UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA
ÁREA DE ANÁLISES CLÍNICAS

Avaliação da eficácia de agentes físicos e químicos contra biofilmes
produzidos por clones de bactérias multirresistentes de importância
clínica e epidemiológica no Brasil

Fernanda Ribeiro dos Santos Esposito

Dissertação para obtenção do Título de
MESTRE

Orientador: Prof. Dr. Nilton Lincopan

São Paulo
2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA
ÁREA DE ANÁLISES CLÍNICAS

Avaliação da eficácia de agentes físicos e químicos contra biofilmes
produzidos por clones de bactérias multirresistentes de importância
clínica e epidemiológica no Brasil

Fernanda Ribeiro dos Santos Esposito

Versão original

Dissertação para obtenção do Título de
MESTRE

Orientador: Prof. Dr. Nilton Lincopan

São Paulo

2018

Fernanda Ribeiro dos Santos Esposito

Avaliação da eficácia de agentes físicos e químicos contra biofilmes
produzidos por clones de bactérias multirresistentes de importância
clínica e epidemiológica no Brasil

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de MESTRE

Prof. Dr. Nilton Erbet Lincopan Huenuman
orientadore/presidente

1o. examinador

2o. examinador

3o. examinador

4o. examinador

São Paulo, 02 de agosto de 2018.

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

E77a Esposito, Fernanda Ribeiro dos Santos
Avaliação da eficácia de agentes físicos e químicos
contra biofilmes produzidos por clones de bactérias
multirresistentes de importância clínica e
epidemiológica no Brasil / Fernanda Ribeiro dos Santos
Esposito. - São Paulo, 2018.
86 p.

Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da
Universidade de São Paulo. Departamento de Química
Fundamental.

Orientador: Huenuman , Nilton Erbet Lincopan

1. Biofilme, . 2. ESKAPE. 3. Galleria
mellonella. 4. IRAS. 5. Multirresistência. I. T.
II. Huenuman , Nilton Erbet Lincopan, orientador.
.

Dedico esta dissertação aos meus pais, irmãos e meu
sobrinho querido, pelo amor e apoio imensuráveis.

AGRADECIMENTO

A Deus, por me dar forças e permitir a realização de mais uma etapa da minha vida.

Aos meus pais, pelo amor, compreensão, apoio e pelos valores a mim transmitidos.

À Mariana, pelo amor, bom humor, companheirismo e por ser a melhor irmã que eu poderia ter.

Ao Diego, por ser muito mais que meu melhor amigo e sempre estar presente em todos os momentos da minha vida.

Aos meus queridos familiares Arnaldo, Aparecida e Cecília pelo carinho e apoio incondicionais.

Ao meu orientador, professor Nilton Lincopan, pela oportunidade, pela confiança, pelo conhecimento compartilhado e, principalmente, por me presentear com sua amizade.

À Prof.^a Ana C. Gales, pelo fornecimento da cepa de *P. aeruginosa* 48-1997^a utilizada nesse trabalho.

À Vanessa, pela disposição a ajudar e compartilhar seu conhecimento ao longo da execução deste trabalho.

À Maria e Andrea, pelos ensinamentos e ajuda com a manutenção do biotério.

Às professoras Doroti Garcia, Ana Maria Carmona-Ribeiro e Carla Taddei, pela avaliação deste trabalho e pelos valiosos comentários que acrescentaram muito para o melhoramento deste trabalho.

Aos secretários da pós-graduação Marilisa, Sueli e Irineu, que sempre estiveram prontos a tirar dúvidas e ajudar no que fosse possível.

À Ynés, por sua amizade, seu constante entusiasmo e encorajamento, estando sempre disposta a compartilhar seu conhecimento comigo.

À Brenda, que não mediu esforços para me ajudar na etapa final deste trabalho, pela parceria e, acima de tudo, por ter me presenteado com sua amizade e companheirismo dentro e fora do laboratório.

À Louise, pela sua amizade e bom humor ao longo desses dois anos de mestrado.

Aos queridos amigos Juliana e Juan, por todos os momentos compartilhados dentro e fora do laboratório.

Aos demais colegas de laboratório, Andrey, Caetano, Carol, Maria, Quézia, Miriam, Fábio, Luciana e Ralf pelo companheirismo.

A todos os demais amigos que tive o privilégio de conhecer, que sempre estiveram me apoiando, ajudando nos momentos mais difíceis, compartilhando os bons momentos e torcendo por mim.

Muito obrigada a todos!

AGRADECIMENTOS ÀS AGÊNCIAS DE FOMENTO

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida [número de processo 134359/2016-0 (02/2016 a 01/2018)].

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo projeto aprovado pela chamada MCTI/CNPq/Universal 14/2014 (número de processo 462042/2014-6), e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelos projetos financiados (números de processo e 2016/08593-9), que proveram recursos necessários à execução deste trabalho.

“Nenhum de nós é tão bom, quanto
todos nós juntos”.
(Ray Kroc)

RESUMO

ESPOSITO, F. R.S. **Avaliação da eficácia de agentes físicos e químicos contra biofilmes produzidos por clones de bactérias multirresistentes de importância clínica e epidemiológica no Brasil.** 2018. . Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Bactérias multirresistentes (MRs) pertencentes ao grupo ESKAPE (i.e., *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina, VRE; *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, MRSA; *Klebsiella* spp., e *Escherichia coli* produtoras de β -lactamases de amplo espectro; *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp. resistentes aos carbapenêmicos) são importantes patógenos de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), onde a sua endemicidade e prevalência tem sido decorrente da seleção de linhagens clonais. Embora, o fenótipo MR decorra da expressão de mecanismos mediados por genes intrínsecos e/ou adquiridos, o crescimento bacteriano na forma de biofilme contribui para um importante fenômeno fisiológico de resistência, o qual é inespecífico quanto ao substrato antimicrobiano. O presente estudo teve como objetivo avaliar a eficácia de agentes físicos e químicos contra biofilmes produzidos por clones de bactérias MRs de importância clínica e epidemiológica no Brasil. Cerdas de poliamida foram utilizadas como modelo de superfície de adesão para o crescimento de biofilmes, os quais foram monitorados por microscopia eletrônica de varredura (MEV). *In vivo*, o modelo de biofilme foi avaliado pela inserção das cerdas na *proleg* de larvas de *Galleria mellonella*, enquanto que, diferentes tratamentos foram aplicados para inibir a formação do biofilme. Adicionalmente, mediante ao ensaio de bioluminescência, o modelo de biofilme produzido pela cepa de *P. aeruginosa* PAO1/*lecA::lux* foi avaliado na presença de soluções hipertônicas de cloreto de sódio (NaCl). *In vitro*, soluções hipertônicas de cloreto de sódio (> 6%) utilizadas de maneira profilática, apresentaram efeito bacteriostático (CIM₉₀= 1,7 M) contra biofilmes produzidos por todos os isolados analisados. Além disso, através do uso profilático de soluções hipertônicas de NaCl, foi possível visualizar a inibição da motilidade dos isolados. Por outro lado, os compostos quaternários de amônio (CQAs) cloreto de benzalcônio (CBA) e cloreto de cetilpiridínio (CCP) apresentaram efeito bactericida (CBM₉₀= 256 μ g/mL) contra biofilmes previamente formados em 24h. A atividade de ambos os CQAs foi potencializada na presença de soluções salinas hipertônicas, como avaliado pela metodologia de *checkerboard*, tendo um efeito sinérgico contra *E. coli* (ST10, ST101) MCR-1 (Σ FIC= 0,5); parcialmente sinérgico contra *A. baumannii* OXA-23 (ST79), *E. cloacae* CTX-M-8 (ST131), *E. faecium* VRE (ST478) e *K. pneumoniae* KPC-2 (ST340) (Σ FIC= 0,75); e indiferente contra cepas de *P. aeruginosa* SPM-1 (ST277) e *S. aureus* MRSA (ST5). Adicionalmente, a CIM de carbapenêmicos, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos contra biofilmes de bactérias Gram-negativas MRs foi potencializada na presença de solução salina hipertônica resultando em uma queda da CIM ≥ 2 . Finalmente, *in vivo*, para todas as espécies MRs estudadas, biofilmes formados em 08, 12 e 24h resultaram em 100% de morte das larvas de *G. mellonella* em até 96 horas pós-infecção. O mesmo comportamento foi observado para a cepa PAO1/*lecA::lux*, sendo possível detectar sinais intensos de bioluminescência nas larvas infectadas com os biofilmes. Entretanto, para os biofilmes previamente tratados com solução salina hipertônica, observou-se a diminuição dos sinais de bioluminescência em até 60%. Já para biofilmes formados em 24, 12 e 08h, o tratamento prévio em solução salina hipertônica e posteriormente com antibióticos resultou em um aumento de até 40, 70 e 80% da sobrevivência de *G. mellonella*, respectivamente.

Palavras chave: Biofilme, ESKAPE, *mcr-1*, *Galleria mellonella*, IRAS, multirresistência, antibióticos, desinfetante.

ABSTRACT

ESPOSITO, F.R.S. **Evaluation of the efficacy of physical and chemical agents against biofilms produced by clones of multidrug-resistant Bacteria of clinical and epidemiological importance in Brazil.** 2018. f. Dissertation (Master degree) - Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2018.

ESKAPE pathogens (ie, vancomycin-resistant (VRE) *Enterococcus faecium*; methicillin-resistant (MRSA) *Staphylococcus aureus*; extended spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella* spp., and *Escherichia coli*; *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterobacter* spp. Resistant to carbapenems), represents an important group of multidrug-resistant (MDR) bacteria related to healthcare-associated infections (HAIs), whereas endemicity have been associated with selection and predominance of clones. Although the MR phenotype derives from the expression of mechanisms mediated by intrinsic and/or acquired genes, bacterial growth in the biofilm form contributes to an important physiological phenomenon of resistance, which is non-specific to the antimicrobial substrate. The present study aimed to evaluate the efficacy of physical and chemical agents against biofilms produced by clones of MDR bacteria of clinical and epidemiological importance, in Brazil. Polyamide bristles were used as adhesion surface model for the growth of biofilms, which were monitored by scanning electron microscopy (SEM). *In vivo*, the biofilm model was evaluated by the insertion of the bristles into the *proleg* of larvae of *Galleria mellonella*, while different treatments and physicochemical conditions were applied to inhibit biofilm formation. Additionally, the biofilm model produced by the *P. aeruginosa* PAO1/*lecA::lux* strain was evaluated in the presence of hypertonic solutions of sodium chloride (NaCl). *In vitro*, hypertonic solutions of sodium chloride presented a bacteriostatic effect ($MIC_{90} = 1.7$ M) against biofilm formation of all the isolates analyzed. Moreover, through the prophylactic use of hypertonic solutions of NaCl, it was possible to observe the inhibition of the motility of the isolates. On the other hand, the ammonium quaternary compounds (QACs) benzalkonium chloride (BAC) and cetylpyridinium chloride (CPC) had a bactericidal effect ($CBM_{90} = 256$ μ g / mL) against previously formed biofilms in 24h. The activity of both QACs was potentiated in the presence of hypertonic saline solutions, as evaluated by the checkerboard methodology, having a synergistic effect against *E. coli* (ST10, ST101) MCR-1 ($\Sigma FIC = 0.5$); (ST340) ($\Sigma FIC = 0.75$), *E. faecium* VRE (ST478) and *K. pneumoniae* KPC-2 (ST340), *E. cloacae* CTX-M-8 (ST131); and indifferent effect against strains of *P. aeruginosa* SPM-1 (ST277) and *S. aureus* MRSA (ST5). Furthermore, the MIC of carbapenems, fluoroquinolones and aminoglycosides against biofilms of MDR Gram-negative bacteria was potentiated in the presence of hypertonic saline solution resulting in a decrease in MIC ≥ 2 -fold. Finally, for all MDR species studied, biofilms formed at 08, 12 and 24h resulted in 100% death of *G. mellonella* larvae within 96h post-infection. In fact, the same behavior was observed for the strain PAO1/*lecA::lux*, and it is possible to detect intense bioluminescence signals in the larvae infected with biofilms. However, for biofilms previously treated with hypertonic saline solution, bioluminescence signs decreased by up to 60%. As for biofilms formed at 24, 12 and 8h, pretreatment in hypertonic saline solution and later with antibiotics resulted in an increase of up to 40, 70 and 80% of the survival of *G. mellonella*, respectively.

Keywords: Biofilm, ESKAPE, *mcr-1*, *Galleria mellonella*, HAIs, multidrug-resistance, antibiotics, disinfectant.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Formação de biofilme Bacteriano.	21
Figura 2. Parâmetros influenciadores para adesão Bacteriana e formação de biofilme.	23
Figura 3. Superfícies de adesão mais comumente acometidas por biofilmes.	24
Figura 4. Características dos compostos de amônio quaternários (CQAs).	26
Figura 5. Modelo experimental de <i>Galleria mellonella</i>	28
Figura 6. Sistema CBD.	35
Figura 7. <i>Checkerboard</i>	40
Figura 8 <i>Galleria mellonella</i>	41
Figura 9. Avaliação da motilidade dos tipos <i>swarming</i> e <i>swimming</i> da cepa de <i>P. aeruginosa</i> 48-1997A frente a concentrações crescentes de NaCl.	49
Figure 10. Microscopia eletrônica de varredura do controle negativo.	55
Figura 11. Microscopia eletrônica de varredura dos biofilmes da cepa de <i>P. aeruginosa</i> 48-1997A (SPM-1).	56
Figura 12. Microscopia eletrônica de varredura dos biofilmes da cepa de <i>K. pneumoniae</i> KP171 (KPC-2).	57
Figura 13. Microscopia eletrônica de varredura dos biofilmes da cepa de <i>E. coli</i> ICBEC72H (MCR-1).	58
Figura 14. Modelo de infecção <i>G. mellonella</i>	59
Figure 15. Mortalidade do modelo <i>G. mellonella</i>	61
Figura 16. Avaliação <i>in vivo</i> da inibição do biofilme mediado pelo uso de soluções salinas hipertônicas (SSH).	62
Figura 17. Avaliação <i>in vivo</i> da bioluminescência.	64
Figure 18. Avaliação <i>in vivo</i> da atividade terapêutica do cloranfenicol contra biofilmes da cepa de <i>E. faecium</i> VREfm9 inibidos pelo uso de soluções salinas hipertônicas.	65
Figura 19. Avaliação <i>in vivo</i> da antibióticoterapia contra biofilmes da cepa de <i>P. aeruginosa</i> 48-1997A inibidos pelo uso de soluções salinas hipertônicas (SSH).	66
Figura 20. Avaliação <i>in vivo</i> da antibióticoterapia contra biofilmes da cepa de <i>A. baumannii</i> Ab120 inibidos pelo uso de soluções salinas hipertônicas (SSH).	66
Figura 21. Avaliação <i>in vivo</i> da antibióticoterapia contra biofilmes da cepa de <i>E. coli</i> ICBEC72H inibidos pelo uso de soluções salinas hipertônicas (SSH).	67
Figura 22. Avaliação <i>in vivo</i> da antibióticoterapia contra biofilmes da cepa de <i>E. coli</i> ICBEC12-3F inibidos pelo uso de soluções salinas hipertônicas (SSH).	68
Figura 23. Avaliação <i>in vivo</i> da antibióticoterapia contra biofilmes da cepa de <i>E. cloacae</i> Ecl 1471 inibidos pelo uso de soluções salinas hipertônicas (SSH).	68
Figura 24 Avaliação <i>in vivo</i> da atividade terapêutica do meropenem contra biofilmes da cepa de <i>E. coli</i> ICBEC7P inibidos pelo uso de soluções salinas hipertônicas.	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características das cepas Bacteriana incluídas no presente estudo.	31
Tabela 2. Cepas referenciais utilizadas como controle.....	31
Tabela 3. Lista de antibióticos utilizados.	33
Tabela 4. Valores de Σ CIF correspondentes às diferentes interações	40
Tabela 5. Dose de antibióticos recomendada para humanos e dose de antibióticos administrada por larva de <i>G. mellonella</i>	44
Tabela 6. Perfil de resistência de cepas bacterianas representativas do grupo ESKAPE para antibacterianos de uso humano e veterinário	45
Tabela 7. Determinação da CIM e CMIB de antibióticos de uso humano e veterinário.	46
Tabela 8. Determinação da CIM, CBM, CMIB CMEB de Cloreto de Benzalcônio e de Cloreto de Cetilpiridínio sobre modelos de crescimento planctônico e biofilme.....	47
Tabela 9. Determinação do halo de crescimento bacteriano mediado pela motilidade do tipo <i>swarming</i> e <i>swimming</i> , em função da força iônica do meio.....	48
Tabela 10. Efeito sinérgico de antimicrobianos contra o crescimento em biofilme da cepa de <i>E. coli</i> ICBE7P (MCR-1).....	50
Tabela 11. Efeito sinérgico de antimicrobianos contra o crescimento em biofilme da cepa de <i>E. coli</i> ICBE72H (MCR-1)	50
Tabela 12. Efeito sinérgico de antimicrobianos contra o crescimento em biofilme da cepa de <i>E. coli</i> ICBE12-3F (MCR-1)	51
Tabela 13. Efeito sinérgico de antimicrobianos contra o crescimento em biofilme da cepa de <i>E. cloacae</i> Ecl 1471 (CTX-M-8).....	51
Tabela 14. Efeito sinérgico de antimicrobianos contra o crescimento em biofilme da cepa de <i>A. baumannii</i> Ab120 (OXA-23).....	52
Tabela 15. Efeito sinérgico de antimicrobianos contra o crescimento em biofilme da cepa de <i>K. pneumoniae</i> KP171 (KPC-2).....	52
Tabela 16. Efeito sinérgico de antimicrobianos contra o crescimento em biofilme da cepa de <i>P. aeruginosa</i> 48-1997A (SPM-1)	52
Tabela 17. Efeito sinérgico de antimicrobianos contra o crescimento em biofilme da cepa de <i>E. faecium</i> VREfm9 (VRE).....	53
Tabela 18. Efeito sinérgico de antimicrobianos contra o crescimento em biofilme da cepa de <i>S. aureus</i> N315 (MRSA)	53

