-19.

HORNA, G., *et al.* Interplay between MexAB-OprM and MexEF-OprN in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Scientific Reports*, v. 8, n. 16463., nov 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-34694-z.

HUSSEIN, M., *et al.* Mechanistic Insights From Global Metabolomic Studies into Synergistic Bactericidal Effect of a Polymyxin B Combination With Tamoxifen Against Cystic Fibrosis MDR *Pseudomonas aeruginosa*. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, v. 16, p. 587-599., nov 2018. DOI: 10.1016/j.csbj.2018.11.001.

HUSSEIN, N. H., *et al.* Mobilized colistin resistance (*mcr*) genes from 1 to 10: a comprehensive review. *Molecular Biology Reports*, v. 48, n. 3, p. 2897-2907., mar 2021. DOI: 10.1007/s11033-021-06307-y.

IDOWU, T., *et al.* Potentiators of β -lactam antibiotics and β -lactam/ β -lactamase inhibitor combinations against MDR and XDR *Pseudomonas aeruginosa* using non-ribosomal tobramycin-cyclam conjugates. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 74, n. 9, p. 2640-2648., set 2019. DOI: 10.1093/jac/dkz228.

ISABELLA, V. M., *et al.* Toward the Rational Design of Carbapenem Uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *Chemistry & Biology*, v. 22, n. 4, p. 535-547., abril 2015. DOI: 10.1016/j.chembiol.2015.03.018.

ITO, R., *et al.* Widespread Fosfomycin Resistance in Gram-Negative Bacteria Attributable to the Chromosomal *fosA* Gene. *mBio*, v. 8, n. 4., ago 2017. DOI: 10.1128/mBio.00749-17.

JACKSON, L., WATERS, V. Factors influencing the acquisition and eradication of early *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*, v. 20, n. 1, p. 8-16., jan 2021. DOI: 10.1016/j.jcf.2020.10.008.

JOHANSEN, H. K., *et al.* Spread of colistin resistant non-mucoid *Pseudomonas aeruginosa* among chronically infected Danish cystic fibrosis patients. *Journal of Cystic Fibrosis*, v. 7, n. 5, p. 391-397., set 2008. DOI: 10.1016/j.jcf.2008.02.003.

- JONES, A. M., *et al.* Spread of a multiresistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* in an adult cystic fibrosis clinic. *The Lancet*, v. 358, n. 9281, p. 557-558., ago 2001. DOI: 10.1016/s0140-6736(01)05714-2.
- KAMAL, S. M., *et al.* Two FtsH Proteases Contribute to Fitness and Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* Clone C Strains. *Frontiers in Microbiology*, v. 10, n. 1372., julho 2019. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01372.
- KAO, C., *et al.* Overproduction of active efflux pump and variations of OprD dominate in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with bloodstream infections in Taiwan. *BMC Microbiology*, v. 16, n. 107., junho 2016. DOI: :10.1186/s12866-016-0719-2.
- KIM, B., *et al.* Nitrate respiration promotes polymyxin B resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antioxidants and Redox Signaling*, v. 34, n. 6, p. 442-451., fev 2021. DOI: 10.1089/ars.2019.7924.
- KIM, C. H., *et al.* Mutational inactivation of OprD in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Korean hospitals. *Journal of Microbiology*, v. 54, n. 1, p. 44-49., jan 2016. DOI: 10.1007/s12275-016-5562-5.
- LABARCA, J. A., *et al.* Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in the nosocomial setting in Latin America. *Critical Reviews in Microbiology*, v. 42, n. 2, p. 276-292., ago 2014. DOI: 10.3109/1040841X.2014.940494.
- LABORDA, P., *et al.* Antibiotic Resistance in *Pseudomonas*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 1386, p. 117-143., 2022. DOI: 10.1007/978-3-031-08491-1_5.
- LAU, G. W., *et al.* The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *TRENDS in Molecular Medicine*, v. 10, n. 12, p. 599-606., dez 2004. DOI: 10.1016/j.molmed.2004.10.002.
- LEÃO, R. S., *et al.* COMPARISON OF THE WORLDWIDE TRANSMISSIBLE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* WITH ISOLATES FROM BRAZILIAN CYSTIC FIBROSIS PATIENTS. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 41, n. 4, p. 1079-1081., out 2010. DOI: 10.1590/S1517-838220100004000028.
- LEE, C., *et al.* Why? – Successful *Pseudomonas aeruginosa* clones with a focus on clone C. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 44, n. 6, p. 740-762., nov 2020. DOI: 10.1093/femsre/fuaa029.
- LEE, J., *et al.* Development of colistin resistance in *pmrA*-, *phoP*, *parR*- and *cprR*-inactivated mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 69, n. 11, p. 2966-2971., nov 2014. DOI: 10.1093/jac/dku238.
- LEE, J., KO, K. S. Mutations and expression of PmrAB and PhoPQ related with colistin resistance in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Diagnostic*

Microbiology and Infectious Diseases, v. 78, n. 3, p. 271-276., mar 2014. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2013.11.027.

LEITÃO, J. H. Microbial Virulence Factors. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 15., ago 2020. DOI: 10.3390/ijms21155320.

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, n. 1, p. 494-498., jan 2015. DOI: 10.3892/mmr.2014.2685.

LIMA, M. R., *et al.* Evaluation of the interaction between polymyxin B and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm and planktonic cells: reactive oxygen species induction and zeta potential. *BMC Microbiology*, v. 19, n. 1., maio 2019. DOI: 10.1186/s12866-019-1485-8.

LIU, Y., *et al.* Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infectious Diseases*, v. 16, n. 2, p. 161-168., fev 2016. DOI: 10.1016/S1473-3099(15)00424-7.

LLANES, C., *et al.* Role of the MexEF-OprN Efflux System in Low-Level Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to Ciprofloxacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 55, n. 12, p. 5676-5684., dez 2011. DOI: 10.1128/AAC.00101-11.

LIVERMORE, D. M. Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 47, n. 3, p.247-250. mar 2001. DOI: 10.1093/jac/47.3.247.

LO SCIUTO, A., *et al.* Effect of lipid A aminoarabinylation on *Pseudomonas aeruginosa* colistin resistance and fitness. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 55, n. 5., maio 2020. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2020.105957.

LÓPEZ M., *et al.* Resistance to Fluoroquinolones in *Pseudomonas aeruginosa* from Human, Animal, Food and Environmental Origin: the role of *crpP* and Mobilizable ICEs. *Antibiotics*, v. 11, n. 9., set 2022. DOI: 10.3390/antibiotics11091271.

LORD, R., JONES, A. M., HORSLEY, A. Antibiotic treatment for *Burkholderia cepacia* complex in people with cystic fibrosis experiencing a pulmonary exacerbation. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, Issue 4, n. CD009529., abril 2020. DOI: 10.1002/14651858.CD009529.pub4.

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., julho 2018. DOI: 10.1111/crj.12787.

LUTZ, L., *et al.* Hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic fibrosis patients from two Brazilian cities. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 51, n. 3, p. 927-930., mar 2013. DOI: 10.1128/JCM.02638-12.

MAGALHÃES, B., *et al.* Combining Standard Molecular Typing and Whole Genome Sequencing to Investigate *Pseudomonas aeruginosa* Epidemiology in Intensive Care Units. *Frontiers in Public Health*, v. 8, n. 3., jan 2020. DOI: 10.3389/fpubh.2020.00003.

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. *Clin Microbiol Infect*, v. 18, n. 3, p. 268-281., mar 2012. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.

MALHOTRA, S., HAYES, D. Jr, WOZNIAK, D. J. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and regional inflammation in the cystic fibrosis lung. *Journal of Cystic Fibrosis*, v. 18, n. 6, p. 796-803., abril 2019. DOI: 10.1016/j.jcf.2019.04.009.

MARTIN, K., *et al.* Clusters of genetically similar isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from multiple hospitals in the UK. *Journal of Medical Microbiology*, v. 62, p. 988-1000., julho 2013. DOI: 10.1099/jmm.0.054841-0.

MIELKO, K. A., *et al.* Metabolomic studies of *Pseudomonas aeruginosa*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 35, n. 11., nov 2019. DOI: 10.1007/s11274-019-2739-1.

MIYOSHI-AKIYAMA, T., *et al.* Emergence and Spread of Epidemic Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Genome Biol. Evol.*, v. 9, n. 12, p. 3238-3245., dez 2017. DOI: 10.1093/gbe/evx243.

MOORE, M. P., *et al.* Transmission, adaptation and geographical spread of the *Pseudomonas aeruginosa* Liverpool epidemic strain. *Microbial Genomics*, v. 7, n. 3., mar 2021. DOI: 10.1099/mgen.0.000511.

MOSKOWITZ, S. M. *et al.* PmrB Mutations Promote Polymyxin Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Colistin-Treated Cystic Fibrosis Patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 56, n. 2, p. 1019-1030., fev 2012. DOI: 11.1128/AAC.05829-11

MUDERRIS, T., *et al.* Role of efflux pump and OprD porin expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Journal of Infection in Developing Countries*, v. 12, n. 1, p. 001-008., 2018. DOI:10.3855/jidc.9486.

MUSTAFA, M., *et al.* Antimicrobial Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Cystic Fibrosis Patients in Northern Europe. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 60, n. 11, p. 6735-6741., nov 2016. DOI: 10.1128/AAC.01046-16.

NGUYEN, L., *et al.* Multidrug-Resistant *Pseudomonas* Infections: Hard to Treat, But Hope on the Horizon?. *Current Infectious Disease Reports*, v. 20, n. 8., junho 2018. DOI: 10.1007/s11908-018-0629-6.

NITZ, F., *et al.* Molecular Detection of Drug-Resistance Genes of *bla*OXA-23-*bla*OXA-51 and *mcr-1* in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microorganisms*, v. 9, n. 4., abril 2021. DOI: 10.3390/microorganisms9040786.

- NORDMANN, P., POIREL, L. Strategies for identification of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 68, n. 3, p. 487-489., mar 2013. DOI: 10.1093/jac/dks426.
- NORDMANN, P., POIREL, L. Epidemiology and Diagnostics of Carbapenem Resistance in Gram-negative Bacteria. *Clinical Infectious Diseases*, v. 69, p. s521-s528., nov 2019 DOI: 10.1093/cid/ciz824.
- NOURI, R., et al. The role of *gyrA* and *parC* mutations in fluroquinolones-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Iran. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 47, n. 4, p. 925-930., out 2016. DOI: 10.1016/j.bjm.2016.07.016.
- OLAITAN, A. O., MORAND, S., ROLAIN, J. M. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Frontiers in Microbiology*, v. 5, nov 2014. DOI: doi.org/10.3389/fmicb.2014.00643.
- ONG, V. et al. Nanomedicine for Cystic Fibrosis. *SLAS Technology*, v. 24, n. 2, p. 169-180., ago 2018. DOI: 10.1177/2472630318824334.
- ORLANDI, V. T., et al. Pigments influence the tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 to photodynamically induced oxidative stress. *Microbiology*, v. 161, n. 12, p. 2298-2309., dez 2015. DOI: 10.1099/mic.0.000193.
- PANG, Z., et al. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances*, v. 37, n. 1, p. 177-192., fev 2019. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2018.11.013.
- PARKINS, M. D., SOMAYAJI, R., WATERS, V. J. Epidemiology, Biology, and Impact of Clonal *Pseudomonas aeruginosa* Infections in Cystic Fibrosis. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 31, n. 4, p. e00019-e00018., ago 2018. DOI: 10.1128/CMR.00019-18.
- PEDERSEN, S. S., et al. An epidemic spread of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* in a cystic fibrosis centre. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 17, n. 4, p. 505-516., abril 1986. DOI: 10.1093/jac/17.4.505.
- PEDERSEN, S. S. et al. Colistin resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Achromobacter* spp. cultured from Danish cystic fibrosis patients is not related to plasmid-mediated expression of *mcr-1*. *Journal of Cystic Fibrosis*, v. 17, n. 2, p. e22-e23., mar 2018. DOI: doi.org/10.1016/j.jcf.20017.12.001.
- PETROVA, A., et al. First detected OXA-50 carbapenem-resistant clinical isolates *Pseudomonas aeruginosa* from Bulgaria and interplay between the expression of main efflux pumps, OprD and intrinsic AmpC. *Journal of Medical Microbiology*, v. 68, n. 12, p. 1723-1731., dez 2019. DOI: 10.1099/jmm.0.001106.
- PINHEIRO, M. P. DETECÇÃO FENOTÍPICA DA RESISTÊNCIA À POLIMIXINA EM BACILOS GRAM-NEGATIVOS: MÉTODOS LABORATORIAIS ALTERNATIVOS.