LISTA DE ABREVIATURAS

AMC	Amoxicilina- Ácido Clavulânico
AMP	Ampicilina
AMS	Ampicilina-Sulbactam
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATM	Aztreonam
AZM	Azitromicina
BOD	Demanda Bioquímica de Oxigênio (do inglês <i>Biochemical Oxygen Demand</i>)
BRA	Brasil
CAZ	Ceftazidima
CBA	Cloreto de Benzalcônio
CBD	Dispositivo de Biofilme <i>Calgary</i> (do inglês, <i>Calgary Biofilm Device</i>)
CBM	Concentração Cbatericida Mínima
CC	Complexo Clonal
CCP	Cloreto de Cetilpiridíneo
CEFAP	Centro de Facilidade para a Pesquisa
CF	Cefalotina
CFO	Cefoxitina
CIF	Concentração Inibitória Fracionada
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIP	Ciprofloxacino
CLO	Cloranfenicol
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CM	Clindamicina
CMEB	Concentração Mínima de Erradicação De Biofilme
CPM	Cefepime
CTF	Ceftiofur
CTX	Cefotaxima
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (do inglês <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DO	Densidade Óptica
ENO	Enrofloxacina
ERT	Ertapenem
ESBL	Beta-Lactamase de Espectro Estendido (do inglês <i>Extended-spectrum beta-lactamase</i>)

EPSs	Exopolissacarídeos
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
FLUIR	<i>Flow Cytometry And Imaging Research</i>
GEN	Gentamicina
IPM	Imipenem
IRAS	Infecções Relacionas à Assistência À Saúde
LNZ	Linezolida
LVX	Levofloxacina
MDR	Multirresistência (MDR, do inglês <i>Multidrug-resistant</i>)
MER	Meropenem
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MH	Mueller-Hinton
MHA	Mueller-Hinton Ágar
MIN	Minociclina
MLST	<i>Multilocus Sequence Type</i>
NaCl	Cloreto de Sódio
OXA	Oxacilina
PDR	Pan-resistência (PDR, do inglês <i>Pandrug-resistant</i>)
PR	Paraná
RPM	Rotações por Minuto
ST	<i>Sequence Typing</i>
SUT	Sulfametoxazol-Trimetropim
TEC	Teicoplanina
TET	Tetraciclina
TIC	Ticarcilina- Ácido Clavulânico
TIG	Tigeciclina
TOB	Tobramicina
UFC	Unidade Formadora De Colônia
USA	Estados Unidos da América (do inglês, United States of America)
VAN	Vancomicina
XDR	Extensivamente resistente (do inglês <i>Extensively drug-resistant</i>)

LISTA DE SÍMBOLOS

Å	Angström
°C	Graus Celsius
cm	Centímetro
g	Grama
Kg	Quilograma
M	Molar
mg	Miligramma
ml	Mililitro
mm	Milímetro
nm	Nanômetro
µg	Micrograma
µl	Microlitro
UI	Unidade
%	Porcentagem
Σ	Soma
~	Aproximadamente

Sumário

RESUMO	10
ABSTRACT	11
INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Padrões de resistência bacteriana e definição do grupo ESKAPE	18
1.2 Biofilme bacteriano	20
1.3 Métodos físicos e químicos para o controle do crescimento bacteriano	24
1.4 <i>Galleria mellonella</i> como modelo <i>in vivo</i> de infecção	27
2. OBJETIVOS.....	30
2.1 Objetivo geral.....	30
2.2 Objetivos Específicos	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1 Cepas Bacterianas	31
3.2 Perfil de susceptibilidade aos antibacterianos de uso humano e veterinário	32
3.3 Preparo dos agentes antimicrobianos	33
3.4 Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM).....	33
3.5 Crescimento do biofilme – <i>Calgary Biofilm Device</i> (CBD).....	35
3.6 Concentração Mínima de Inibição de Biofilme (CMIB) e Concentração Mínima de Erradicação de Biofilme (CMEB).....	36
3.6.1 Formação de biofilme.....	36
3.6.2 Avaliação da atividade antibiofilme	36
3.6.3 Determinação da CMEB	37
3.7 Modificação da força iônica do meio usando soluções salinas hipertônicas	37
3.8 Avaliação da motilidade bacteriana em solução salina hipertônica (SSH).....	38
3.9 Avaliação do efeito sinérgico	39
3.10 Padronização de um modelo <i>in vivo</i> de biofilme bacteriano e avaliação de condições físicas e químicas de inibição	41
3.11 Avaliação de soluções salinas hipertônicas na inibição do biofilme e sobrevida do modelo <i>in vivo</i> de infecção	42
3.12 Avaliação da atividade dos antibióticos em solução salina hipertônica, na inibição do biofilme e na sobrevida do modelo <i>in vivo</i> de infecção	43
3.13 Microscopia eletrônica de varredura.....	44
4. RESULTADOS	45
4.1 Perfis de susceptibilidade aos antibacterianos de uso humano e veterinário das linhagens utilizadas	45
4.3 Efeito bacteriostático de soluções salinas hipertônicas sobre o crescimento bacteriano planctônico e biofilme	47
4.4 Soluções salinas hipertônica de NaCl inibem podem inibir a motilidade bacteriana	48
4.5 Efeito sinérgico entre antimicrobianos e soluções salinas hipertônicas contra biofilmes bacterianos	50
4.6 Monitoramento do crescimento bacteriano em biofilme, em superfície de cerda de poliamida, por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	53
4.7 <i>Galleria mellonella</i> como modelo <i>in vivo</i> de infecção por biofilme, e aumento da sobrevida associado à inibição do biofilme mediado pelo uso de soluções salinas hipertônicas (SSH)	59
4.7.1 O aumento da sobrevida de <i>G. mellonella</i> , decorrente da inibição do biofilme por soluções salinas hipertônicas (SSH), é inversamente proporcional á emissão de bioluminescência da cepa de <i>P. aeruginosa</i> PAO1/ <i>lecA::lux</i>	63
4.7.2 O aumento da sobrevida nas larvas infectadas com biofilmes inibidos por soluções salinas hipertônicas (SSH) é potencializado pela antibioticoterapia	64
5. DISCUSSÃO.....	70
6. CONCLUSÕES.....	77
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

INTRODUÇÃO

Bactérias e outros microrganismos com potencial patogênico apresentam formas de crescimento planctônico ou como biofilme. Ambas formas de crescimento possuem importância clínica, onde a expressão de resistência tem contribuído com a seleção e prevalência de linhagens clonais. Enquanto que métodos laboratoriais de uso na rotina clínica ou na pesquisa têm sido padronizados para avaliar a atividade bacteriostática ou bactericida de compostos antimicrobianos exclusivamente contra formas de crescimento planctônico, *in vivo*, muitas vezes o potencial terapêutico destes compostos não é reprodutível, desde que muitos processos infecciosos se estabelecem a partir do crescimento no formato de biofilme bacteriano. Assim, são necessárias pesquisas direcionadas a avaliar tanto a patogenicidade da infecção, como seu tratamento, utilizando os biofilmes bacterianos, principalmente aplicados em modelos *in vivo* que imitem procedimentos invasivos, realizados na prática clínica, reconhecidos como focos primários de infecção sistêmica.

1.1 Padrões de resistência bacteriana e definição do grupo ESKAPE

Estudos epidemiológicos reportando dados de prevalência e resistência de bactérias associadas a infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) têm chegado a um consenso de que algumas espécies e gêneros bacterianos devem ser considerados uma urgência clínica e epidemiológica (OMS, 2017), desde que as opções terapêuticas para as infecções associadas são reduzidas (PLETZER et al., 2018). Assim, surge a classificação de **ESKAPE** que inclui isolados de *Enterococcus faecium* (resistente a vancomicina, VRE), *Staphylococcus aureus* (resistente a meticilina, MRSA), *Klebsiella spp.*, e *Escherichia coli* produtoras de beta-lactamase de amplo espectro (ESBL) e; *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter spp.*, resistentes aos carbapenêmicos (PLETZER et al., 2018; LIN et al., 2018; BOUCHER et al., 2009).

Entretanto, recentemente, a identificação de cepas de *Escherichia coli* carreadoras de um novo mecanismo plasmidial de resistência (LIU et al, 2016), gene *mcr-1*, que confere resistência à colistina, desencadeou uma alerta mundial, uma vez que este antibiótico é uma das últimas opções terapêuticas para o tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-negativas produtoras de carbapenemases (OLIVEIRA et al., 2018; ESPOSITO et al., 2017; FERNANDES et al., 2017; SELLERA et al., 2017; AL-TAWFIQ et al., 2017; JEANNOT et al., 2017; FERNANDES et al., 2016a; FERNANDES et al., 2016b; SAMPAIO; GALES, 2016).

Adicionalmente, o perfil de resistência apresentado por uma determinada espécie bacteriana tem dado origem a critérios interpretativos de multirresistência (MDR), resistência extrema (XDR) e panresistência (PDR). A MDR se define quando uma espécie apresenta resistência a antibióticos pertencentes a três ou mais diferentes classes (ex., beta-lactâmicos, aminoglicosídeos, quinolonas, sulfas, tetraciclina, macrolídeos, etc). Já, uma espécie bacteriana extensivamente resistente pode apresentar suscetibilidade apenas a antibióticos pertencentes no máximo a duas classes; enquanto que uma espécie bacteriana pan-resistente, pode apresentar resistência a todos os agentes antibacterianos pertencentes às diferentes classes (MAGIORAKOS et al., 2012).

O aparecimento e disseminação de bactérias MDR, XDR e PDR têm gerado um colapso da antibioticoterapia, onde grande parte desta resistência acontece por um mecanismo genético evolutivo dos procariotos, governado por mutações em genes cromossômicos e/ou pela aquisição de elementos genéticos móveis como, por exemplo, plasmídeos (ROZWANDOWICZ et al., 2018; MICHEL; SANDLER, 2017; KAYE et al., 2015; ILANGO VAN et al., 2015).

Cada uma das bactérias citadas acima possui um mecanismo de resistência característico, clinicamente importante e específico para um substrato antibiótico que muitas

vezes faz parte do tratamento de escolha de um esquema terapêutico (WUNDERINK; WALLEY, 2014; SCHABERG; LODE 1991). Esta característica tem contribuído para a endemicidade de algumas espécies, assim, são reconhecidos clones endêmicos caracterizados por ferramentas de biologia molecular como *multilocus sequence type* (MLST). Por exemplo, para *Klebsiella pneumoniae* tem sido identificado um grupo clonal CG258, o qual se destaca pela produção de carbapenemases do tipo KPC-2 e pela co-produção de beta- lactamase de amplo espectro (ESBL) da classe CTX-M (BOWERS et al., 2015; ANDRADE et al., 2011).

Em *E. coli* tem sido reconhecido um clone endêmico ST131 produtor de ESBL do tipo CTX-M-15 (ALSHARAPY et al., 2018; PARK et al., 2018; NAMAIEI et al., 2017; PIETSCH et al., 2017; DIAB et al., 2017; GRAHAM et al., 2016; MATHERS et al., 2015). Especificamente, no Brasil, a presença do clone de *P. aeruginosa* ST277 produtor da metalo-beta-lactamase SPM-1 tem sido endêmico, assim como, *A. baumannii* ST79 produtor de OXA-23 (TURANO et al., 2016; NASCIMENTO et al., 2016; CHAGAS et al., 2014; FONSECA et al., 2015).

Já, em Gram-positivos existem inúmeros relatos de infecções produzidas por *S. aureus* ST5 resistente a meticilina (MRSA) e *E. faecium* resistente a vancomicina (VRE) ST478 (LEAVIS et al., 2006; SACRAMENTO et al., 2015).

1.2 Biofilme bacteriano

Um mecanismo fisiológico de resistência apresentado por bactérias de interesse clínico é a produção de biofilme, o qual confere uma proteção contra a ação de antimicrobianos e ao próprio sistema imune do indivíduo, devido à barreira física proporcionada pela presença da matriz de exopolissacarídeos (EPSs) (LIN et al., 2018;

Maunder;Welch, 2017). O biofilme pode ser definido como uma comunidade de células bacterianas aderidas a uma superfície biótica ou abiótica e envolta por uma matriz polimérica, constituída por EPSs (**Figura 1**). Além da matriz, o biofilme possui canais que são responsáveis pela distribuição dos nutrientes para as bactérias do interior do biofilme, e pela de remoção de restos metabólicos. Além disso, podemos encontrar dois tipos de células bacterianas dispostas no biofilme: i) as sésseis, que se encontram aderidas à superfície; e ii) as planctônicas, que estão livres e dispersas no meio, apresentando a capacidade de iniciar a formação de novos biofilmes (LIN et al., 2018; MAUNDERS;WELCH, 2017; ALGBURI et al., 2017; AL-WRAFY et al., 2017).

Figura 1. Formação de biofilme Bacteriano. Etapa 1, adesão a superfície. Etapa 2, produção do exopolissacarídeos. Etapa 3, desenvolvimento do biofilme. Etapa 4, maturação do biofilme. Etapa 5, liberação de bactérias planctônicas desde a matriz do biofilme.

O biofilme pode ser formado a partir de uma única ou de múltiplas espécies. Quando composto por diferentes espécies bacterianas, a relação intercelular pode resultar no auxílio e manutenção da comunidade heterogênea, através de metabólitos excretados por uma espécie que podem servir como nutriente para o crescimento de outras, ou então, através do fornecimento de ligantes facilitadores resultantes da adesão de algumas espécies (LIN et al., 2018; CAZZANIGA et al., 2015; TRENTIN et al., 2013). Essa relação intercelular que permite a adaptação às condições do ambiente, coordenando o comportamento das células é denominada de *Quorum sesing* (QS) (TA; ARNASON, 2015; GALANTE et al., 2015;

CAZZANIGA et al., 2015; SHARMA et al., 2014; SOLANO et al., 2014; TRENTIN et al., 2013; LI; TIAN, 2012)

Esse sistema de comunicação é baseado na concentração de sinalizadores químicos, também conhecidos como de autoindutores. Existem diferentes tipos de sinalizadores químicos, os quais são espécie-específico, por tanto, quanto maior número de bactérias de uma mesma espécie, maior será a quantidade disponível de seu autoindutor (CAZZANIGA et al., 2015; SHARMA et al., 2014; TRENTIN et al., 2013). Conforme a população bacteriana aumenta, as moléculas autoindutoras passam a se acumular, induzindo a transcrição de genes específicos responsáveis pela regulação de diferentes funções como virulência, motilidade, produção de matriz EPS, e a formação de biofilme (TA; ARNASON, 2015; GALANTE et al., 2015; CAZZANIGA et al., 2015; SHARMA et al., 2014; SOLANO et al., 2014; TRENTIN et al., 2013; LI; TIAN, 2012)

Além do sistema QS, alguns fatores estruturais de virulência, como o pili e o flagelo, apresentam grande importância no estabelecimento do processo infeccioso e desenvolvimento do biofilme; através da indução da adesão da bactéria com o epitélio do hospedeiro, e pela motilidade da bactéria que contribui para disseminação da infecção (KAZMIERCZAK et al., 2015). A adesão bacteriana consiste em um processo complexo e multifacetado, podendo ser influenciado por diferentes aspectos como: i) microambiente, que apresenta características distintas como pH e disponibilidade nutricional; ii) superfície, que apresentam características como hidrofobicidade, carga e texturas (ie., rugosa, porosa, lisa); e a iii) bactéria, que pode apresentar ou não diferentes fatores de virulência como adesinas, flagelinas e pili (**Figura 2**) (LIN et al., 2018; TA; ARNASON, 2015; GALANTE et al., 2015; CAZZANIGA et al., 2015; KAZMIERCZAK et al., 2015 SHARMA et al., 2014; SOLANO et al., 2014; TRENTIN et al., 2013; LI; TIAN, 2012)

Figura 2. Fatores que influenciam a adesão bacteriana e formação de biofilme. A adesão bacteriana é um processo complexo condicionado ao microambiente (i.e., pH, disponibilidade nutricional e tempo de exposição), à superfície (i.e., hidrofobicidade e carga) e características da bactéria (i.e., espécie e cepa, adesinas e sistema *Quorum sensing*) (TRENTIN et al., 2013).

A formação de biofilme tem sido observada em infecções causadas por bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, acometendo preferencialmente superfícies abióticas, como dispositivos médicos e implantes, porém, também pode ser encontrado em tecidos bióticos, sendo associado com outras doenças e infecções como pneumonia em pacientes com fibrose cística, endocardite, osteomielite e feridas crônicas (**Figura 3**) (ROSSI et al., 2018; OTTO et al., 2017; JAIN et al., 2017; PARKER et al., 2017; SABIR et al., 2017; VUOTTO et al., 2017; VALIZADEH et al., 2017; BARDBARI et al., 2017; KRZYŚCIAK et al., 2017; HE et al., 2017; MAKOVCOVA, et al., 2017). Seu desenvolvimento ocorre de forma lenta, pode surgir em mais de um local e normalmente os sintomas associados demoram a serem apresentados. Enquanto que, os sintomas causados pelas células planctônicas presentes na infecção, normalmente são revertidos pela ação dos anticorpos liberados pelo hospedeiro, e a ação de antibióticos; o biofilme e as células sésseis não são destruídos, levando ao estabelecimento da cronicidade da infecção (AHN et al., 2018; HE et al., 2017; LANDINI et al., 2010).

Figura 3. Superfícies de adesão mais comumente acometidas por biofilmes. A formação de biofilme tem sido associada, principalmente a dispositivos médicos, como cateteres e implantes, mas também pode estar relacionada a diversas infecções como a fibrose cística, endocardite, osteomielite, infecção urinária por sonda vesical, ou outros procedimentos invasivos associados ao uso de cateteres e sondas (LEBEAUX et al., 2014).

1.3 Métodos físicos e químicos para o controle do crescimento bacteriano

Desde o reconhecimento dos microrganismos como agentes infecciosos, diferentes métodos químicos e físicos foram propostos para controlar seu crescimento (TÄNGDÉN, 2014; WEILER; CORTI, 2014). Especificamente, para o tratamento das infecções bacterianas, antibióticos e quimioterápicos têm sido utilizados com sucesso (TÄNGDÉN, 2014; WEILER; CORTI, 2014). Estes compostos podem ter ação antibacteriana de amplo espectro ou espectro restrito, com atividade bactericida ou bacteriostática. Estruturalmente, antibacterianos tem afinidade por diferentes alvos e acabam inibindo funções como a síntese da parede (beta-lactâmicos, glicopeptídeos), síntese de proteínas (aminoglicosídeos, macrolídeos, fenicois, oxazolidinonas, tetraciclina) e sínteses de DNA (quinolonas, sulfas); ou interferindo na integridade da membrana (polimixinas) (TÄNGDÉN, 2014; WEILER; CORTI, 2014; COATES et al., 2011).

Em processos de desinfecção e esterilização, métodos físicos e químicos têm sido amplamente utilizados em diferentes âmbitos, como residenciais, centros médicos e indústrias (NIGAM et al., 2014; DRAPER et al., 2015; AL-GHANANEEM et al., 2017). Dentro dos métodos químicos, o uso de compostos pertencentes à classe de amônio quaternário (CQAs) tem ocorrido de forma abrangente, tendo destaque na composição de diversos produtos de limpeza e higiene pessoal, devido a sua capacidade de amplo-espectro destruindo ou inibindo a atividade de diferentes patógenos (i.e., bactérias, fungos, algas, vírus e parasitas) (KIM et al., 2018; KAMPF, 2018; AL-GHANANEEM et al., 2017). CQAs atuam através do aumento da permeabilidade da parede celular (**Figura 4**), resultando em alterações no metabolismo e perda de componentes celulares, devido à lise, assim como a diminuição da habilidade de adesão a superfícies (JEANNOT et al., 2017; MURAKAMI et al, 2016; ALVES *et al*, 2012). Dentre os CQAs, o antisséptico cloreto de cetilpiridínio (CCP) é utilizado como um dos componentes básicos na formulação de enxaguantes bucais e pastas dentífricas devido à sua alta capacidade antimicrobiana e baixa toxicidade a células eucariotas (AL-GHANANEEM Murakami et al, 20162017; MURAKAMI et al, 2016). Por outro lado, o cloreto de benzalcônio (CBA) tem sido amplamente utilizado na composição de antissépticos para as mãos e desinfetantes, principalmente de uso em industriais de processamento de alimentos (i.e., laticínios e instalações avícolas), hospitais e residências (KIM et al., 2018; KAMPF, 2018).

Figura 4. Características dos compostos de amônio quaternários (CQAs). A) Estrutura química dos CQAs. B) Mecanismo de ação antibacteriana dos CQAs (JENNINGS et al., 2015).

A modificação na composição de um meio também pode resultar no controle do crescimento bacteriano. De fato, a adição de sal pode resultar na produção de um meio hipertônico que provoca a redução da quantidade intracelular de água por osmose, o que altera a função celular levando a morte. Soluções de cloreto de sódio hipertônicas têm sido utilizadas em terapias paliativas contra infecções crônicas do trato respiratório inferior de pacientes com fibrose cística, causadas principalmente por *P. aeruginosa* (MICHON et al., 2012). Embora, não exista um esclarecimento do mecanismo específico sobre como esta condição interfere na inibição do crescimento bacteriano e formação de biofilme, alguns estudos sugerem uma alteração na motilidade, o que pode interferir diretamente na formação da matriz de EPSs (HAVASI et al., 2008).

A somatória dos diversos mecanismos de resistência aos antibióticos apresentados por bactérias MRs gerou a urgência do desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos, ou a modificação dos já disponíveis no mercado, sendo uma prioridade na área de pesquisa, o desenvolvimento e/ou otimização de esquemas terapêuticos e/ou de desinfecção e antissepsia (OTANI et al 2018, TENOVER, 2006).

1.4 *Galleria mellonella* como modelo *in vivo* de infecção

Atualmente, além da busca de novos compostos antimicrobianos, diferentes modelos de infecção têm sido avaliados, a fim de investigar a atividade destes compostos *in vivo*, minimizando o impacto relacionado à manipulação de animais de experimentação (KWADHA et al, 2017; FREIRES et al., 2017; BENTHALL et al., 2015; PELEG et al., 2009).

A *Galleria mellonella*, conhecida também como “Traça Grande da Cera”, possui vasta distribuição geográfica podendo ser encontrada na Ásia, África e América, principalmente em regiões de clima subtropical ou temperado. Por se alimentar de cera, pólen e mel (**Figura 5A**) armazenados nos favos das colmeias, esse invertebrado tem sido considerado uma praga para a apicultura, sendo considerada a segunda maior causa de prejuízo econômico para a indústria de mel (KWADHA et al , 2017; VILCINSKAS, 2016; CHANTAWANNAKUL et al., 2016; PIRK et al., 2015; ZACARIN et al., 2004).

Pertencente à família Pyralidae, esse animal possui um ciclo de vida de aproximadamente oito semanas, constituído pelas fases: i) ovo, que possui coloração branca e formato elíptico, medindo 1,2mm por 0,83mm, apresentando período embrionário com duração de 2 a 4 dias; ii) fase larval, onde as larvas apresentam coloração amarelo-amarronzada (**Figura 5B**) e seu peso pode dobrar diariamente nos dez primeiros dias; iii) pupa, onde a larva tece um casulo de seda e apresenta coloração amarelo-avermelhado, com tamanho entre 2-4mm de largura e 8-12mm de comprimento; iv) adulta, onde cada mariposa apresenta cerca de uma semana de longevidade. Cada fêmea adulta possui um ovopositor prolongado, e é capaz de desovar de 200 a 1000 ovos por ovopostura (KWADHA et al, 2017; WOJDA, 2017; TSAI et al, 2016; RAMARAO et al., 2012).

Durante processos infecciosos, as larvas iniciam um aumento da pigmentação tecidual (**Figura 5C**), denominada de melanização. A fase larval é dividida em sete instares, que dura entre 34 a 48 dias em condições ideais de temperatura (27-32°C) e alimentação. Entretanto, caso haja escassez de alimento ou alterações bruscas de temperatura, esse período pode ser estendido por até seis meses.

Figura 5. Modelo experimental de *Galleria mellonella*. A criação das larvas demanda um espaço físico reduzido utilizando-se como biotério uma estufa BOD, com alimentação baseada no uso de pólen e cera de abelha (A). Quando as larvas (B), perdem a viabilidade (ex., por infecção letal) se observa melanização (C).

A *Galleria mellonella* é um animal invertebrado, possui sistema imune constituído por resposta inata e resposta humoral, contendo diversos elementos similares aos vertebrados, incluindo células fagocíticas, e a produção de muitos peptídeos antimicrobianos, o que a torna um bom modelo de infecções em mamíferos para avaliar atividade *in vivo*, estudando, por exemplo, a interação entre hospedeiro e antibiótico (WOJDA et al., 2017; BENTHALL et al 2015; LEUKO; RAIVO, 2012).

Outras vantagens apresentadas pela utilização desse modelo animal são seu baixo custo de manutenção, onde seu biotério pode ser constituído de apenas uma estufa com demanda bioquímica de oxigênio (BOD), fácil manipulação, e minimização de fatores éticos relacionados à manipulação de animais de experimentação (GLAVIS-BLOOM et al., 2012; PELEG et al., 2009; KAVANAGH; REEVES, 2004). Atualmente, o modelo de *Galleria mellonella* tem sido validade na avaliação *in vivo* da virulência de bactérias, e na avaliação

in vivo da eficácia de antibióticos contra bactérias MRs, incluindo a atividade sinérgica decorrente da combinação de compostos antimicrobianos (MOURA et al., 2017; BENTHALL et al., 2015).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a eficácia de agentes físicos e químicos contra biofilmes produzidos por clones de bactérias multirresistentes do grupo ESKAPE de importância clínica e epidemiológica no Brasil.

2.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar a atividade, *in vitro*, de antibióticos e quimioterápicos de uso humano e veterinário contra clones de bactérias multirresistentes com crescimento planctônico e em biofilme.
2. Avaliar a atividade, *in vitro*, de CQAs contra clones de bactérias multirresistentes com crescimento planctônico e em biofilme.
3. Avaliar, *in vitro*, a influência da força iônica do cloreto de sódio na inibição do crescimento de clones de bactérias multirresistentes com crescimento planctônico e em biofilme.
4. Avaliar a atividade sinérgica, *in vitro*, de antibacterianos, CQAs, e solução salina hipertônica (SSH) contra bactérias multirresistentes com crescimento planctônico e em biofilme.
5. Avaliar, *in vitro*, o efeito da força iônica sobre a motilidade de bactérias multirresistentes.
6. Avaliar a atividade, *in vivo*, de combinações de compostos antibacterianos contra biofilmes produzidos por clones bactérias multirresistentes no modelo invertebrado *Galleria mellonella*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cepas Bacterianas

No presente estudo foram utilizadas cepas bacterianas MRs representativas de clones endêmicos prevalentes no Brasil, pertencentes ao grupo ESKAPE, recuperados da interface humana-ambiente-animal (ESPOSITO et al., 2017; SELLERA et al., 2017; DROPA et al., 2016; SACRAMENTO et al., 2016; FERNANDES et al., 2016a; FERNANDES et al., 2016b), incluindo bactérias Gram-positivas, Gram-negativas fermentadoras da glicose e, Gram-negativas não fermentadoras de glicose (**Tabela 1**).

Tabela 1. Características das cepas bacteriana incluídas no presente estudo

Espécie ^a	Identificação	Origem	Local ^b	Ano	ST ^c	Genótipo de resistência	Referência
<i>Ef</i>	VREfm 9	Ambiental	Brasil (SP)	2015	478	<i>vanA</i>	Sacramento et al., 2016
<i>Sa</i>	N315	Humano	Japão (TO)	1982	5	<i>mecA</i>	Hiramatsu et al., 1992
<i>Kp</i>	KP171	Ambiental	Brasil (SP)	2011	340	<i>bla</i> _{KPC-2}	Oliveira et al., 2014
<i>Ab</i>	Ab120	Ambiental	Brasil (SP)	2016	79	<i>bla</i> _{OXA-23}	Turano et al., 2016
<i>Pa</i>	48-1997A	Humano	Brasil (SP)	1997	277	<i>bla</i> _{SPM-1}	Toleman et al., 2002
<i>Ecl</i>	<i>Ecl</i> 1471	Ambiental	Brasil (SP)	2009	131	<i>bla</i> _{CTX-M-8}	Dropa et al., 2016
<i>Ec</i>	ICBEC7P	Ave	Brasil (SP)	2013	10	<i>mcr-1</i>	Sellera et al., 2017
<i>Ec</i>	ICBEC72H	Humano	Brasil (RN)	2016	101	<i>mcr-1</i> , <i>bla</i> _{CTX-M-8}	Fernandes et al., 2016a
<i>Ec</i>	ICBEC12-3F	Animal	Brasil (PR)	2013	206	<i>mcr-1</i>	Fernandes et al., 2016b

^a*Ef*, *E. faecium*; *Sa*, *S. aureus*; *Kp*, *K. pneumoniae*; *Ab*, *A. baumannii*; *Pa*, *P. aeruginosa*; *Ecl*, *E. cloacae*; *Ec*, *E. coli*

^bSP, São Paulo; TO, Tóquio; RN, Rio Grande do Norte; PR, Paraná.

^cSequence typing.

Foram selecionadas como controle comparativo, cepas pertencentes ao banco de estirpes American Type Culture Collection (ATCC), como descrito na **Tabela 2**.

Tabela 2. Cepas referenciais utilizadas como controle

Espécie	ATCC
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923/6538
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13883
<i>Acinetobacter baumannii</i>	19606
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853/15224
<i>Enterobacter aerogenes</i>	13048
<i>Escherichia coli</i>	25922

3.2 Perfil de susceptibilidade aos antibacterianos de uso humano e veterinário

A caracterização do perfil de suscetibilidade antibacteriana das cepas foi realizada pelo método de difusão-disco, Kirby-Bauer, (Bauer *et al.*, 1966) em ágar Mueller-Hinton (MH) (BD - Becton Dickinson Microbiology Systems and Company Sparks, USA). Após crescimento bacteriano em placas de ágar MacConkey (BD) (bactérias Gram-negativas) ou MH (bactérias Gram-positivas), por um período de 18 horas, uma única colônia de cada isolado foi inoculada em caldo Mueller-Hinton e incubada a 37°C, sob agitação, até atingir turvação equivalente à escala 0,5 de McFarland. Posteriormente, as suspensões bacterianas foram semeadas em placas de MH, com auxílio de *swab* estéril. Os discos de antimicrobianos foram dispostos sobre as placas com o auxílio de uma pinça metálica esterilizada. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica, a 37°C, por um período de 18 a 24 horas e os resultados foram interpretados de acordo com os padrões do *Clinical Laboratory Standards Institute*, CLSI (2017; 2013) e *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*, EUCAST (2017). Os seguintes discos foram testados: ampicilina (10 µg), oxacilina (30 µg), cefalotina (30 µg), amoxicilina-ácido clavulânico (20/10 µg), ampicilina-sulbactam (10/10 µg), ticarcilina-ácido clavulânico (75/10 µg), ceftiofur (30 µg), ceftazidima (30 µg), aztreonam (30 µg), cefepime (30 µg), cefotaxima (30 µg), cefoxitina (30 µg), ertapenem (10 µg), meropenem (10 µg), imipenem (10 µg), ciprofloxacina (5 µg), levofloxacina (5 µg), enrofloxacina (5 µg), clindamicina (2 µg), azitromicina (15 µg), cloranfenicol (30 µg), gentamicina (10 µg), tobramicina (10 µg), canamicina (30 µg), linezolida (30µg), vancomicina (30 µg), teicoplanina (30 µg), sulfametoxazol/trimetoprim (23.75/1.25 µg), tetraciclina (30 µg), minociclina (30 µg) (CLSI 2017;2013), tigeciclina (15 µg) (EUCAST, 2017).

3.3 Preparo dos agentes antimicrobianos

Os sais antimicrobianos foram solubilizados em água destilada estéril ou etanol 95%, conforme estabelecido pelo CLSI (2017). Para o preparo de cada solução estoque (**Tabela 3**), foi levado em consideração o valor da potência (UI ou mg/ml) fornecida pelo fabricante.