2020. 58 f. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Federal Fluminense, Niterói.

POOLE, K. Aminoglycoside Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 49, n. 2, p. 479-487., fev 2005. DOI: 10.1128/AAC.49.2.479-487.2005.

PRICKETT, M. H., *et al.* AMINOGLYCOSIDE RESISTANCE OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* IN CYSTIC FIBROSIS RESULTS FROM CONVERGENT EVOLUTION IN THE MEXZ GENE. *Thorax*, v. 72, n. 1, p. 40-47., jan 2017. DOI: 10.1136/thoraxjnl-2015-208027.

PUJA, H., *et al.* The Efflux Pump MexXY/OprM Contributes to the Tolerance and Acquired Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to Colistin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 64, n. 4., mar 2020. DOI: 10.1128/AAC.02033-19.

PUZARI, M., CHETIA, P. RND efflux pump mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*: a major issue worldwide. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 33, n. 2., fev 2017. DOI: 10.1007/s11274-016-2190-5.

QIN, S., *et al.* *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, v. 7, n. 1., junho 2022. DOI: 10.1038/s41392-022-01056-1.

QUAINOO, S., *et al.* Whole-Genome Sequencing of Bacterial Pathogens: the Future of Nosocomial Outbreak Analysis. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 30, n. 4, p. 1015-1063., out 2017. DOI: 10.1128/CMR.00016-17.

QUON, B. S., GOSS, C. H., RAMSEY, B. W. Inhaled Antibiotics for Lower Airway Infections. *Annals of the American Thoracic Society*, v. 11, n. 3, p. 425-434., mar 2014. DOI: 10.1513/AnnalsATS.201311-395FR.

RAFEEQ, M. M., MURAD, H. A. S. Cystic fibrosis: current therapeutic targets and future approaches. *Journal of Translational Medicine*, v. 15, n. 1., abril 2017. DOI: 10.1186/s12967-017-1193-9.

REECE, E., BETTIO, P. H. A., RENWICK J. Polymicrobial Interactions in the Cystic Fibrosis Airway Microbiome Impact the Antimicrobial Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotics*, v. 10, n. 7., julho 2021. DOI: 10.3390/antibiotics10070827.

REHMAN, A., PATRICK, W. M., LAMONT, I. L. Mechanisms of ciprofloxacin resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: new approaches to an old problem. *Journal of Medical Microbiology*, v. 68, n. 1, p. 1-10., jan 2019. DOI: 10.1099/jmm.0.000873.

ROSENFELD, M., SONTAG, M. K., REN, C. L. Cystic Fibrosis Diagnosis and Newborn Screening. *Pediatric Clinics of North America*, v. 63, n. 4, p. 599-615., ago 2016. DOI: 10.1016/j.pcl.2016.04.004.

RUEDAS-LÓPEZ, A., *et al.* Selection of AmpC β -Lactamase Variants and Metallo- β -Lactamases Leading to Ceftolozane/Tazobactam and Ceftazidime/Avibactam Resistance During Treatment of MDR/XDR *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 66, n. 2., fev 2022. DOI: 10.1128/AAC.02067-21.

RUMPF, C. *et al.* *Staphylococcus aureus* and Cystic Fibrosis – A Close Relationship. What Can We Learn from Sequencing Studies?. *Pathogens*, v. 10, n. 9., set 2021. DOI: 10.3390/pathogens10091177.

SADER, H. S., *et al.* Antimicrobial activity of ceftazidime/avibactam, ceftolozane/tazobactam and comparator agents against *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients. *JAC – Antimicrobial Resistance*, v. 3, n. 3., set 2021. DOI: 10.1093/jacamr/dlab126.

SALIU, F., *et al.* Chronic infection by nontypeable *Haemophilus influenzae* fuels airway inflammation. *European Respiratory Society*, v. 7, n. 1., mar 2021. DOI: 10.1183/23120541.00614-2020.

SAMANTA, S., *et al.* Getting drugs through small pores: exploiting the porins pathway in *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS Infectious Diseases*, v. 4, n. 10, p. 1519-1528., out 2018. DOI: 10.1021/acsinfecdis.8b00149.

SANDERS, M., *et al.* Genomic, Transcriptomic, and Protein Landscape Profile of CFTR and Cystic Fibrosis. *Human Genetics*, v. 140, n. 3, p. 423-439., mar 2021. DOI: 10.1007/s00439-020-02211-w.

SAVINOVA, T. A., *et al.* Computer Program for Detection and Analyzing the Porin-Mediated Antibiotic Resistance of Bacteria. *Sovrem Tekhnologii Med*, v. 13, n. 6, p. 15-22., 2021. DOI: 10.17691/stm2021.13.6.02.

SCHUREK, K. N., *et al.* Involvement of *pmrAB* and *phoPQ* in Polymyxin B Adaptation and Inducible Resistance in Non-Cystic Fibrosis Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 53, n. 10, p. 4345-4351., out 2009. DOI: 10.1128/AAC.01267-08.