Tabela 3. Lista de antibióticos utilizados

Antibiótico	Fabricante	Solução estoque (mg/ml)
Ampicilina-Sulbactam	EuroFarma	30 (20-10)
Cefoxitina	Sigma	2,5
Aztreonam	Sigma	10
Meropenem	Sandoz	5
Ciprofloxacino	Sigma	2
Levofloxacino	Sigma	5
Gentamicina	Sigma	80
Tobramicina	Sigma	4,49
Cloranfenicol	Sigma	2,56
Linezolida	Sigma	2
Sulfametoxazol-trimetropim	Sigma	200-40
Tetraciclina	Sigma	2,56
Tigeciclina	Sigma	5

3.4 Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM)

A partir da determinação do perfil de resistência, foram selecionados antibióticos de uso clínico aos quais os isolados apresentaram susceptibilidade, para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM), que foi realizada pela técnica de microdiluição em caldo, seguindo as padronizações estabelecidas pelo CLSI (2017) e EUCAST (2017). A escolha dos antibióticos foi realizada de acordo com o fenótipo de susceptibilidade de cada bactéria e utilização clínica. Adicionalmente, a susceptibilidade bacteriana para o cloreto de cetilpiridínio (CCP; Sigma, USA) e o cloreto de benzalcônio (CBA; Sigma) foram

determinadas, utilizando uma faixa de concentrações de 0,25 –512 µg/ml para ambos compostos (KIM et al., 2018; KAMPF, 2018; AL-GHANANEEM et al., 2017).

Utilizando micropipeta multicanal (Eppendorf, Alemanha) 100 µl de caldo Mueller-Hinton (MH- BD) foram depositados em cada poço de microplacas estéreis de 96-poços fundo “U” e, posteriormente, 100 µl de cada solução de antimicrobiano foi depositada na primeira coluna de cada placa, sendo homogeneizada até a décima coluna a fim de realizar uma diluição seriada de cada agente. O volume final de cada poço foi de 100 µl. Como controle de cada experimento, as colunas 11 e 12 de cada placa contiveram apenas caldo MH, a fim de avaliar a viabilidade celular (controle positivo) e esterilidade do meio (controle negativo), respectivamente.

A partir de uma cultura de cada cepa, com crescimento de 18 horas em placas de ágar MacConkey (bactérias Gram-negativas) e MH (bactérias Gram-positivas), uma colônia foi coletada e suspensa em 2 ml de caldo MH e, utilizando um espectrofotômetro (DO_{600nm}) foram ajustadas à 0,5 escala de McFarland, equivalendo aproximadamente a 10^8 UFC/ml. A partir dessa suspensão, uma nova diluição foi feita e 5 µl de inóculo contendo aproximadamente 10^5 UFC/ml foram depositados em cada poço das colunas 1-11 da microplaca. As microplacas foram incubadas a 37°C por 24 horas, sem agitação. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. A interpretação dos resultados foi baseada nos valores de referência estabelecidos pelo CLSI (2017; 2013) e EUCAST (2017).

Para a determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM), após 24 horas de incubação, 10 µl de cada poço onde não foi observado crescimento bacteriano foram transferidos para uma placa de ágar MacConkey ou MH, para determinação do efeito bactericida e/ou bacteriostático de cada composto antimicrobiano. Cada placa foi incubada a 37°C por 24 horas, sem agitação. Foi realizado o método de contagem de colônias nas placas

onde pôde ser observado crescimento bacteriano após 24 horas de incubação. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3.5 Crescimento do biofilme – *Calgary Biofilm Device* (CBD)

Para a realização dos experimentos com crescimento bacteriano em biofilme, a técnica de *Calgary Biofilm Device* (CBD) foi utilizada. Essa técnica consiste na uso de microplacas de 96-poços de fundo chato, com tampas adaptadas para a formação do biofilme (NUNC, USA). Cada tampa possui 96 pinos (**Figura 6**), denominados de *pegs*, que se encaixam nos poços da microplaca e servem como superfície de adesão para a formação de biofilme (CERI et al, 1999).

Essa técnica permite a formação de diferentes biofilmes com o mesmo tempo de crescimento em uma mesma tampa, assim como a transferência desses biofilmes para novas microplacas. Além disso, essa metodologia permite comparar o desempenho de diferentes tratamentos, detectando se há eliminação das bactérias planctônicas e/ou das bactérias sésseis, que formam o biofilme nos *pegs* fixados na tampa (BENTHALL et al, 2015 CERI et al, 1999;).

Figura 6. Sistema CBD. Crescimento em biofilme de *P. aeruginosa*, aderido nas extremidades dos *pegs* das tampas das placas CBD.

3.6 Concentração Mínima de Inibição de Biofilme (CMIB) e Concentração Mínima de Erradicação de Biofilme (CMEB)

A determinação da concentração mínima de inibição de biofilme (CMIB) e da concentração mínima de erradicação de biofilme (CMEB) foi realizada pela técnica de CBD (ONG et al., 2017; KANNAPPAN et al., 2017; BENTHALL et al., 2015), que foi constituída por 3 etapas:

3.6.1 Formação de biofilme

A partir de uma cultura de cada cepa, com crescimento de 18 horas em placas de MacConkey ágar (bactérias Gram-negativas) ou MH (bactérias Gram-positivas), uma colônia foi coletada e suspensa em 2 ml de caldo MH e, utilizando um espectrofotômetro (DO_{600nm}) foram ajustadas à 0,5 escala de McFarland, equivalendo aproximadamente a 10^8 UFC/ml. Utilizando micropipeta multicanal (Eppendorf) 190 µl de caldo MH foram depositados em cada poço de microplacas estéreis de 96-poços de fundo chato e, posteriormente, 10 µl de suspensão bacteriana previamente ajustada foram depositados em cada poço. Cada placa foi incubada à 37°C por 24 horas, sem agitação.

3.6.2 Avaliação da atividade antibiofilme

Utilizando uma micropipeta multicanal (Eppendorf) 200 µl de caldo MH foram depositados em cada poço de microplacas estéreis de 96-poços fundo chato e, posteriormente, 200 µl de cada solução de antimicrobiano foi depositada na primeira coluna de cada placa, sendo homogeneizada até a décima coluna a fim de realizar uma diluição seriada de cada agente, tendo 200 µl como volume final em cada poço. Como controle de cada experimento, as colunas 11 e 12 de cada placa contiveram apenas caldo MH, a fim de avaliar a viabilidade celular (controle positivo) e esterilidade do meio (controle negativo), respectivamente. Cada

tampa contendo os biofilmes previamente formados foi transferida para a nova microplaca contendo os diferentes antimicrobianos. Cada placa foi incubada a 37°C por 24 horas, sem agitação (Ong *et al.*, 2017; Kannappan *et al.*, 2017). A concentração equivalente ao poço onde não foi observado crescimento bacteriano através da turbidez do meio foi considerada como concentração mínima de inibição de biofilme (CMIB). A escolha dos antibióticos foi realizada de acordo com o fenótipo de susceptibilidade de cada bactéria e utilização clínica.

3.6.3 Determinação da CMEB

Para verificar qual(s) concentração(s) teve atividade efetiva, cada tampa contendo biofilmes previamente tratados com antimicrobianos foi transferida para uma nova microplaca contendo apenas 200 µl de caldo MH. A CMEB foi definida como a menor concentração onde nenhum crescimento foi observado após incubação a 37°C por 24 horas, sem agitação

3.7 Modificação da força iônica do meio usando soluções salinas hipertônicas

A força iônica de uma solução é uma medida de sua concentração de íons, enquanto que o efeito da pressão osmótica depende da força iônica. Os compostos iônicos, quando dissolvidos na água, dissociam-se em íons. Conforme descrito previamente (Michon *et al.*, 2014) foram utilizadas microplacas de 96-poços de fundo chato, para a determinação da CIM. O crescimento bacteriano foi avaliado na presença de concentrações de 1-15 % de solução salina (NaCl – Merk, Darmstadt, Alemanha), previamente adicionadas ao caldo MH. Após crescimento bacteriano em placas de ágar MacConkey (bactérias Gram-negativas) ou MH (bactérias Gram-positivas) por um período de 18 horas, uma única colônia de cada isolado foi inoculada em caldo Mueller-Hinton (MH) e incubada a 37°C, sob agitação, até atingir turvação equivalente à escala 0,5 de McFarland. Posteriormente, cada inóculo foi diluído em

caldo MH, a fim de atingir a concentração de 10^5 UFC/ml e, em seguida, 5 μ l foram depositados em cada poço da microplaca de 96-poços.

A determinação da CMIB foi realizada pela metodologia de CBD (CERRI et al., 1999; BENTHALL et al., 2015). Duas condições de crescimento foram aplicadas para a formação de biofilme, sendo a primeira em caldo MH livre de NaCl; e na segunda, as diferentes concentrações de NaCl foram acrescidas ao caldo MH desde o primeira etapa da metodologia CBD, a fim de avaliar seu o possível potencial profilático. Cada placa foi incubada à 37°C por 24 horas, sem agitação.

A determinação da CMEB foi realizada através do método de contagem de colônias. Após 24 horas de incubação, 10 μ l de cada poço onde não foi observado crescimento bacteriano foram transferidos para uma placa de ágar MacConkey ou MH, para determinação do efeito bactericida e/ou bacteriostático de cada solução salina hipertônica. Cada placa foi incubada a 37°C por 24 horas, sem agitação. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3.8 Avaliação da motilidade bacteriana em solução salina hipertônica (SSH)

A cepa de *P. aeruginosa* 48-1997A, produtora de metalo-beta-lactamase SPM-1 foi selecionada para a avaliação da motilidade frente à modificação da força iônica do meio. O meio semissólido composto por 1 % de Tripitona (BD), 0,3 % de Agar bacteriológico (Oxoid, Waltham, Massachusetts, USA) e 0,25 % de NaCl foi preparado e esterilizado; em paralelo, foram preparados e esterilizados mais 7 meios semissólidos acrescidos diferentes concentrações de solução salina hipertônica (1-7 %). Posteriormente, cada meio de cultura contendo uma concentração específica de NaCl foi vertido em placas de Petri 90x15mm (J. Prolab, Paraná, BR) que foram mantidas dentro do fluxo laminar durante 1 hora para secagem do meio. Em paralelo, a partir de um pré-inóculo crescido em caldo LB (BD), por 18 a 24 horas à 37°C, sob agitação, uma nova suspensão bacteriana foi ajustada a 0,5

escala de McFarland, equivalendo aproximadamente a 10^8 UFC/ml. Em seguida, uma alíquota de 10 μ l da nova suspensão foi inoculada na superfície de cada placa, para avaliação da motilidade dependente do flagelo, denominada de “*swimming*”; e, outros 10 μ l foram injetados dentro do meio de cultura, para avaliação da motilidade dependente do flagelo e pili tipo IV, denominada de “*swarming*” (YEUNG et al., 2015). Cada placa foi incubada à 37°C por 24 horas, sem agitação. Após este período, os halos de crescimento foram medidos. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3.9 Avaliação do efeito sinérgico

O efeito sinérgico entre antibióticos, CCP, CBA, e diferentes concentrações de NaCl, foram avaliados, *in vitro*, através do método de *checkerboard*. Em microplacas de 96 poços, fundo “U” na vertical, diferentes concentrações de NaCl (10-150 mg/ml) foram acrescidas em MHB e dispostas em cada poço de forma decrescente (linha A-G). Na horizontal, diferentes concentrações de antibióticos, CBA ou CCP (1-512 μ g/ml) foram distribuídas de forma decrescente da esquerda para a direita (coluna 2-10), conforme apresentado na **Figura 7**. Todas as concentrações de antibióticos, CBA ou CCP foram preparadas em caldo MH, pelo método de diluição seriada e dispostas em microplacas de 96 poços, fundo “U”, para a avaliação antimicrobiana contra células planctônicas. Para avaliação contra células sésseis, aplicou-se a técnica CBD, utilizando microplacas com tampas específicas, que possuem *pegs*, que se encaixam nos poços da microplaca e servem como superfície de adesão para a formação de biofilme (ABDELKADER et al, 2017; WEI; YANG, 2017; KUOK et al., 2017; FAZLY BAZZAZ et al., 2016; ELKHATIB et al., 2014; LORA-TAMAYO et al., 2014; BENTHALL et al, 2015; MICHON et al, 2014; HARRISON et al., 2008; CERI et al., 1999).

Figura 7. Método de *Checkerboard*. Representação esquemática da distribuição das concentrações em µg/ml de NaCl e CCP na microplaca de 96 poços para avaliação do efeito sinérgico

Para avaliar a interação entre os diferentes compostos, o valor do índice de concentração inibitória fracionada (ICIF) de cada combinação foi determinado, através da seguinte fórmula:

$$\Sigma \text{CIF} = \text{CIF (A)} + \text{CIF (B)}$$

$$\text{CIF (A)} = \text{CIM (A) na combinação} / \text{CIM (A) sozinho}$$

$$\text{CIF (B)} = \text{CIM (B) na combinação} / \text{CIM (B) sozinho}$$

(A) = antibiótico A; (B) antibiótico B.

A interpretação dos resultados obtidos foi realizada segundo a classificação previamente descrita (Abdelkader *et al*, 2017; Dong *et al*, 2017; Fernandez-Cuenca *et al.*, 2003; Hall *et al.*, 1983), apresentada na **Tabela 4**.

Tabela 4. Valores de ΣCIF correspondentes às diferentes interações

Interação	ΣCIF
Sinergismo	$\text{CIF} \leq 0,5$
Aditivo	$0,5 < \text{CIF} \leq 0,75$
Indiferente	$0,75 < \text{CIF} \leq 4$
Antagonismo	$\text{CIF} > 4$

3.10 Padronização de um modelo *in vivo* de biofilme bacteriano e avaliação de condições físicas e químicas de inibição

Realizando uma adaptação do método previamente descrito (BENTHALL et al., 2015) cerdas de escova de dente (Colgate-Palmolive, USA) , constituídas de poliamida, foram preparadas por corte de secções de 0,5 cm, sendo dispostas separadamente em microtubos de 1,5 ml e, em seguida, esterilizadas por autoclavagem. Um pré-inóculo, crescido por 18 a 24 horas à 37°C em agitação, de cada bactéria foi ajustada à escala 0,5 de McFarland em caldo MH e 40µl de cada suspensão foram depositados em microtubos contendo uma cerda e, posteriormente, foram incubados a 37°C durante o período máximo de 24h sem agitação, para permitir a formação de biofilmes sobre as cerdas. Em seguida, cada cerda foi lavada duas vezes em 1 ml de PBS 1 X estéril para remover quaisquer bactérias planctônicas. Após o procedimento de lavagem, cada cerda foi inserida em uma das “pseudopatas”, denominadas de *proleg*, de cada larva (**Figura 8**) direita do modelo de infecção *Galleria mellonella* (uma cerda por larva). Os biofilmes formados em 8, 12 e 24 horas foram avaliados e, para cada intervalo de tempo, um grupo de 5 larvas foi utilizado, por experimento. Como controle negativo, cerdas estéreis foram inseridas em um grupo de 5 larvas por experimento. As larvas foram observadas durante 96 horas, fazendo um controle consecutivo da sobrevivência das larvas a cada 24 horas. Os experimentos foram realizados em triplicata e os cálculos estatísticos de significância foram realizados através do *software* GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

Figura 8 *Galleria mellonella*. Modelo invertebrado, no último estágio do período larval. Destaca-se no círculo vermelho a perna falsa, também denominada de *proleg* da larva.

3.11 Avaliação de soluções salinas hipertônicas na inibição do biofilme e sobrevivência do modelo *in vivo* de infecção

Para avaliar, *in vivo*, a atividade bactericida e/ou bacteriostática da pressão osmótica, uma adaptação das metodologias previamente descritas por BENTHALL et al., 2015 e MICHON et al., 2014 foi realizada. A partir dos resultados obtidos “*in vitro*”, um pré-inóculo crescido por 18 a 24 horas à 37°C em agitação de cada bactéria foi ajustada à escala 0,5 de McFarland em caldo MH acrescido de NaCl, que variou entre as concentrações de: i) 1,1M (7%), para as cepas *A. baumannii* Ab120, *P. aeruginosa* 48-1997A e *E. cloacae* Ecl 1471; ii) 1,7M (10%), para as cepas *E. faecium* VREfm9, *K. pneumoniae* KP171, ICBEC7P, ICBEC72H e ICBEC12-3F; e iii) 2,5M (15%), para a cepa *S. aureus* N315. Posteriormente, 40µl das suspensões bacterianas foram transferidos para microtubos, contendo uma cerda cada, que, posteriormente, foram incubados a 37°C durante os períodos de 8, 12 e 24 horas sem agitação, para permitir a formação de biofilmes sobre as cerdas. Para cada intervalo de tempo de crescimento, um grupo de 5 larvas foi utilizado. Adicionalmente, o modelo de biofilme produzido pela cepa de *P. aeruginosa* PAO1/*lecA::lux* também foi avaliado, *in vivo*, na presença e ausência de 1,1M de NaCl. A análise de bioluminescência foi realizada no Centro de Facilidades de apoio à Pesquisa (CEFAP-FLUIR), no Instituto de Ciências Biomédicas da USP (<http://cefap.icb.usp.br/core-facilities/fluir-flow-cytometry-and-imaging-research/>), através do microscópio IVIS Spectrum. As larvas foram observadas durante 96 horas, fazendo um controle consecutivo da sobrevivência das larvas a cada 24 horas. Os experimentos foram realizados em triplicata e os cálculos estatísticos de significância foram realizados através do *software* GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

3.12 Avaliação da atividade dos antibióticos em solução salina hipertônica, na inibição do biofilme e na sobrevida do modelo *in vivo* de infecção

Estes ensaios foram realizados através de uma metodologia previamente descrita (BENTHALL et al., 2015), que foi adaptada no presente estudo. Esquema terapêuticos contra cada cepa bacteriana foram estabelecidos baseado nos ensaios *in vitro*, utilizando combinações com efeito sinérgico ou aditivo (DONG et al, 2017; PIMCHAN et al, 2017; ABDELKADER et al, 2017).

Formaram-se quatro grupos de 5 larvas de *G. mellonella*, pesando aproximadamente 0,29 g cada, na qual: i) controle negativo, onde cerdas estéreis foram inseridas; ii) grupos tratados com a combinação de solução salina hipertônica e antibiótico, dividido em três subgrupos distintos, de acordo com o tempo de crescimento de biofilme. A dose dos antibióticos foi calculada conforme a massa das larvas. Foram utilizados biofilmes formados em caldo MH acrescido de NaCl, com crescimento de 8, 12 e 24 h e, posteriormente, cada cerda foi inserida na *proleg* direita de cada larva. Após 1 h da inoculação, foram administrados 10 µl dos antibióticos mediante injeções na *proleg* esquerda da larva (Dong *et al*, 2017; Hornsey *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2014)

As doses dos antibióticos usadas foram simuladas pelas doses utilizadas para os humanos (g/kg/dia), conforme apresentado na **Tabela 5** (CLSI, 2017; Gilbert *et al*, 2010). Os tratamentos foram administrados em dose única. As larvas foram observadas durante 96 horas, fazendo um controle consecutivo da sobrevivência das larvas a cada 24 horas. Os experimentos foram realizados em triplicata e os cálculos estatísticos de significância foram realizados através do *software* GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

Tabela 5. Doses de antibióticos recomendadas para uso humano, e doses de antibióticos administradas por larva de *G. mellonella*

Antibiótico	Dose diária recomenda (g)	Dose administrada por larva (mg/kg) ^a
Ampicilina-Sulbactam	1.5-3	0.29-0.58
Aztreonam	1-8	1.45
Meropenem	1-6	0.87
Ciprofloxacino	0.25-1.2	0.0928
Gentamicina	0.004-0.0051	0.00147
Tobramicina	0.001-0.005	0.00145
Cloranfenicol	0.25-4	1.16
Sulfametoxazol-trimetopim	0.008-0.01	0.00232-0.0029
Tetraciclina	1-2	0.29

^aOs cálculos foram realizados para larvas com peso equivalente a 0,00029 kg.

3.13 Microscopia eletrônica de varredura

Para a realização da análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV), a adaptação da metodologia de Benthall *et al.*, 2015 descrita acima foi utilizada para o preparo das cerdas. Após o crescimento bacteriano, cada cerda foi gentilmente lavada em 50 µl PBS 1 X estéril para remover quaisquer bactérias planctônicas e, em seguida, foi submersa durante 1 h em 60 µl de glutaraldeído 2 % para fixação do biofilme à superfície das cerdas. Posteriormente, cada amostra foi submersa em 150 µl de concentrações crescentes de etanol (10, 30, 50, 70, 80, 90 e 100%) durante 30 min cada, para desidratarem. Para concluir o processo de secagem, cada cerda foi submersa em 400 µl de hexametildisilazano (HMDS, Sigma) durante 10 min. Subsequentemente, cada cerda foi posicionada no suporte do microscópio (*stub*) para que fossem recobertas com 30 Å de ouro (GONZÁLEZ-RAMÍREZ *et al.*, 2016). Baseando-se nos resultados obtidos na avaliação da força iônica, biofilmes das cepas 48-1997A, ICBE72H e KP171 formados em 24 horas e crescidos na presença (7 e 10 %) e ausência de soluções hipertônicas de cloreto de sódio aderidos em cerdas de poliamida foram submetidos à análise através do microscópio QUANTA FEG-650 (Quanta™, USA). Como controle, uma cerda estéril também foi submetida à análise microscópica.

4. RESULTADOS

4.1 Perfis de susceptibilidade aos antibacterianos de uso humano e veterinário das linhagens utilizadas

As cepas analisadas exibiram diferentes perfis de resistência, entretanto todas foram categorizadas como multirresistentes, uma vez que apresentaram resistência, a pelo menos três diferentes classes de antimicrobianos (**Tabela 6**).

Tabela 6. Perfil de resistência de clones bacterianos representativos do grupo ESKAPE para antibacterianos de uso humano e veterinário

Cepas*	Perfil de resistência ^b																															
	Ampicilina	Oxacilina	Ampicilina-sulbactam	Amoxicilina- ácido clavulânico	Ticarcilina- ácido clavulânico	Cefalotina	Cefoxitina	Ceftiofur	Cefotaxima	Ceftazidima	Cefepime	Aztreonam	Ertapenem	Imipenem	Meropenem	Gentamicina	Canamicina	Tobramicina	Ciprofloxacino	Enrofloxacino	Levofloxacino	Clindamicina	Aztromicina	Cloranfenicol	Linezolida	Vancomicina	Teicoplanina	Sulfametoxazol-trimetropim	Tetraciclina	Tigeciclina	Minociclina	
VREfm 9	R	-	R	R	-	R	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	R	R	R	-	-	S	S	R	R	R	S	R	S	
N315	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	-	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	-	S	R	S	S	S	
KP171	R	-	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	-	-	R	-	-	-	R	R	-	R
Ab120	R	-	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	-	-	R	-	-	-	S	S	-	-	
48-1997A	R	-	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	S	R	R	R	-	-	R	-	-	-	R	R	-	R	
Ecl 1471	R	-	R	S	R	R	R	R	R	S	R	I	S	S	S	S	R	S	R	R	S	-	-	S	-	-	-	S	S	S	S	
ICBEC7P	R	-	S	S	I	R	S	R	R	S	R	R	S	S	S	R	S	S	R	R	R	-	-	S	-	-	-	R	R	R	R	
ICBEC72H	R	-	S	S	I	R	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-	S	-	-	-	S	S	S	S	
ICBEC12-3F	R	-	S	S	I	R	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-	S	-	-	-	S	R	S	S	

^aVREfm9, *E. faecium* (VRE/ST478); N315, *S. aureus* (MRSA/ST5); KP171, *K. pneumoniae* (KPC-2/ST340); Ab120, *A. baumannii* (OXA-23/ST79); 48-1997A, *P. aeruginosa* (SPM-1/ST277); Ecl 1471, *E. cloacae* (CTX-M-8/ST131); ICBEC7P, *E. coli* (MCR-1/ST10); ICBEC72H, *E. coli* (MCR-1/ST101); ICBEC12-3F, *E. coli* (MCR-1/ST206).

^b R, resistente; S, sensível; I, intermediário

Os perfis de sensibilidade aos antibióticos selecionados foram quantitativamente determinados. Entretanto, os valores determinados para crescimento planctônico, não foram equivalentes aos valores respectivos determinados para crescimento em biofilme (**Tabela 7**).

De fato, para todos os isolados foi observado um aumento ≥ 3 -vezes da CIM do crescimento em biofilme (CMIB), quando comparada a CIM padrão para crescimento planctônico.

Em relação à atividade antimicrobiana dos compostos de amônio quaternário CBA e CCP, para ambos compostos foi observado um aumentos de ≥ 2 -vezes da CMIB quando comparada com a CIM; assim como, um aumento de ≥ 3 -vezes da CMEB em comparação com a CBM (**Tabela 8**).

Tabela 7. Determinação da CIM e CMIB de antibióticos de uso humano e veterinário

Cepas ^a	CIM/CMEB (µg/ml)												
	SAM	CFO	ATM	MER	GEN	TOB	CIP	LVX	CLO	LNZ	SXT	TET	TIG
VREfm9	-	-	-	-	-	-	-	-	2/512	2/512	-	2/512	-
N315	-	-	-	-	-	4/256	-	-	-	4/512	-	-	-
KP171	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1/128
Ab120	8/512	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2/512	4/512	-
48-1997A	-	-	8/512	-	4/512	4/512	-	-	-	-	-	-	-
Ecl 1471	-	-	-	4/128	-	-	4/256	2/256	2/512	-	-	-	-
ICBEC7P	-	4/64	-	0,5/32	-	-	-	-	1/32	-	-	-	-
ICBEC72H	-	8/256	-	1/32	-	-	1/512	0,5/256	2/256	-	-	-	-
ICBEC12-3F	-	1/32	-	1/64	-	-	1/32	2/16	2/32	-	-	-	-

^aVREfm9, *E. faecium* (VRE); N315, *S. aureus* (MRSA); KP171, *K. pneumoniae* (KPC-2); Ab120, *A. baumannii* (OXA-23); 48-1997A, *P. aeruginosa* (SPM-1); Ecl 1471, *E. cloacae* (CTX-M-8); ICBEC7P, *E. coli* (MCR-1); ICBEC72H, *E. coli* (MCR-1); ICBEC12-3F, *E. coli* (MCR-1).

SAM, Ampicilina-Sulbactam; CFO, Cefoxitina; ATM, Azetreonam; MER, Meropenem; GEN, Gentamicina; TOB, Tobramicina; CIP, Ciprofloxacino; LVX, Levofloxacino; CLO, Cloranfenicol; LNZ, Linezolida; SXT, Sulfametoxazol-Trimetropim; TET, Tetraciclina; TIG, Tigeciclina.

Tabela 8. Determinação da CIM, CBM, CMIB CMEB de Cloreto de Benzalcônio e de Cloreto de Cetilpiridínio sobre modelos de crescimento planctônico e biofilme.

Cepa	Células planctônicas		Biofilme	
	CIM/CBM (µg/ml)		CMIB/CMEB (µg/ml)	
	CBA/CCP	CBA/CCP	CBA/CCP	CBA/CCP
VREfm 9	16/16	32/32	256/256	512/512
NL315	32/8	64/32	256/256	256/256
KP171	32/32	64/64	256/256	512/512
Ab120	16/8	32/32	512/512	512/512
48-1997A	64/32	128/64	>512/>512	>512/>512
<i>Ecl</i> 1471	16/8	32/16	256/512	256/512
ICBEC7P	4/1	2/1	64/256	128/512
ICBEC72H	4/1	2/1	64/512	128/512
ICBEC12-3F	2/2	8/8	64/128	128/256
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	8/8	16/16	64/32	256/128
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	8/4	32/16	64/32	128/128
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	16/8	32/16	64/64	128/64
<i>A. baumannii</i> ATCC 19606	8/8	32/32	32/32	128/64
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	32/32	128/128	>512/>512	>512/>512
<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	16/16	32/32	128/128	256/256
<i>E. coli</i> ATCC 25922	1/1	2/2	32/32	64/32

^aVREfm9, *E. faecium* (VRE); N315, *S. aureus* (MRSA); KP171, *K. pneumoniae* (KPC-2); Ab120, *A. baumannii* (OXA-23); 48-1997A, *P. aeruginosa* (SPM-1); *Ecl* 1471, *E. cloacae* (CTX-M-8); ICBEC7P, *E. coli* (MCR-1); ICBEC72H, *E. coli* (MCR-1); ICBEC12-3F, *E. coli* (MCR-1).

4.3 Efeito bacteriostático de soluções salinas hipertônicas sobre o crescimento bacteriano planctônico e biofilme

A análise do efeito de diferentes concentrações de NaCl permitiu observar que a concentração de 1,1 M de NaCl apresenta caráter bacteriostático para células planctônicas das cepas de *A. baumannii* Ab120 (OXA-23), *E. cloacae* *Ecl* 1471 (CTX-M-8), *P. aeruginosa* 48-1997A (SPM-1) e os respectivos controles ATCCs de *A. baumannii* 19606, *E. aerogenes* 13048 e *P. aeruginosa* 15442. Já, a concentração de 1,7 M de NaCl estendeu este efeito bacteriostático para as cepas de *E. coli* ICBEC7P, ICBEC72H, ICBEC12-3F (MCR-1), *E. faecium* VREfm9 (VRE), *K. pneumoniae* KP171 (KPC-2), e os respectivos controles ATCCs *E. coli* 25922, *E. faecalis* 29212 e *K. pneumoniae* 13883. Entretanto, para *S. aureus* N315 (MRSA) e ATCC *S. aureus* 6538, o efeito bacteriostático foi atingido na concentração de 2,5 M de NaCl.

Por outro lado, nenhuma das concentrações testadas de NaCl apresentou efeito inibitório contra biofilmes já formados. Entretanto, quando estas soluções hipertônicas de NaCl foram utilizadas diretamente no meio de cultura, durante a formação do biofilme, esta forma de crescimento foi inibida.

4.4 Soluções salinas hipertônica de NaCl inibem podem inibir a motilidade bacteriana

Ensaio de motilidade da cepa de *P. aeruginosa* 48-1997A utilizando meio semissólido acrescido de concentrações crescentes de NaCl (1-7 %), permitiram identificar tanto a diminuição da motilidade mediada pelo flagelo e pili tipo IV, como confirmado pela inibição da formação de *swarming* (**Figura 9, A, C, E, G, I, K, M, O**); assim como, a motilidade dependente apenas de flagelo, no padrão *swimming* (**Figura 9, B, D, F, H, J, L, N, P**). Na tabela 9 são apresentados valores da diminuição dos halos de crescimento bacteriano no formato *swarming* e *swimming*. Com relação a eles, para concentrações de 5 e 6 % de NaCl no meio, não foi possível medir o diâmetro de crescimento resultante da motilidade do tipo *swimming* e *swarming*, respectivamente.

Tabela 9. Determinação do halo de crescimento bacteriano mediado pela motilidade do tipo *swarming* e *swimming*, em função da força iônica do meio

Concentrações de NaCl (%)	Motilidade (mm)	
	<i>Swarming</i>	<i>Swimming</i>
0,25*	53	89
1	51	81
2	48	26
3	20	17
4	9	8
5	6	-
6	-	-
7	-	-

* Concentração base padrão do meio de cultura utilizado.

NaCl

Figura 9. Avaliação da motilidade dos tipos *swarming* e *swimming* da cepa de *P. aeruginosa* 48-1997A frente a concentrações crescentes de NaCl. A diminuição da motilidade dependente de flagelo e pili tipo IV, denominada de *swarming* é observada nas figuras 9A, C, E, G, I, K, M e O; já a diminuição da motilidade dependente apenas de flagelo, denominada de *swimming* é observada nas figuras 9B, D, F, H, J, L, N e P.

4.5 Efeito sinérgico entre antimicrobianos e soluções salinas hipertônicas contra biofilmes bacterianos

Por meio do método de *checkerboard*, constatou-se o aumento da efetividade da ação antibacteriana da combinação entre antibióticos, CQAs e soluções salinas hipertônicas, contra biofilmes (**Tabela 10-18**).

As combinações entre soluções salinas hipertônicas (SSH)/CQAs, SSH/cefotaxima e SSH/meropenem apresentaram efeito sinérgico contra o crescimento em biofilme das cepas de *E. coli* ICBE7P (**Tabela 10**) e ICBE72H (**Tabela 11**), enquanto que as combinações fluoroquinolonas (ciprofloxacino e levofloxacino)/SSH apresentaram efeito aditivo contra o crescimento em biofilme da cepas de *E.coli* ICBE72H (Tabela 11).

Tabela 10. Efeito sinérgico de antimicrobianos contra o crescimento em biofilme da cepa de *E. coli* ICBE7P (MCR-1)

Combinação entre antimicrobianos (A+B) ^a	CIM (A) (mg/ml) ^b	CIM(B) (µg/ml)	CIF (A)	CIF (B)	ΣCIF=CIF A+ CIF B	Interpretação ^c
NaCl + CFO	100	64	0,5	0,03	0,53	S
NaCl + MER	100	32	0,5	0,06	0,56	S
NaCl + CBA	100	16	0,5	0,08	0,58	S
NaCl + CCP	100	128	0,5	0,03	0,53	S

^aCFO, Cefotaxima; MER, Meropenem; CBA, Cloreto de Benzalcônio; CCP, Cloreto de Cetilpiridínio.

^bConcentração de NaCl equivalente a 1,7 M.

^cSinergismo

Tabela 11. Efeito sinérgico de antimicrobianos contra o crescimento em biofilme da cepa de *E. coli* ICBE72H (MCR-1)

Combinação entre antimicrobianos (A+B) ^a	CIM (A) (mg/ml) ^b	CIM(B) (µg/ml)	CIF (A)	CIF (B)	ΣCIF=CIF A+ CIF B	Interpretação ^c
NaCl + CFO	100	256	0,5	0,06	0,56	S
NaCl + CIP	100	512	0,6	0,06	0,66	A
NaCl + LVX	100	256	0,6	0,06	0,66	A
NaCl + MER	100	32	0,5	0,06	0,56	S
NaCl + CBA	100	16	0,5	0,06	0,56	S
NaCl + CCP	100	256	0,5	0,007	0,5	S

^aCFO, Cefotaxima; CIP, Ciprofloxacino; LVX, Levofloxacino; MER, Meropenem; CBA, Cloreto de Benzalcônio; CCP, Cloreto de Cetilpiridínio.