SCHWENGERS, O., *et al.* Bakta: rapid and standardized annotation of bacterial genomes via alignment-free sequence identification. *Microbial Genomics*, v. 7, n. 11., nov 2021. DOI: 10.1099/mgen.0.000685.

SCOTT, A. *et al.* Reservoirs of resistance: polymyxin resistance in veterinary-associated companion animal isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Veterinary Record*, v. 185, n. 7., ago 2019. DOI: 10.1136/vr.105075.

SCOTT, F. W., PITT, T. Identification and characterization of transmissible *Pseudomonas aeruginosa* strains in cystic fibrosis patients in England and Wales. *Journal of Medical Microbiology*, v. 53, n. 7, p. 609-615., julho 2004. DOI: 10.1099/jmm.0.45620-0.

SHERRARD, L. J. *et al.* Emergence and impact of *oprD* mutations in *Pseudomonas aeruginosa* strains in cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis*, v. 21, n. 1, p. e-35-e43., jan 2022. DOI: 10.1016/j.jcf.2021.03.007.

SHTENBERG, M., *et al.* Cystic fibrosis. *The Lancet*, v. 397, n.10290, p. 2195-2211., junho 2021. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)32542-3.

SINGH, S., *et al.* Complete genome sequence of an extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* ST773 clinical isolate from North India. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, v. 27, p. 244-246., dez 2021. DOI: 10.1016/j.jgar.2021.10.010.

SINGH, M., *et al.* MexXY efflux pump overexpression and aminoglycoside resistance in cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from chronic infections. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 63, n. 12, p. 929-938., dez 2017. DOI: 10.1139/cjm-2017-0380.

SINGHAL, L., *et al.* Comparative Evaluation of Broth Microdilution with Polystyrene and Glass-Coated Plates, Agar Dilution, E-test, Vitek, and Disk Diffusion for Susceptibility Testing of Colistin and Polymyxin B on Carbapenem-Resistant Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Microbial Drug Resistance*, v. 24, n. 8, p. 1082-1088., out 2018. DOI: 10.1089/mdr.2017.0251.

SKIADA, A., *et al.* Adaptive resistance to cationic compounds in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 37, n. 3, p. 187-193., mar 2011. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2010.11.019.

SMITH, D. J., *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* antibiotic resistance in Australian cystic fibrosis centres. *Respirology*, v. 21, n. 2, p. 329-337., fev 2016. DOI: 10.1111/resp.12714.

SONNLEITNER E., *et al.* Distinctive Regulation of Carbapenem Susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa* by Hfq. *Frontiers in Microbiology*, 11:1001., maio, 2020. DOI: 10.3389/fmicb.2020.01001.

SUBEDI, D., VIJAY, A. K., WILCOX, M. Overview of mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: an ocular perspective. *Clinical and Experimental Optometry*, v. 101, n. 2, p. 162-171., mar 2017. DOI: 10.1111/cxo.12621.

SURESH, M., *et al.* Mutational analyses of regulatory genes, *mexR*, *nalC*, *nalD* and *mexZ* of *mexAB-oprM* and *mexXY* operons, in efflux pump hyperexpressing multidrug-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *World journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 34, n. 6., maio 2018. DOI: 10.1007/s11274-018-2465-0.

TACCETTI, G., *et al.* Cystic Fibrosis: Recent Insights into Inhaled Antibiotic Treatment and Future Perspectives. *Antibiotics*, v. 10, n. 3., mar 2021. DOI: 10.3390/antibiotics10030338.

TACCONELLI, E., *et al.* Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infectious Diseases*, v. 18, n. 3, p. 318-327., mar 2018. DOI: 10.1016/S1473-3099(17)30753-3.

TAFTI, F. A., *et al.* Mutations in *nalC* gene of MexAB-OprM efflux pump in carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn wounds in Yazd, Iran. *Iranian Journal of Microbiology*, v. 12, n. 1, p. 32-36., fev 2020.

TAHMASEBI, H., DEHBASHI, S., ARABESTANI, M. R. New approach to identify colistin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* by high-resolution melting curve analysis assay. *Letters in Applied Microbiology*, v. 70, n. 4, p. 290-299., abril 2020. DOI: 10.1111/lam.13270.

TAI, A. S., *et al.* Evaluation of phenotypic screening tests for carbapenemase production in *Pseudomonas aeruginosa* from patients with cystic fibrosis. *Journal of Microbiological Methods*, v. 111, p. 105-107., abril 2015. DOI: 10.1016/j.mimet.2015.02.006.

TAI, A. S., *et al.* Molecular surveillance for carbapenemase genes in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Australian patients with cystic fibrosis. *Pathology*, v. 47, n. 2, p. 156-160., fev 2015. DOI: 10.1097/PAT.0000000000000216.

TENOVER, F. C., NICOLAU, D. P., GILL, C. M. Carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* – an emerging challenge. *Emerging Microbes & Infections*, v. 11, n. 1, p. 811-814., fev 2022. DOI: 10.1080/22221751.2022.2048972.

TEO, J. Q., *et al.* Genomic characterization of carbapenem-non-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* in Singapore. *Emerging Microbes & Infections*, v. 10, n. 1, p. 1706-1716., dez 2021. DOI: 10.1080/22221751.2021.1968318.

TOOKE, C. L., *et al.* β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *Journal of Molecular Biology*, v. 431, n. 18, p. 3472-3500., ago 2019. DOI: 10.1016/j.jmb.2019.04.002.

TRIFONOVA, A., STRATEVA, T. *Stenotrophomonas maltophilia* – a low-grade pathogen with numerous virulence factors. *Infectious Diseases*, v. 51, n. 3, p. 168-178., nov 2018. DOI: 10.1080/23744235.2018.1531145.

TrimGalore. Disponível em <bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/>. Acesso em 03 de abril de 2023. DOI: 10.5281/zenodo.7598955.

TURANO, H. *et al.* Presence of high-risk clones of OXA-23- producing *Acinetobacter baumannii* (ST79) and SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* (ST277) in environmental water samples in Brazil. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 86, n. 1, p. 80-82., set 2016. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2016.06.005.