^bConcentração de NaCl equivalente a 1,7 M.

^cS, sinergismo; A, aditivo.

Para biofilme produzido pela cepa de *E. coli* ICBE12-3F, só as combinações SSH/CQAs e SSH/cefotaxima apresentaram efeito sinérgico (Table 12). No entanto, as combinações fluoroquinolonas/SSH apresentaram efeito aditivo.

Tabela 12. Efeito sinérgico de antimicrobianos contra o crescimento em biofilme da cepa de *E. coli* ICBE12-3F (MCR-1)

Combinação entre antimicrobianos (A+B) ^a	CIM (A) (mg/ml) ^b	CIM(B) (µg/ml)	CIF (A)	CIF (B)	ΣCIF=CIF A+ CIF B	Interpretação ^c
NaCl + CFO	100	32	0,5	0,06	0,56	S
NaCl + CIP	100	32	0,5	0,25	0,75	A
NaCl + LVX	100	16	0,5	0,25	0,75	A
NaCl + MER	100	64	0,6	0,03	0,62	A
NaCl + CBA	100	32	0,5	0,07	0,57	S
NaCl + CCP	100	64	0,5	0,03	0,53	S

^aCFO, Cefotaxima; CIP, Ciprofloxacino; LVX, Levofloxacino; MER, Meropenem; CBA, Cloreto de Benzalcônio; CCP, Cloreto de Cetilpiridínio.

^bConcentração de NaCl equivalente a 1,7 M.

^cS, sinérgico; A, aditivo.

Contra biofilme produzido pela cepa de *E. cloacae* Ecl 1471 (CTX-M-8), combinações SSH/fluoroquinolonas e SSH/meropenem apresentaram efeito aditivo e indiferente, respectivamente. Por outro lado, combinações SSH/CQAs apresentaram apenas efeito aditivo (Tabela 13).

Tabela 13. Efeito sinérgico de antimicrobianos contra o crescimento em biofilme da cepa de *E. cloacae* Ecl 1471 (CTX-M-8)

Combinação entre antimicrobianos (A+B) ^a	CIM (A) (mg/ml) ^b	CIM(B) (µg/ml)	CIF (A)	CIF (B)	ΣCIF=CIF A+ CIF B	Interpretação ^c
NaCl + CIP	70	256	0,6	0,06	0,66	A
NaCl + LVX	70	256	0,6	0,12	0,62	A
NaCl + MER	70	128	0,7	0,12	0,82	I
NaCl + CBA	70	128	0,7	0,03	0,73	A
NaCl + CCP	70	256	0,7	0,03	0,73	A

^aCIP, Ciprofloxacino; LVX, Levofloxacino; MER, Meropenem; CBA, Cloreto de Benzalcônio; CCP, Cloreto de Cetilpiridínio.

^bConcentração de NaCl equivalente a 1,1 M.

^cA, aditivo; I, intermediário.

Para *A. baumannii* Ab120 (OXA-23) as combinações SSH/ampicilina-sulbactam, SSH/sulfametoxazol-trimetoprim, SSH/tetraciclina, ou SSH/CQA apresentaram efeito aditivo (Tabela 14), enquanto que para *K. pneumoniae* KP171 (KPC-2) apenas a combinação SSH/CQA teve um efeito aditivo contra o crescimento em biofilme (Tabela 15).

Tabela 14. Efeito sinérgico de antimicrobianos contra o crescimento em biofilme da cepa de *A. baumannii* Ab120 (OXA-23)

Combinação entre antimicrobianos (A+B) ^a	CIM (A) (mg/ml) ^b	CIM(B) (µg/ml)	CIF (A)	CIF (B)	ΣCIF=CIF A+ CIF B	Interpretação ^c
NaCl + SAM	70	512	0,7	0,01	0,71	A
NaCl + SXT	70	512	0,6	0,01	0,61	A
NaCl + TET	70	512	0,7	0,03	0,73	A
NaCl + CBA	70	256	0,7	0,04	0,74	A
NaCl + CCP	70	256	0,7	0,03	0,73	A

^a SAM, Ampicilina-Sulbactam; SXT, Sulfametoxazol-Trimetoprim; TET, Tetraciclina; CBA, Cloreto de Benzalcônio; CCP, Cloreto de Cetilpiridínio

^bConcentração de NaCl equivalente a 1,1 M.

^c A,aditivo

Tabela 15. Efeito sinérgico de antimicrobianos contra o crescimento em biofilme da cepa de *K. pneumoniae* KP171 (KPC-2)

Combinação entre antimicrobianos (A+B) ^a	CIM (A) (mg/ml) ^b	CIM(B) (µg/ml)	CIF (A)	CIF (B)	ΣCIF=CIF A+ CIF B	Interpretação ^c
NaCl + TIG	100	128	0,7	0,25	0,95	I
NaCl + CBA	100	128	0,7	0,03	0,73	A
NaCl + CCP	100	128	0,7	0,01	0,71	A

^a TIG, Tigeciclina; CBA, Cloreto de Benzalcônio; CCP, Cloreto de Cetilpiridínio.

^bConcentração de NaCl equivalente a 1,7 M.

^c A,aditivo; I, indiferente

As combinações entre SSH e aminoglicosídeos (gentamicina e tobramicina) ou aztreonam, apresentaram efeito aditivo contra o crescimento em biofilme da cepa de *P. aeruginosa* 48-1997A/SPM-1 (Tabela 16).

Tabela 16. Efeito sinérgico de antimicrobianos contra o crescimento em biofilme da cepa de *P. aeruginosa* 48-1997A (SPM-1)

Combinação entre antimicrobianos (A+B) ^a	CIM (A) (mg/ml) ^b	CIM(B) (µg/ml)	CIF (A)	CIF (B)	ΣCIF=CIF A+ CIF B	Interpretação ^c
NaCl + ATM	70	512	0,6	0,03	0,63	A
NaCl + GEN	70	512	0,7	0,03	0,73	A
NaCl + TOB	70	512	0,7	0,03	0,73	A
NaCl + CBA	70	>512	1	1	2	I
NaCl + CCP	70	>512	1	1	2	I

^aATM, Aztreonam; GEN, Gentamicina; TOB, Tobramicina; CBA, Cloreto de Benzalcônio; CCP, Cloreto de Cetilpiridínio.

^bConcentração de NaCl equivalente a 1,1 M.

^c A,aditivo, I, indiferente

Para Gram-positivos, a combinação SSH/cloranfenicol foi capaz de apresentar efeito aditivo contra o crescimento em biofilme da cepa de *E. faecium* VREfm9 (VRE) (Tabela 17). Enquanto que, combinações entre antibióticos e soluções salinas apresentaram efeito indiferente para o biofilme produzido pela cepa de *S. aureus* N315 (MRSA) (Tabela 18).

Tabela 17. Efeito sinérgico de antimicrobianos contra o crescimento em biofilme da cepa de *E. faecium* VREfm9 (VRE)

Combinação entre antimicrobianos (A+B) ^a	CIM (A) (mg/ml) ^b	CIM(B) (µg/ml)	CIF (A)	CIF (B)	ΣCIF=CIF A+ CIF B	Interpretação ^c
NaCl + CLO	100	512	0,7	0,01	0,71	A
NaCl + LNZ	100	512	0,7	0,06	0,76	I
NaCl + TET	100	512	0,8	0,06	0,86	I
NaCl + CBA	100	128	0,7	0,01	0,71	A
NaCl + CCP	100	128	0,7	0,04	0,74	A

^a CLO, Cloranfenicol; LNZ, Linezolida; TET, Tetraciclina; CBA, Cloreto de Benzalcônio; CCP, Cloreto de Cetilpiridínio.

^bConcentração de NaCl equivalente a 1,7 M.

^c A, aditivo; I, indiferente.

Tabela 18. Efeito sinérgico de antimicrobianos contra o crescimento em biofilme da cepa de *S. aureus* N315 (MRSA)

Combinação entre antimicrobianos (A+B) ^a	CIM (A) (mg/ml) ^b	CIM(B) (µg/ml)	CIF (A)	CIF (B)	ΣCIF=CIF A+ CIF B	Interpretação ^c
NaCl + LNZ	150	512	0,8	0,03	0,83	I
NaCl+ TOB	150	256	0,9	0,25	1,15	I
NaCl+ CBA	150	128	1	0,5	1,5	I
NaCl+ CCP	150	128	1	0,5	1,5	I

^aLNZ, Linezolida; TOB, Tobramicina; CBA, Cloreto de Benzalcônio; CCP, Cloreto de Cetilpiridínio

^bConcentração de NaCl equivalente a 2,5 M.

^c I, indiferente

4.6 Monitoramento do crescimento bacteriano em biofilme, em superfície de cerda de poliamida, por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Através da MEV foi possível observar que a condição de alta força iônica não alterou a estrutura das cerdas pré-tratadas (**Figura 10**). O monitoramento do crescimento bacteriano, em superfície de cerda de poliamida, das cepas de *P. aeruginosa* 48-1997A (SPM-1), *K. pneumoniae* KP171 (KPC-2) e *E. coli* ICBEC72H (MCR-1), permitiu confirmar a formação de biofilmes, na ausência de um pré-tratamento das cerdas com NaCl. Contrariamente, em cerdas pré-tratadas com uma concentração de 1,1 M (7%) de

NaCl, observou-se uma diminuição de células bacterianas aderidas à cerda de poliamida **(Figura 11-13)**.

Figure 10. Microscopia eletrônica de varredura do controle negativo. Cerdas expostas por 24 horas ao meio de cultura na ausência de NaCl (A-C). Cerdas expostas por 24 horas ao meio de cultura a acrescido de 10% de NaCl (D-F).

Figura 11. Microscopia eletrônica de varredura dos biofilmes da cepa de *P. aeruginosa* 48-1997A (SPM-1/ST277). Biofilmes formados em 24 horas na ausência de NaCl (A-C). Biofilmes formados em 24 horas em meio de cultura acrescido de 7% de NaCl (D-F).

Figura 12. Microscopia eletrônica de varredura dos biofilmes da cepa de *K. pneumoniae* KP171 (KPC-2/ST340). Biofilmes formados em 24 horas na ausência de NaCl (A-C). Biofilmes formados em 24 horas em meio de cultura acrescido de 10% NaCl (D-F).

Figura 13. Microscopia eletrônica de varredura dos biofilmes da cepa de *E. coli* ICBE72H (MCR-1/ST101). Biofilmes formados em 24 horas na ausência de NaCl (A-C). Biofilmes formados em 24 horas em meio de cultura acrescido de 10% NaCl (D-F).

4.7 *Galleria mellonella* como modelo *in vivo* de infecção por biofilme, e aumento da sobrevivência associado à inibição do biofilme mediado pelo uso de soluções salinas hipertônicas (SSH)

Biofilmes formados em cerdas de poliamida foram inseridos em *prolegs* de larvas de *G. mellonella*, de forma a reproduzir uma infecção por biofilme associada a um dispositivo médico como sonda ou cateter (**Figura 14**). Verificou-se que biofilmes com maior tempo de maturação possuem maior letalidade do que biofilmes com menor tempo de crescimento. Entretanto, todos os biofilmes formados em 8, 12 e 24 h, foram capazes de causar a morte de 100% das larvas de *G. mellonella* ($p < 0.001$), no período máximo de 96 horas pós-infecção (**Figura 15**).

Figura 14. Modelo de infecção *G. mellonella*. A) Grupo controle (larvas vivas) B) Cerdas contendo biofilme da cepa de *P. aeruginosa* 48-1997A (SPM-1/ST277) formado em 24 horas, denominado de grupo Pa24H (larvas mortas) C) Indicada pelo círculo em vermelho, destaca-se a cerda de poliamida inserida em uma das larvas, pertencente ao grupo controle. D) Indicada pelo círculo em vermelho, destaca-se a cerda com biofilme de 24 horas, que foi inserido em uma das larvas pertencentes ao grupo Pa24H.

Por meio da avaliação *in vivo* da influencia do uso de uma solução hipertônica de NaCl usada para inibir a formação do biofilme em cerdas a serem inseridas no modelo invasivo de infecção, foi possível observar um aumento significativo de 40 a 60% ($p < 0.004$) na sobrevivência das larvas de *G. mellonella* infectadas com biofilmes das cepas de *A. baumannii* Ab120, *E. cloacae* Ecl 1471, *E. faecium* VREfm9 e *E. coli* ICBEC7P, ICBEC72H e ICBEC12-3F, formados em 12 e 8 horas, respectivamente. Por outro lado, houve um aumento significativo de 30 a 50% ($p < 0.04$) da sobrevivência das larvas infectadas com biofilmes da cepa de *S. aureus* N315, formados em 8 e 12 horas, respectivamente. na presença de SSH,

Para infecções produzidas por biofilmes de *P. aeruginosa* 48-1997A e *K. pneumoniae* KP171 formados durante 12 h na presença de SSH, observou-se um aumento significativo de 20% ($p < 0.05$) na sobrevivência das larvas de *G. mellonella* infectadas, em comparação a infecções por biofilmes formados na ausência de SSH (**Figura 16**). Já, para as mesmas bactérias, infecções induzidas por biofilmes de 8 h formados na presença de SSH levaram a um aumento significativo de 40% ($p < 0.004$) na sobrevivência de larvas infectadas, quando comparado a infecções por biofilmes crescidos na presença de SSH. Como observado *in vitro*, não houve aumento da sobrevivência das larvas infectadas com biofilmes formados em 24 horas, mesmo quando formados na presença de SSH.

Figure 15. Curvas de morte do modelo *G. mellonella*. Biofilmes formados em 8 (quadrado verde), 12 (triângulo vermelho), 24 horas (losango azul) foram analisados. Adicionalmente, cerdas estéreis foram utilizadas como controle negativo (círculo laranja). A) *E. faecium* VREfm9; B) *S. aureus* N315; C) *K. pneumoniae* KP171; D) *A. baumannii* Ab120; E) *P. aeruginosa* 48-1997A; F) *E. cloacae* Ecl 1471; G) *E. coli* ICBE7P; H) *E. coli* ICBE72H; I) *E. coli* ICBE12-3F.

Figura 16. Avaliação *in vivo* da inibição do biofilme mediado pelo uso de soluções salinas hipertônicas (SSH). Biofilmes formados em 8 (quadrado verde), 12 (triângulo vermelho), 24 horas (losango azul) foram analisados. Adicionalmente, cerdas estéreis foram utilizadas como controle negativo (círculo laranja).). A) *E. faecium* VREfm9; B) *S. aureus* N315; C) *K. pneumoniae* KP171; D) *A. baumannii* Ab120; E) *P. aeruginosa* 48-1997A; F) *E. cloacae* Ecl 1471; G) *E. coli* ICBE7P; H) *E. coli* ICBE72H; I) *E. coli* ICBE12-3F.

4.7.1 O aumento da sobrevivência de *G. mellonella*, decorrente da inibição do biofilme por soluções salinas hipertônicas (SSH), é inversamente proporcional à emissão de bioluminescência da cepa de *P. aeruginosa* PAO1/*lecA::lux*

Biofilmes produzidos pela cepa de *P. aeruginosa* PAO1/*lecA::lux* utilizando cerdas de poliamida como superfície de adesão, foram formados durante 8, 12 e 24 h tanto na ausência como presença de SSH, sendo posteriormente inseridas na proleg de larvas de *G. mellonella* (**Figura 17**), para posteriormente documentar a cinética de infecção. Nas larvas infectadas com os biofilmes formados em 8, 12 e 24 horas, na ausência de NaCl, foi possível detectar sinais intensos de bioluminescência. De fato, todos estes biofilmes foram capazes de causar a morte de 100% das larvas ($p < 0.001$). Porém, para os biofilmes formados em SSH, observou-se a diminuição significativa dos sinais de bioluminescência em 40 a 60% ($p < 0.004$) das larvas infectadas com biofilmes formados em 12 e 8 h, respectivamente. No entanto, condizente com a ausência da sobrevivência, 4 de 5 larvas de *G. mellonella* infectadas com biofilmes de *P. aeruginosa* PAO1/*lecA::lux* formados em 24 horas, na presença de SSH, apresentaram emissão de sinais intensos de bioluminescência, como medido após 24 h de infecção e comparado com biofilmes não tratados com SSH.

Figura 17. Cinética de bioluminescência de *P.aeruginosa* PAO1/lecA::lux em *G. mellonella*. A bioluminescência dos biofilmes da cepa de *P.aeruginosa* PAO1/lecA::lux formados na ausência de NaCl (A), presença de NaCl [7% (B)] com crescimento de 8, 12 e 24 horas foram analisados. Adicionalmente, cerdas estéreis não expostas ao NaCl (C) e expostas ao NaCl (D) foram utilizadas como o controle negativo.