UDE, J., *et al.* Outer membrane permeability: Antimicrobial and diverse nutrients bypass porins in *Pseudomonas aeruginosa*. *PNAS*, v. 118, n. 31., ago 2021. DOI: 10.1073/pnas.2107644118.

- VAZIRI, F., *et al.* The prevalence of aminoglycoside-modifying enzyme genes (*aac* (6')-I, *aac* (6')-II, *ant* (2'')-I, *aph* (3')-VI) in *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinics*, v. 66, n. 9, p. 1519-1522., 2011. DOI: 10.1590/s1807-59322011000900002.
- WANG, R., *et al.* The global distribution and spread of the mobilized colistin resistance gene *mcr-1*. *Nature Communications*, v. 9, n. 1., mar 2018. DOI: 10.1038/s41467-018-03205-z.
- WATTS, S. C., *et al.* Genomic Diversity and Antimicrobial Resistance of *Haemophilus* Colonizing the Airways of Young Children with Cystic Fibrosis. *mSystems*, 6:e0017821., ago 2021. DOI: 10.1128/mSystems.00178-21.
- WEI, Q., *et al.* Phenotypic and Genome-Wide Analysis of an Antibiotic-Resistant Small Colony Variant (SCV) of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS ONE*, v. 6, n. 12., 2011. DOI: 10.1371/journal.pone.0029276.
- WICK, R. R., *et al.* Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Computational Biology*, v. 13, n. 6., junho 2017. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1005595.
- WICKREMASINGHE, H., *et al.* Clinically Relevant Concentrations of Polymyxin B and Meropenem Synergistically Kill Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* and Minimize Biofilm Formation. *Antibiotics*, v. 10, n. 4., abril 2021. DOI: 10.3390/antibiotics10040405.
- WILLIAMS, D., *et al.* Transmission and lineage displacement drive rapid population genomic flux in cystic fibrosis airway infections of a *Pseudomonas aeruginosa* epidemic strain. *Microbial Genomics*, v. 4, n. 3., mar 2018. DOI: 10.1099/mgen.0.000167.
- YOON, E., JEONG, S. H. Mobile Carbapenemase Genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers in Microbiology*, v. 12., fev 2021. DOI: 10.3389/fmicb.2021.614058.
- ZAMUDIO, R., *et al.* Phylogenetic analysis of resistance to ceftazidime/avibactam, ceftolozane/tazobactam and carbapenems in piperacillin/tazobactam-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 53, n. 6, p. 774-780., junho 2019. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2019.02.022.
- ZHOU, Z., *et al.* GrapeTree: visualization of core genomic relationships among 100,000 bacterial pathogens. *Genome Research*, v. 28, n. 9, p. 1395-1404. set 2018. DOI: 10.1101/gr.232397.117.

APÊNDICE A – Mutações nos genes de interesse das amostras de *Pseudomonas aeruginosa*.

Tabela 10 – Mutações nos genes de interesse das amostras de *Pseudomonas aeruginosa*

Amostras										
Gene alterado	9876	10705	11227	14297	14339	17138	17749	17801	17828	17973
<i>mexR</i>	–	–	126V→E	–	–	30C→R, 79N→S, 106Q→R, 114R→C, 126V→E	30C→R, 79N→S, 106Q→R, 114R→C, 126V→E	126V→E	126V→E	126V→E
<i>nalC</i>	71G→E	–	71G→E, 209S→R	71G→E	71G→E, 186A→T	3D→E, 71G→E, 87L→V, 88S→R, 127S→T, 141S→T, 142E→G, 149P→G, 150H→E, 151M→V, 152D→A, 193K→A, 206L→G,	3D→E, 71G→E, 87L→V, 88S→R, 127S→T, 141S→T, 142E→G, 149P→G, 150H→E, 151M→V, 152D→A, 193K→A, 206L→G,	71G→E, 209S→R	71G→E, 145A→V, 209S→R	71G→E, 145A→V, 209S→R

						207S→A, 208Q→R, 209S→R, 212Q→A	207S→A, 208Q→R, 209S→R, 212Q→A			
<i>nalD</i>	–	–	–	–	–	120E→D, 147D→E, 157M→L, 187D→A	120E→D, 147D→E, 157M→L, 187D→A	–	–	–
<i>nfxB</i>	–	–	–	–	146E→K	5S→T, 11I→L, 20D→E, 52Q→R, 60T→A, 65I→V, 67Q→E, 68A→T, 73H→R, 74A→S, 78E→A, 84I→V, 89T→A, 93L→M, 105F→Y, 109H→D, 119L→I, 120E→A, 124A→T, 149I→L,	5S→T, 11I→L, 20D→E, 52Q→R, 60T→A, 65I→V, 67Q→E, 68A→T, 73H→R, 74A→S, 78E→A, 84I→V, 89T→A, 93L→M, 105F→Y, 109H→D, 119L→I, 120E→A, 124A→T, 149I→L,	–	21R→H, 56D→G	21R→H, 56D→G

						152V→I, 155M→L, 167S→A, 171H→Q, 182S→A, 187S→P	152V→I, 155M→L, 167S→A, 171H→Q, 182S→A, 187S→P			
<i>mexS</i>	249D→N	249D→N	249D→N	249D→ N	249D→N	82L→P, 148T→S, 179S→C, 181E→D, 249D→N, 308D→I	82L→P, 148T→S, 179S→C, 181E→D, 249D→N, 308D→I	249D→N	249D→N	249D→N
<i>mexZ</i>	–	–	–	–	134Q→St op códon	31T→N, 68G→A, 69Q→R, 76N→R, 78R→D, 136F→L, 140Q→L, 146E→A, 147R→Q, 161I→V, 170I→V, 182D→N, 191M→L,	31T→N, 68G→A, 69Q→R, 76N→R, 78R→D, 136F→L, 140Q→L, 146E→A, 147R→Q, 161I→V, 170I→V, 182D→N, 191M→L,	87R→P, 89G→S	137G→D, 138L→R	137G→D , 138L→R

	380→A*, 381N→G*, 382Y→L*, 383G→Δ	310R→ G , 359V→L , 372M→ Δ , 373S→Δ , 375N→S *, 376N→S *, 377V→S *, 378G→S *, 380→A*, 381N→ G*, 382Y→L *, 383G→ Δ	376N→S*, 377V→S*, 378G→S*, 380→A*, 381N→G*, 382Y→L*, 383G→Δ , 403S→A , 424Q→E ,		380→A*, 381N→G*, 382Y→L*, 383G→Δ					
<i>opdP</i>	3N→Y, 8S→G,	3N→Y, 8S→G,	3N→Y, 8S→G,	3N→Y, 8S→G,	3N→Y, 8S→G,	—	—	3N→Y, 8S→G,	3N→Y, 8S→G,	3N→Y, 8S→G,

	16L→M, 18A→S, 19S→A, 29E→A , 30N→T, 33A→T, 42E→Q, 50A→E, 60T→S, 63V→F, 121T→S, 122V→I, 159L→I , 465I→V	16L→M, 18A→S, 19S→A, 29E→A , 30N→T, 33A→T, 42E→Q, 50A→E, 60T→S, 63V→F, 121T→S, , 122V→I, 122V→I, 159L→I , 159L→I , 465I→V	16L→M, 18A→S, 19S→A, 29E→A , 30N→T, 33A→T, 42E→Q, 50A→E, 60T→S, 63V→F, 121T→S, 122V→I, 159L→I , 465I→V	16L→M, 18A→S, 19S→A, 29E→A , 30N→T, 33A→T, 42E→Q, , 50A→E, 60T→S, 60T→S, 63V→F, 63V→F, 121T→S, 121T→ S, 122V→I , 159L→I , 465I→V	16L→M, 18A→S, 19S→A, 29E→A , 30N→T, 33A→T, 42E→Q, 50A→E, 60T→S, 63V→F, 121T→S, 122V→I, 159L→I , 465I→V			16L→M, 18A→S, 19S→A, 29E→A , 30N→T, 33A→T, 42E→Q, 50A→E, 60T→S, 63V→F, 121T→S, 122V→I, 159L→I , 465I→V	16L→M, 18A→S, 19S→A, 29E→A , 30N→T, 33A→T, 42E→Q, 50A→E, 60T→S, 63V→F, 121T→S, 122V→I, 159L→I , 465I→V	16L→M, 18A→S, 19S→A, 29E→A , 30N→T, 33A→T, 42E→Q, 50A→E, 60T→S, 63V→F, 121T→S, 122V→I, 159L→I , 465I→V
<i>opdH</i>	–	–	372S→R	–	372S→R	177D→N, 192D→N, 226T→S, 228Q→N, 249L→V, 252S→T, 298F→V,	177D→N, 192D→N, 226T→S, 228Q→N, 249L→V, 252S→T, 298F→V,	–	–	–

						327V→I, 334K→R, 361V→I, 366V→I, 372S→R, 381N→D, 404T→S, 412D→N, 413I→V	327V→I, 334K→R, 361V→I, 366V→I, 372S→R, 381N→D, 404T→S, 412D→N, 413I→V			
<i>opdD</i>	77V→I, 132T→S, 202P→S, 237H→Y, 270N→D, 304A→G	77V→I, 132T→S , 202P→S , 237H→Y , 247A→T , 270N→D	132T→S, 237H→Y, 247A→T, 270N→D	77V→I, 132T→ S, 237H→ Y, 247A→ T, 270N→ D	77V→I, 132T→S, 237H→Y, 247A→T, 270N→D	X	X	270N→D, 329L→M	132T→S, 237H→Y, 246L→F, 249D→G, , 268R→H, 304A→G	132T→S, 237H→Y, 246L→F, 249D→G , 268R→H , 304A→G
<i>oprE</i>	–	–	–	–	–	55T→S, 59S→N, 90L→M, 105G→D, 119N→D, 161L→M,	55T→S, 59S→N, 90L→M, 105G→D, 119N→D, 161L→M,	108Ins→G , 109Ins→L, 110Ins→D, 211S→G, 376T→G,	55T→S, 108Ins→G, 109Ins→L, 110Ins→D, 211S→G, 376T→G,	55T→S, 108Ins→ G, 109Ins→ L, 110Ins→

						256Q→H, 326L→V, 344S→A	256Q→H, 326L→V, 344S→A	377V→L, 379V→L, 387I→M, 388Y→Sto p códon	377V→L, 379V→L, 387I→M, 390S→K, 393K→N, 396T→S, 397A→G, 409→A, 433S→T, 436A→V, 437A→S, 441S→G, 442N→T, 443Ins→A, 444N→T	D, 211S→G , 376T→G, 377V→L, 379V→L, 387I→M, 390S→K, 393K→N, 396T→S, 397A→G , 409→A, 433S→T, 436A→V, 437A→S, 441S→G , 442N→T, 443Ins→ A, 444N→T
<i>oprF</i>	–	–	93T→A	–	–	–	–	–	–	–
<i>phoP</i>	–	–	–	–	–	50I→V, 72S→A,	50I→V, 72S→A,	–	–	–

						133V→L, 144E→G	133V→L, 144E→G			
<i>phoQ</i>	–	–	–	–	–	7I→V, 15A→T, 59K→H, 90D→H, 94R→S, 104N→H, 208E→Q, 267E→Q, 314E→A, 330S→D, 338S→T, 366R→K, 398R→Q, 435E→G	7I→V, 15A→T, 59K→H, 90D→H, 94R→S, 104N→H, 208E→Q, 267E→Q, 314E→A, 330S→D, 338S→T, 366R→K, 398R→Q, 435E→G	–	391A→V	391A→V
<i>pmrA</i>	71L→R	71L→R	71L→R	71L→R	71L→R	71L→Q, 131E→A, 144S→A, 221P→S	71L→Q, 131E→A, 144S→A, 221P→S	–	71L→R	71L→R
<i>pmrB</i>	345Y→H	345Y→H	2S→P, 4A→T, 15V→I , 68G→S , 345Y→H	345Y→ H	345Y→H	35L→V, 63T→S, 74T→N, 75E→Q, 133H→S, 212V→L,	35L→V, 63T→S, 74T→N, 75E→Q, 133H→S, 212V→L,	2S→P, 4A→T, 15V→I , 68G→S , 345Y→H	2S→P, 4A→T, 345Y→H	2S→P, 4A→T, 345Y→H