4.7.2 O aumento da sobrevivência nas larvas infectadas com biofilmes inibidos por soluções salinas hipertônicas (SSH) é potencializado pela antibioticoterapia

Grupos de larvas de *G. mellonella* infectados com biofilmes de *E. faecium* VREfm9, crescidos durante 8, 12 e 24 horas na presença de SSH, tiveram aumento da sobrevivência para 80, 50 e 10 %, respectivamente, quando tratados terapêuticamente com uma dose de cloranfenicol (1,16 mg/kg), após 1h de infecção (**Figura 18**). Por outro lado, contra infecções produzidas por biofilmes da cepa de *P. aeruginosa* 48-1997A crescidos em 8, 12 e 24 h na presença de SSH, o uso terapêutico de aztreonam (1,45 mg/kg) aumentaram a sobrevivência para 60, 40 e 10%, respectivamente; enquanto que tratamentos com gentamicina (0.00147 mg/kg) ou

tobramicina (0.00145 mg/kg) aumentaram a sobrevivência das larvas infectadas para 50, 30 e 10%, respectivamente (**Figura 19**).

Figure 18. Avaliação *in vivo* da atividade terapêutica do cloranfenicol contra biofilmes da cepa de *E. faecium* VREfm9 inibidos pelo uso de soluções salinas hipertônicas. Biofilmes formados em 8 (quadrado verde), 12 (triângulo vermelho), 24 horas (losango azul) foram analisados. Adicionalmente, cerdas estéreis foram utilizadas como controle negativo (círculo laranja). CLO, cloranfenicol (1,16 mg/kg).

Para *A. baumannii* Ab120, infecções por biofilmes crescidos durante 8, 12 e 24 h em SSH e tratadas com uma dose de ampicilina + sulbactam (0,29 + 0,58 mg/kg), administrado 1 h após infecção, aumentaram a sobrevivência do modelo de infecção para 70, 50 e 10%, respectivamente. Já, o tratamento com sulfametoxazol-trimetoprim (0,00232 + 0,0029 mg/kg) aumentou esta sobrevivência para 70, 50 e 20%, respectivamente; em quando que o uso de tetraciclina (0,29 mg/kg) aumento esta sobrevivência para 60 e 40%, exclusivamente em infecções produzidas por biofilmes crescidos durante 8 e 12 h, na presença de SSH (**Figura 20**).

Figura 19. Avaliação *in vivo* da antibióticoterapia contra biofilmes da cepa de *P. aeruginosa* 48-1997A inibidos pelo uso de soluções salinas hipertônicas (SSH). Biofilmes formados em 8 (quadrado verde), 12 (triângulo vermelho), 24 horas (losango azul) foram analisados. Adicionalmente, cerdas estéreis foram utilizadas como controle negativo (círculo laranja). A) ATM, aztreonam (1,45 mg/kg); B) GEN, gentamicina (0,00147 mg/kg); C) TOB, tobramicina (0,00145 mg/kg).

Figura 20. Avaliação *in vivo* da antibióticoterapia contra biofilmes da cepa de *A. baumannii* Ab120 inibidos pelo uso de soluções salinas hipertônicas (SSH). Biofilmes formados em 8 (quadrado verde), 12 (triângulo vermelho), 24 horas (losango azul) foram analisados. Adicionalmente, cerdas estéreis foram utilizadas como controle negativo (círculo laranja). A) SAM, ampicilina-sulbactam (0,29 – 0,58 mg/kg); B) STX, sulfametoxazol-trimetoprim (0,00232 - 0,0029 mg/kg); C) TET, tetraciclina (0,29 mg/kg).

O uso de uma dose de ciprofloxacino (0,0928 mg/kg) aumento a sobrevida para ~ 80, 70 e 40%, respeito infecções produzidas por biofilmes de *E. coli* ICBEC72H (**Figura 21**), *E. coli* ICBEC12-3F (**Figura 22**) e *E. cloacae* Ecl 1471 (**Figura 23**), formados em 8, 12 e 24 h, respectivamente, na presença de SSH. Finalmente, para estas mesmas espécies, e adicionalmente para a cepa de *E. coli* ICBEC7P (**Figura 24**), infecções produzidas por biofilmes de 8, 12 e 24 h (crescidos nas mesmas condições de força iônica) e tratadas com meropenem (0,87 mg/kg) tiveram um aumento na sobrevida das larvas infectadas para ~80, 70 e 50%, respectivamente.

Figura 21. Avaliação *in vivo* da antibióticoterapia contra biofilmes da cepa de *E. coli* ICBEC72H inibidos pelo uso de soluções salinas hipertônicas (SSH). Biofilmes formados em 8 (quadrado verde), 12 (triângulo vermelho), 24 horas (losango azul) foram analisados. Adicionalmente, cerdas estéreis foram utilizadas como controle negativo (círculo laranja). A) CIP, ciprofloxacino (0,0928 mg/kg); B) MER, meropenem (0,87 mg/kg).

Figura 22. Avaliação *in vivo* da antibióticoterapia contra biofilmes da cepa de *E. coli* ICBEC12-3F inibidos pelo uso de soluções salinas hipertônicas (SSH). Biofilmes formados em 8 (quadrado verde), 12 (triângulo vermelho), 24 horas (losango azul) foram analisados. Adicionalmente, cerdas estéreis foram utilizadas como controle negativo (círculo laranja). A) CIP, ciprofloxacino (0,0928 mg/kg); B) MER, meropenem (0,87 mg/kg).

Figura 23. Avaliação *in vivo* da antibióticoterapia contra biofilmes da cepa de *E. cloacae* Ecl 1471 inibidos pelo uso de soluções salinas hipertônicas (SSH). Biofilmes formados em 8 (quadrado verde), 12 (triângulo vermelho), 24 horas (losango azul) foram analisados. Adicionalmente, cerdas estéreis foram utilizadas como controle negativo (círculo laranja). A) CIP, ciprofloxacino (0,0928 mg/kg); B) MER, meropenem (0,87 mg/kg).

Figura 24 Avaliação *in vivo* da atividade terapêutica do meropenem contra biofilmes da cepa de *E. coli* ICBE7P inibidos pelo uso de soluções salinas hipertônicas. Biofilmes formados em 8 (quadrado verde), 12 (triângulo vermelho), 24 horas (losango azul) foram analisados. Adicionalmente, cerdas estéreis foram utilizadas como controle negativo (círculo laranja). MER, meropenem (0,87 mg/kg).

5. DISCUSSÃO

Bactérias multirresistentes pertencentes ao grupo ESKAPE são importantes patógenos de infecções relacionadas à assistência à saúde, sendo frequentemente identificados em infecções associadas a biofilmes e infecções crônicas, como a fibrose cística, endocardite, osteomielite, infecção urinária por cateter vesical, ou outros procedimentos invasivos associados ao uso de cateteres e sondas (LIN et al, 2018; REEN et al., 2018; DE ANGELIS et al., 2018; VELÁZQUEZ-ACOSTA et al., 2018; OTTON et al., 2017; ROSSI et al., 2017; JAIN et al., 2017; PARKER et al., 2017; SABIR et al., 2017; VUOTTO et al., 2017; VALIZADEH et al., 2017; BARDBARI et al., 2017; KRZYŚCIAK et al., 2017; HE et al., 2017; MAKOVCOVA, et al., 2017; KARLOWSKY et al., 2017). Embora, o fenótipo MR decorra da expressão de mecanismos mediados por genes intrínsecos e/ou adquiridos, o crescimento bacteriano na forma de biofilme contribui para um importante fenômeno fisiológico de resistência, o qual é inespecífico quanto ao substrato antimicrobiano (LIN et al, 2018; REEN et al., 2018; DE ANGELIS et al., 2018; VELÁZQUEZ-ACOSTA et al., 2018; MAUNDERS;WELCH, 2017). Tanto a expressão da resistência fisiológica conferida pelo biofilme, como a adquirida por elementos genéticos móveis, tem contribuído com a seleção e prevalência de linhagens clonais, caracterizados molecularmente pelo MLST (ANDRADE et al., 2011; SACRAMENTO et al., 2016).

Dentre as espécies de patógenos Gram-negativos que formam parte do grupo ESKAPE, *K. pneumoniae* produtora de KPC-2 (CG258), *P. aeruginosa* produtora de SPM-1 (ST277) e *A. baumannii* produtor de OXA-23 (ST79) tem adquirido um caráter endêmico em centros médicos distribuídos em todo o Brasil (SAMPAIO; GALES 2016; ROSSI, 2011), enquanto que outro fenômeno de importância epidemiológica tem sido a emergência e disseminação de *E. coli* apresentando resistência à colistina mediada pela produção da fosfoetanolamina transferase MCR-1 (OLIVEIRA et al., 2018; ESPOSITO et al., 2017;

MONTE et al., 2017; SELLERA et al., 2017; FERNANDES et al., 2016a; FERNANDES et al., 2016b). Por outro lado, em Gram-positivos a prevalência de *E. faecium* resistente a vancomicina (VRE/ST478) tem aumentado nos últimos anos (SACRAMENTO et al., 2015).

No presente estudo, o aumento da CIM de diferentes classes de antibióticos, como carbapenêmicos, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos para bactérias como crescimento em biofilme, confirma resultados apresentados por estudos prévios, nos quais foram avaliados os mesmos antibióticos contra biofilmes de *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* (YUKSEL et al., 2018; HEMATI et al., 2014; NAPARSTEK et al., 2014). Este aumento da CIM para biofilmes de *E. faecalis* e *S. aureus* também tem sido observado para glicopeptídeos e aminoglicosídeos (YUKSEL et al., 2018; HEMATI et al., 2014; KAPLAN et al., 2012), assim como, para amônios quaternários (i.e., cloreto de cetilpiridínio e cloreto de benzalcônio) (KAMPF, 2018; KIM et al., 2018; RIZZOTTI et al., 2016).

Tendo em vista a complexidade e o custo do tratamento de infecções crônicas associadas à formação de biofilme, a busca de novas alternativas terapêuticas contra esse tipo de crescimento bacteriano tem sido considerada um desafio urgente para a medicina humana e veterinária (LIN et al., 2018; REEN et al., 2018; DE ANGELIS et al., 2018; VELÁZQUEZ-ACOSTA et al., 2018; BARDBARI et al., 2017; KRZYŚCIAK et al., 2017; HE et al., 2017; MAKOVCOVA, et al., 2017; OTTON et al., 2017; ROSSI et al., 2017; Jain et al., 2017; PARKER et al., 2017; SABIR et al., 2017; VUOTTO et; KRZYŚCIAK et al., 2017; KARLOWSKY et al., 2017; SWANSON et al., 2014; BAYNE, 2014).

Como estratégia para inibir a formação de biofilmes bacterianos foi avaliada a influencia da força iônica do meio, e para isto foi escolhido o uso de solução salina hipertônica (SSH), uma vez que a inibição do crescimento bacteriano por meio hipertônico tem sido demonstrada em infecções superficiais (STRAUSS et al., 1993). Por outro lado, a administração de soluções salinas hipertônicas (3,5 – 7 %), via nebulização, é utilizada

como uma das técnicas de desobstrução e hidratação das vias aéreas, auxiliando a aumentar a taxa de declínio da função pulmonar e diminuir exacerbações pulmonares, principalmente em pacientes com fibrose cística (HERRERO-CORTINA et al., 2018; MAIN et al., 2015; SMITH et al., 2017), porém, a sua contribuição contra as infecções pulmonares tem sido pouco estudada (REEVES et al., 2012).

Pesquisas clínicas em pacientes com fibrose cística têm avaliado favoravelmente a administração de soluções salinas hipertônicas contra infecções do trato respiratório inferior, produzidas por *P. aeruginosa*, relatando que as concentrações de 1,1 M (7 %) e 1,7 M (10 %) apresentaram “in vitro” efeito bactericida contra 38 e 90 % dos isolados analisados, respectivamente (SMITH et al., 2017; MICHON et al., 2014; HAVASI et al., 2008). Contudo, no presente estudo, foi observado que concentrações de 1,1 M, 1,7 M e 2,5 M de NaCl apresentaram efeito bacteriostático *in vitro*, contra o crescimento planctônico das cepas analisadas.

Dentre os mecanismos bacterianos relacionados ao crescimento em biofilme, a motilidade é um dos fatores de virulência mais importantes da patogênese, desempenhando um papel crucial no processo de colonização do hospedeiro e formação de biofilme (DIARD; HARDT, 2017). Esse mecanismo pode ser mediado pelo flagelo e pili tipo IV, sendo denominado de *swarming*; ou mediado apenas pelo flagelo, sendo denominado de *swimming* (DIARD; HARDT, 2017; MICHON et al., 2014; GUTTENPLAN; KEARNES, 2013; YEUNG et al., 2012; BEHRENDTS et al., 2010).

Em relação ao presente estudo, a diminuição do crescimento planctônico em formato *swimming* e *swarming* da cepa de *P. aeruginosa* 48-1997A na presença de soluções salinas hipertônicas a partir da concentração de 2%, coincide com estudos descritos previamente que, apesar de não especificarem o tipo de motilidade, relatam a

diminuição do crescimento de cepas de *P. aeruginosa* quando expostas as mesmas concentrações de NaCl (MICHON et al., 2014; HAVASI et al., 2008).

Adicionalmente, a ausência de crescimento *swimming* e *swarming* da cepa de *P. aeruginosa* 48-1997A, observada no presente estudo, não só indica que altas concentrações de NaCl são capazes de interferir na motilidade bacteriana, mas também que estas concentrações podem estar atuando com maior eficácia contra a capacidade motora do flagelo, tendo em vista que a concentração de NaCl necessária para inibir o crescimento em formato *swimming* foi menor do que a concentração necessária para inibir o crescimento em formato *swarming* da cepa 48-1997A.

Além da avaliação da atividade antibacteriana de soluções salinas hipertônicas, estudos descritos previamente tem demonstrado a ação antibiofilme de CQAs, onde foi possível observar a diminuição da formação de biofilme dental misto, após o uso de enxaguantes bucais contendo cloreto de cetilpiridínio como componente base (TENG et al., 2016), assim como, quando foi incorporado como um dos componentes em goma de mascar (AL-GHANANEEM et al., 2017). Além disso, estudos descritos previamente relatam a atividade antimicrobiana do cloreto de benzalcônio contra o crescimento planctônico de *Enterobacter cloacae*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Pantoea* spp., *Enterococcus* spp. e *S. aureus*, (KAMPF, 2018; KIM et al., 2018) e biofilmes mistos de *E. coli* e *L. monocytogenes* (RODRÍGUEZ-LÓPEZ et al, 2017). No presente estudo, foi constatado que ambos CQAs apresentaram efeito bactericida contra o crescimento planctônico e em biofilme de todas as cepas utilizadas (KAMPF, 2018; KIM et al., 2018).

Estudos descritos previamente demonstraram a potencialização da ação de nanoemulsões de cloreto de cetilpiridínio quando combinadas com altas concentrações de NaCl, contra biofilmes formados por cepas de *A. baumannii* (HWANG et al., 2013). Porém, como observado no presente estudo, concentrações menores de NaCl foram capazes de

gerar o aumento da efetividade da ação antibiofilme de CQAs e antibióticos, principalmente dos beta-lactâmicos cefoxitina e meropenem.

Através da técnica de microscopia eletrônica de varredura, alguns trabalhos têm demonstrado a presença da matriz de exopolissacarídeos decorrente ao crescimento em biofilme de diversas bactérias como *E. coli* (ADATOR *et al.*, 2018; MOSHARAF *et al.*, 2018), *P. aeruginosa* (PINGLE *et al.*, 2018; POWELL *et al.*, 2018), *K. pneumoniae* (MOSHARAF *et al.*, 2018; BANDEIRA *et al.*, 2017) e *S. aureus* (RUBINI *et al.*, 2018; OBERMEIER *et al.*, 2018).

Em nosso estudo, a presença massiva da matriz de exopolissacarídeos nos biofilmes crescidos em 24 horas formados pelas cepas de *P. aeruginosa* 48-1997A, *K. pneumoniae* KP171 e *E. coli* ICBEC72H também pode ser claramente visualizada sobre as cerdas de poliamida utilizadas como superfície de adesão. Entretanto, quando as condições de crescimento foram alteradas através da modificação da força iônica do meio de cultura, na presença de SSH, observou-se uma diminuição eminente da presença de matriz de exopolissacarídeos em todos os biofilmes analisados, bem como células bacterianas aderidas a mesma, que são relacionadas ao processo de maturação e proliferação de biofilme. No entanto, dentre as cepas analisadas, a solução salina hipertônica apresentou maior eficácia contra o crescimento em biofilme da cepa de *E. coli* ICBEC72H (colistin resistente) produtora de MCR-1, onde praticamente não foi observado crescimento bacteriano aderido à cerda exposta ao tratamento.

Embora, pesquisas direcionadas à produção e avaliação de alternativas terapêuticas para o tratamento de infecções produzidas por bactérias multirresistentes, tem sido validadas principalmente sobre o modelo de crescimento bacteriano planctônico (BENTHALL *et al.*, 2015; INSUA *et al.*, 2013), a mesma avaliação para bactérias em crescimento de biofilme não é realizada de rotina, o que tem sido questionado pela importância clínica do biofilme.