						213E→D, 214A→Q, 215V→A, 220R→H, 224D→T, 235T→A, 269E→A, 313V→I, 328R→P, 343T→A, 354K→R, 390R→C, 398L→R, 413A→S, 445E→D, 447K→H, 459Q→R, 461D→E, 462A→T, 463T→S, 465P→T, 467A→S, 468R→Stop códon	213E→D, 214A→Q, 215V→A, 220R→H, 224D→T, 235T→A, 269E→A, 313V→I, 328R→P, 343T→A, 354K→R, 390R→C, 398L→R, 413A→S, 445E→D, 447K→H, 459Q→R, 461D→E, 462A→T, 463T→S, 465P→T, 467A→S, 468R→Stop códon			
--	--	--	--	--	--	---	---	--	--	--

<i>parR</i>	–	–	153L→R, 170S→N	–	55V→I	44A→G, 52Q→E, 53V→L, 76A→D, 121M→I, 133S→T, 135T→A, 138K→Q, 141I→V, 151E→D, 153L→R, 154G→S, 206N→S	44A→G, 52Q→E, 53V→L, 76A→D, 121M→I, 133S→T, 135T→A, 138K→Q, 141I→V, 151E→D, 153L→R, 154G→S, 206N→S	153L→R, 170S→N	153L→R, 170S→N	153L→R, 170S→N
<i>parS</i>	398H→R	398H→R	398H→R	398H→ R	398H→R	27I→L, 30F→A, 35V→L, 63Q→L, 68D→E, 76E→G, 83R→G, 84Q→L, 92Q→R, 115A→D, 134F→Y, 144V→A, 193Q→E,	27I→L, 30F→A, 35V→L, 63Q→L, 68D→E, 76E→G, 83R→G, 84Q→L, 92Q→R, 115A→D, 134F→Y, 144V→A, 193Q→E,	398H→R	398H→R	398H→R

						204S→G, 238V→I, 239D→G, 242V→A, 244H→Q, 245D→E, 247I→M, 274N→A, 296A→T, 304V→I, 349Q→L, 351D→E, 352S→T, 398H→R , 407Y→H, 412E→G, 413T→A, 425E→A, 428R→H	204S→G, 238V→I, 239D→G, 242V→A, 244H→Q, 245D→E, 247I→M, 274N→A, 296A→T, 304V→I, 349Q→L, 351D→E, 352S→T, 398H→R , 407Y→H, 412E→G, 413T→A, 425E→A, 428R→H			
<i>colR</i>	–	–	–	–	–	61A→T, 143K→R, 206S→P	61A→T, 143K→R, 206S→P	–	–	–
<i>colS</i>	–	–	–	–	–	117V→I, 241P→S, 258T→A,	117V→I, 241P→S, 258T→A,	–	316A→T	316A→T

						286S→G, 338T→V, 343A→S, 351D→G, 374M→L	286S→G, 338T→V, 343A→S, 351D→G, 374M→L			
<i>cprR</i>	–	–	–	–	–	18V→I, 44A→D, 142A→V, 201V→I	18V→I, 44A→D, 142A→V, 201V→I	–	–	–
<i>cprS</i>	–	–	16T→S, 159V→I, 310R→C, 386E→D, 411L→M	–	78A→T	86E→D, 90T→S, 94K→R, 114D→E, 159V→I, 168S→L, 170T→V, 197T→G, 211N→H, 220D→E, 266R→H, 267A→P, 282G→D, 284Q→R, 297S→G, 314E→D,	86E→D, 90T→S, 94K→R, 114D→E, 159V→I, 168S→L, 170T→V, 197T→G, 211N→H, 220D→E, 266R→H, 267A→P, 282G→D, 284Q→R, 297S→G, 314E→D,	–	16T→S, 78A→V, 152D→N, 159V→I, 386E→D	16T→S, 78A→V, 152D→N , 159V→I, 386E→D

						321A→T, 329T→S, 331H→Q, 374L→R, 384G→S, 386E→A, 387E→D, 414S→T, 418Q→R	321A→T, 329T→S, 331H→Q, 374L→R, 384G→S, 386E→A, 387E→D, 414S→T, 418Q→R			
<i>gyrA</i>	912S→Δ, 913E→ Δ	–	–	–	–	671V→I, 860G→S, 893D→E, 900A→G, 903S→A, 908A→V, 912S→ Δ, 913E→ Δ	671V→I, 860G→S, 893D→E, 900A→G, 903S→A, 908A→V, 912S→ Δ, 913E→ Δ	83T→I	912S→Δ, 913E→ Δ	912S→Δ, 913E→ Δ
<i>gyrB</i>	–	–	–	–	–	235T→S, 239E→Q, 268L→I, 529I→V, 578S→A, 627A→V, 640T→S	235T→S, 239E→Q, 268L→I, 529I→V, 578S→A, 627A→V, 640T→S	–	–	–

<i>parC</i>	262H→Q	595P→L	–	359Q→ R	485S→A	331S→T, 360F→Y, 474K→R, 556T→S, 601F→Y, 635S→A, 752P→S	331S→T, 360F→Y, 474K→R, 556T→S, 601F→Y, 635S→A, 752P→S	87S→L	–	–
<i>parE</i>	–	–	–	–	533D→E	147S→T, 157K→R, 596T→S	147S→T, 157K→R, 596T→S	533D→E	533D→E	533D→E
<i>s12P</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>folA</i>	–	–	–	70G→A	–	32K→R, 87A→V, 91A→E, 118A→E, 140G→D, 142A→G	32K→R, 87A→V, 91A→E, 118A→E, 140G→D, 142A→G	–	–	–

Legenda: **Negrito** – Mutação descrita por outros autores em cepas resistentes, * – Sequência de mutações que indicam sensibilidade a meropenem, Δ – Deleção de aminoácido, Ins – Inserção de aminoácido, X – Gene ausente, Travessão – Indicam ausência de mutação, → – Indicam o antigo e o novo aminoácido, A – Alanina, C – Cisteína, D – Ácido aspártico, E – Ácido glutâmico, F – Fenilalanina, G – Glicina, H – Histidina, I – Isoleucina, K – Lisina, L – Leucina, M – Metionina, N – Asparagina, P – Prolina, Q – Glutamina, S – Serina, T – Treonina, V – Valina, W – Triptofano e Y – Tirosina.

APÊNDICE B – Principais mutações associadas a resistência a antimicrobianos nos genes das amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de indivíduos com fibrose cística deste estudo.

Tabela 11 – Principais mutações associadas a resistência a antimicrobianos nos genes das amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de indivíduos com fibrose cística deste estudo

Amostras	9876 ^{MDR}	10705	11227 ^{MDR}	14297 ^{XDR}	14339 ^{MDR}	17138 ^{XDR}	17749 ^{XDR}	17801 ^{XDR}	17828 ^{MDR}	17973 ^{MDR}
Mutações	<i>oprD</i> :	<i>oprD</i> :	<i>oprD</i> :	<i>oprD</i> :	<i>mexZ</i> :	<i>oprD</i> :	<i>oprD</i> :	<i>oprD</i> :	<i>oprD</i> :	<i>oprD</i> :
	202E→Q,	202E→Q,	127V→L,	103T→S,	134Q→	127V→L,	127V→L,	127V→L,	127V→L,	127V→L,
	210I→A,	210I→A,	185E→Q,	115K→T,	Stop	185E→Q,	185E→Q,	185E→Q,	185E→Q,	185E→Q,
	230E→K,	230E→K,	186P→G,	170F→L,	codon;	186P→G,	186P→G,	186P→G,	186P→G,	186P→G,
	240S→T,	240S→T,	189V→T,	185E→Q,	<i>oprD</i> :	189V→T,	189V→T,	189V→T,	189V→T,	189V→T,
	262N→T,	262N→T,	202E→Q,	186P→G,	202E→Q,	202E→Q,	202E→Q,	202E→Q,	310R→E,	310R→E,
	281A→G,	281A→G,	210I→A,	189V→T,	210I→A,	210I→A,	210I→A,	277W→Stop	315A→G,	315A→G,
	296K→Q,	296K→Q,	230E→K,	310R→E,	230E→K,	230E→K,	230E→K,	codon;	425G→A;	425G→A;
	301Q→E,	301Q→E,	240S→T,	315A→G,	240S→T,	240S→T,	240S→T,	<i>opdP</i> :	<i>opdP</i> :	<i>opdP</i> :
	310R→G,	310R→G,	262N→T,	425G→A;	262N→T,	262N→T,	262N→T,	29E→A,	29E→A,	29E→A,
	372M→Δ,	372M→Δ,	276T→A,	<i>opdP</i> :	281A→G,	277W→Stop	277W→Stop	159L→I;	159L→I;	159L→I;
	373S→Δ,	373S→Δ,	281A→G,	29E→A,	296K→Q,	códon;	códon;	<i>pmrB</i> : 15V→I,	<i>opdD</i> :	<i>opdD</i> :
	383G→Δ;	383G→Δ;	296K→Q,	159L→I;	301Q→E,	<i>pmrB</i> :	<i>pmrB</i> :	68G→S;	132T→S,	132T→S,
	<i>opdP</i> :	<i>opdP</i> :	301Q→E,	<i>opdD</i> :	310R→G,	343T→A;	343T→A;	<i>parS</i> :	237H→Y,	237H→Y,
	29E→A,	29E→A,	310R→E,	77V→I,	372M→Δ,	<i>parS</i> :	<i>parS</i> :	398H→R;	246L→F,	246L→F,
	159L→I;	159L→I;	312G→R,	132T→S,	373S→Δ,	398H→R	398H→R	<i>gyrA</i> : 83T→I;	249D→G,	249D→G,
	<i>opdD</i> :	<i>opdD</i> :	315A→G,	247A→T;	383G→Δ;			<i>parC</i> : 87S→L	268R→H,	268R→H,
	77V→I,	77V→I,	347L→M,						304A→G;	304A→G;

132T→S, 304A→G; <i>parS</i> : 398H→R	132T→S, 247A→T; <i>parS</i> : 398H→R	372M→Δ, 373S→Δ, 383G→Δ, 403S→A, 424Q→E; <i>opdP</i> : 29E→A, 159L→I; <i>opdD</i> : 132T→S, 247A→T; <i>pmrB</i> : 15V→I, 68G→S; <i>parS</i> : 398H→R	<i>parS</i> : 398H→R	<i>opdP</i> : 29E→A, 159L→I; <i>opdD</i> : 77V→I, 132T→S, 247A→T; <i>parS</i> : 398H→R	<i>parS</i> : 398H→R	<i>parS</i> : 398H→R
---	---	--	-------------------------	--	-------------------------	-------------------------

Legenda: MDR – Resistente a múltiplas drogas, XDR – Resistência extensiva, Δ – Deleção de aminoácido, → – Indicam o antigo e o novo aminoácido, A – Alanina, D – Ácido aspártico, E – Ácido glutâmico, F – Fenilalanina, G – Glicina, H – Histidina, I – Isoleucina, K – Lisina, L – Leucina,, M – Metionina, N – Asparagina, P – Prolina, Q – Glutamina, S – Serina, T – Treonina, V – Valina, W – Triptofano, Y – Tirosina