A formação de biofilme tem sido frequentemente observada em infecções causadas por bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, acometendo preferencialmente superfícies abióticas, como dispositivos médicos (i.e., sondas, cateteres e tubulações para auxílio respiratório) e próteses (i.e., ortopédicas e vasculares), sendo associado com outras doenças e infecções como pneumonia em pacientes com fibrose cística, endocardite, osteomielite, feridas crônicas, e infecções urinárias relacionadas ao uso de sonda vesical (MILLER et al., 2018; OTTON et al., 2017; ROSSI et al., 2017; JAIN et al., 2017; PARKER et al., 2017; SABIR et al., 2017; VUOTTO et al., 2017; VALIZADEH et al., 2017; BARDBARI et al., 2017; KRZYŚCIAK et al., 2017; HE et al., 2017; MAKOVCOVA, et al., 2017).

Por esse motivo, no presente estudo incluímos a avaliação *in vivo* de combinações de compostos antibacterianos contra biofilmes produzidos por bactérias multirresistentes, utilizando o modelo invertebrado de *Galleria mellonella*, o qual apresenta vantagens do ponto de vista ético e de manipulação (Benthall et al., 2015). A padronização do modelo de infecção *in vivo* de biofilme foi baseada na utilização de cerdas de poliamida como superfície de adesão de crescimento, que ao serem ineridas nas *prolegs* das larvas de *G. mellonella* possibilitaram a reprodução de uma infecção por biofilme associada a um dispositivo médico como sonda ou cateter.

Dessa forma, foi evidenciado que a letalidade das infecções causadas pelos biofilmes foi proporcional ao tempo de maturação do biofilme, de modo semelhante ao que foi descrito previamente, onde foi observado que biofilmes de *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* formados em 24h foram capazes de causar a morte de todas as larvas utilizadas como modelo de infecção de biofilme (BENTHALL et al., 2015, WAND et al., 2012, PELEG et al., 2009).

Por outro lado, devido ao uso de soluções salinas hipertônicas durante o crescimento de biofilmes formados em 8 e 12h, foi possível observar que houve um

aumento do tempo necessário para iniciação do processo infeccioso no modelo de infecção, refletindo no aumento da sobrevivência das larvas infectadas com biofilmes de menor tempo de maturação. Contudo, esse fenômeno não foi observado nas larvas infectadas com biofilmes crescidos na presença de soluções salinas hipertônicas formados em 24h, o que pode ser justificado pelo fato de que apesar da alteração da condição de crescimento, biofilmes com maior tempo de formação conseguem atingir estágios mais avançados do processo de maturação e proliferação de biofilme, resultando em uma possível carga bacteriana maior.

Finalmente, conforme observado no presente estudo, a combinação da alteração da condição de crescimento com o uso de soluções salinas hipertônicas e a antibióticoterapia, administrada posteriormente, gerou o aumento da sobrevivência das larvas infectadas com biofilmes formados em 8, 12 e 24 horas de maturação. Assim, os resultados da atividade bacteriostática de altas concentrações de NaCl e o aumento da efetividade da ação antibacteriana na sua presença, é um resultado inédito que pode chegar a ter aplicação clínica, sendo de grande utilidade na inibição do crescimento bacteriano tanto na sua forma planctônica como biofilme.

Algumas limitações do presente estudo poderiam ser observadas, como por exemplo, a ausência da avaliação da influência do tratamento prévio das superfícies de adesão das cerdas de poliamida com SSH. Por outro lado, considerando o atual uso de SSH como terapia paliativa do tratamento de infecções pulmonares (principalmente em pacientes com fibrose cística), a avaliação do efeito antibacteriano, *in vivo*, da SSH administrada por nebulização merece investigação. Porém, os resultados apresentados podem ser a base para estudos posteriores que permitam ter resultados conclusivos sobre a utilidade de agentes físico-químicos na inibição do biofilme bacteriano.

6. CONCLUSÕES

- O crescimento em biofilme de clones bacterianos multirresistentes do grupo ESKAPE confere resistência inespecífica a antibióticos e CQAs de uso humano e veterinário;
- Soluções hipertônicas de cloreto de sódio ($\geq 7\%$) possuem em efeito bacteriostático contra o crescimento planctônico e biofilme de clones de bactérias multirresistentes do grupo ESKAPE;
- O uso combinado de antimicrobianos (antibióticos e CQAs) e solução salina hipertônica (SSH) apresentou um efeito sinérgico contra biofilmes produzidos por clones bacterianos multirresistentes do grupo ESKAPE;
- O aumento da força iônica decorrente ao uso de SSH diminuiu proporcionalmente a motilidade bacteriana, possivelmente afetando a capacidade motora do flagelo;
- O modelo invertebrado de *G. mellonella* pode ser utilizado para avaliar *in vivo* a patogenicidade de biofilmes bacterianos, assim como, a atividade terapêutica de antimicrobianos contra infecções associadas;
- O uso combinado de soluções salinas hipertônicas com antibióticos pode constituir uma estratégia terapêutica no tratamento de infecções associadas a biofilmes bacterianos por bactérias multirresistentes, como avaliado pelo aumento da sobrevivência do modelo de *Galleria mellonella*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELKADER, M.M; ABOSHANAB, K.M; EL-ASHRY, M.A; ABOULWABA, M.M. Prevalence of MDR pathogens of Bacterial meningitis in Egypt and new synergistic antibiotic combinations. **PLoS One**. 2017 16;12(2):e0171349.
- ADATOR, Emelia Hornam, et al. Ability of Shiga toxigenic *Escherichia coli* to survive within dry-surface biofilms and transfer to fresh lettuce. **International journal of food microbiology** 2018 269:52-59.
- AHN KB, BAIK JE, YUN C-H, et al Lipoteichoic Acid inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation. **Frontiers in microbiology**. 2018;9:327.
- ALGBURI, A; COMITO, N; KASHTANOV, D; et al. Control of biofilm formation: antibiotics and beyond. **Appl Environ Microbiol**. 2017 Jan 17;83(3).pii: e02508-16.
- AL-GHANANEEM AM, LEUNG KP, FARAJ J, DELUCA PP. Development of a sustained antiplaque and antimicrobial chewing gum of a decapeptide. **AAPS PharmSciTech**. 2017 Jan 9.
- ALSHARAPY SA, YANAT B, LOPEZ-CERERO L, et al. Prevalence of ST131 clone producing both ESBL CTX-M-15 and AAC(6')Ib-cr among ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* isolates from yemen [published online ahead of print June 8, 2018]. **Microbial drug resistance** (Larchmont, NY). June 2018;10.1089/mdr.2018.0024.
- AL-TAWFIQ, J.A; LAXMINARAYAN, R; MENDELSON, M. How should we respond to the emergence of plasmid-mediated colistin resistance in humans and animals? **Int J Infect Dis**. 2017 Jan;54:77-84.
- ALVES, D.; COSTA, A.L.; ALMEIDA, R.F.; CARVALHO, J.F.C.; FELINO, A. Cloreto de cetilpiridínio - revisão da literatura. **Rev Port Estomatol Med Dent Cir Maxilofac**. . 2012, 53:181–189.
- AL-WRAFY, F; BRZOZOWSKA, E; GÓRSKA, S et al. Pathogenic factors of *Pseudomonas aeruginosa* - the role of biofilm in pathogenicity and as a target for phage therapy. **Postepy Hig Med Dosw** (Online). 2017 Feb 14;71(0):78-91.
- ANDRADE, L. N., CURIAO, T., FERREIRA, J. C., LONGO, J. M., CLÍMACO, E. C., MARTINEZ, R., ... BELLISSIMO-RODRIGUES, F. Dissemination of *bla*_{KPC-2} by the spread of *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 258 clones (ST258, ST11, ST437) and plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among Enterobacteriaceae species in Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 2011. 55.7, 3579-3583.
- ANWAR, H.; BIESEN, T. V.; DASGUPTA, M.; LAM, K.; COSTERTON, J. W. Interaction of biofilm bacteria with antibiotics in a novel in vitro chemostat system. **Antimicrob Agents Chemother**. 1989 Oct; 33(10): 1824–1826.
- BANDEIRA, MARIA, et al. “Insights on *Klebsiella pneumoniae* Biofilms Assembled on Different Surfaces Using Phenotypic and Genotypic Approaches.” **Microorganisms** 2017 5.2: 16.
- BARDBARI AM, ARABESTANI MR, KARAMI M, et al. Correlation between ability of biofilm formation with their responsible genes and MDR patterns in clinical and environmental *Acinetobacter baumannii* isolates. **Microbial pathogenesis**. 2017;108:122-128.
- BAUER, A. W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, 1966, v. 45, n. 4, p. 493-496.
- BEHRENDTS V, RYALL B, WANG X, Metabolic profiling of *Pseudomonas aeruginosa* demonstrates that the anti-sigma factor MucA modulates osmotic stress tolerance. **Mol Biosyst** 2010 6: 562–569.
- BENTHALL, G.; TOUZEL, R. E.; HIND, C. K. et al. E. Evaluation of antibiotic efficacy against infections caused by planktonic or biofilm cultures of *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* in *Galleria mellonella*. **Int J Antimicrob Agents** . 2015 Nov;46(5):538-45.

- BOUCHER, H.W.; TALBOT, G.H.; BRADLEY, J.S.; et al. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. **Clin Infect Dis**. 2009 Jan 1; 48(1):1-12.
- BOWERS, J. R., KITCHEL, B., DRIEBE, E. M., et al. Genomic analysis of the emergence and rapid global dissemination of the clonal group 258 *Klebsiella pneumoniae* pandemic. **PloS one**, 10.7, e0133727-e0133727. (2015). doi:10.1371/journal.pone.0133727
- BRAUER, A.; TELLING, K.; LAHT, M.; KALMUS, P.; LUTSAR, I.; REMM, M.; KISAND, V.; TENSON T. Plasmid with colistin resistance gene *mcr-1* in ESBL-producing *Escherichia coli* strains isolated from pig slurry in Estonia. **Antimicrob Agents Chemother**. 2016 Aug 29. pii: AAC.00443-16.
- CAZZANIGA G, OTTOBELLI M, IONESCU A et al. Surface properties of resin-based composite materials and biofilm formation: A review of the current literature. **American journal of dentistry**. 2015;28(6):311-320.
- CERI, H.; OLSON, M. E.; STREMICK, C.; READ, R. R.; MORCK, D.; BURET, A.. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of Bacterial biofilms. **J Clin Microbiol**. 1999 Jun; 37(6):1771-6.
- CHAGAS TP, CARVALHO KR, DE OLIVEIRA SANTOS IC, et al. Characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Brazil (2008-2011): countrywide spread of OXA-23-producing clones (CC15 and CC79). **Diagn Microbiol Infect Dis**. 2014 Aug;79(4):468-72.
- CHANTAWANNAKUL, P.; DE GUZMAN, L.I.; LI, J.; WILLIAMS, G.R. Parasites, pathogens, and pests of honeybees in Asia. **Apidologie** 2016, 47, 1–24.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 27th informational supplement. CLSI document M100-S27. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2017.
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria isolated from Animals; Approved Standard—Third Edition. CLSI document M31-A3. Wayne, PA, Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
- COATES, A.R; HALLS, G; HU, Y. Novel classes of antibiotics or more of the same? **British Journal of Pharmacology**. 2011;163(1):184-194.
- COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**. 1999 May 21;284(5418):1318-22. Review.
- DE ANGELIS, G., FIORI, B., MENCHINELLI, G., et al. Incidence and antimicrobial resistance trends in bloodstream infections caused by ESKAPE and *Escherichia coli* at a large teaching hospital in Rome, a 9-year analysis (2007-2015). **European Society of Clinical Microbiology**, 10.1007/s10096-018-3292-9.
- DIAB M, HAMZE M, MADEC J-Y, HAENNI M. High Prevalence of Non-ST131 CTX-M-15-Producing *Escherichia coli* in Healthy Cattle in Lebanon. **Microbial drug resistance** (Larchmont, NY). 2017;23(2):261-266. DIARD M, HARDT WD. Evolution of bacterial virulence. **FEMS Microbiol Rev**. 2017 41:679-697
- DONG CL, LI LX, CUI ZH, et al. Synergistic Effect of Pleuromutilins with other antimicrobial agents against staphylococcus aureus in vitro and in an experimental *Galleria mellonella* Model. **Frontiers in pharmacology** 8 (2017): 553-553.
- DRAPER, LORRAINE A, ET al. “Lantibiotic resistance.” **Microbiology and molecular biology reviews** : MMBR 79.2 (2015): 171-191.
- DROPA M, LINCOPAN N, BALSALOBRE LC, et al. Genetic background of novel sequence types of CTX-M-8- and CTX-M-15-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from public wastewater treatment plants in São Paulo, Brazil. 2016;235: 4953-4958.

- ELKHATIB, WALID, AND AYMAN NOREDDIN. "Efficacy of ciprofloxacin-clarithromycin combination against drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* mature biofilm using in vitro experimental model." **Microbial drug resistance** (Larchmont, N.Y.) 20.6 (2014): 575-582.
- ESPOSITO F, FERNANDES MR, LOPES R, et al. Detection of colistin-resistant MCR-1-positive *Escherichia coli* by use of assays based on inhibition by EDTA and Zeta Potential. **J Clin Microbiol.** 2017 Dec;55(12):3454-3465.
- EUCAST - The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 7.0, 2016. <http://www.eucast.org>.
- FAZLY BAZZAZ, B.S; SARABANDI, S; KHAMENEH, B; HOSSEINZADEH, H. Effect of catechins, green tea extract and methylxanthines in combination with gentamicin against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*: - Combination therapy against resistant Bacteria. **J Pharmacopuncture.** 2016 Dec;19(4):312-318.
- FERNANDES MR, SELLERA FP, ESPOSITO F, et al. Colistin-Resistant *mcr-1*-Positive *Escherichia coli* on Public Beaches, an Infectious Threat Emerging in Recreational Waters. **Antimicrob Agents Chemother.** 2017 Jun 27;61(7). pii: e00234-17.
- aFERNANDES, M.R.; MCCULLOCH, J.A.; VIANELLO, M.A.; et al. First Report of the Globally disseminated IncX4 Plasmid Carrying the *mcr-1* gene in a colistin-resistant *Escherichia coli* Sequence Type 101 Isolate from a human infection in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother.** 2016 Sep 23;60(10):6415-7
- bFERNANDES, M.R.; MOURA, Q.; SARTORI, L.; et al. Silent dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli* in South America could contribute to the global spread of the *mcr-1* gene. **Euro Surveill.** 2016 Abr 28;21(17).
- FONSECA, EL, MARIN, MA, ENCINAS, F, et al. Full characterization of the integrative and conjugative element carrying the metallo- β -lactamase *bla*_{SPM-1} and bicyclomycin *bcr1* resistance genes found in the pandemic *Pseudomonas aeruginosa* clone SP/ST277. **J Antimicrob Chemother.** 2015 Sep; 70(9):2547-50.
- FREIRES IA, SARDI JC, DE CASTRO RD, et al. Alternative animal and non-animal models for drug discovery and development: bonus or burden?. **Pharmaceutical research** 34.4 2017: 681-686.
- GALANTE J, HO AC-Y, TINGEY S, CHARALAMBOUS BM. Quorum sensing and biofilms in the pathogen, *Streptococcus pneumoniae*. **Current pharmaceutical design.** 2015;21(1):25-30.
- GLAVIS-BLOOM, JUSTIN, et al. "Of model hosts and man: using *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster* and *Galleria mellonella* as model hosts for infectious disease research." **Advances in experimental medicine and biology** 2012 710: 11-17.
- GONZÁLEZ-RAMÍREZ A.I; RAMÍREZ-GRANILLO A; MEDINA-CANALES M.G; et al. Analysis and description of the stages of *Aspergillus fumigatus* biofilm formation using scanning electron microscopy. **BCM Microbiol.** 2016 Out 18;16(1):243.
- GRAHAM SE, ZHANG L, ALI I, et al. Prevalence of CTX-M extended-spectrum beta-lactamases and sequence type 131 in Korean blood, urine, and rectal *Escherichia coli* isolates. Infection, genetics and evolution. **Journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases.** 2016;41:292-295.
- GUTTENPLAN SB, KEARNS DB. Regulation of flagellar motility during biofilm formation. **FEMS microbiology reviews.** 2013;37(6):849-871..
- HARRISON JJ, TURNER RJ, JOO DA, STAN MA, CHAN CS, ALLAN ND, VRIONIS HA, OLSON ME, CERI H. Copper and quaternary ammonium cations exert synergistic bactericidal and antibiofilm activity against *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother.** 2008 Aug;52(8):2870-81.
- HAVASI V; HURST C.O; BRILES T.C; YANG F; BAINS D.G; HASSETT D.J; SORSCHER E. Inhibitory effects of hypertonic saline on *P. aeruginosa* motility. **J Cyst Fibros.** 2008 Jul;7(4):267-9.

- HE X, YUAN F, LU F, YIN Y, CAO J. Vancomycin-induced biofilm formation by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* is associated with the secretion of membrane vesicles. **Microbial pathogenesis**. 2017;110:225-231. doi:10.1016/j.micpath.2017.07.004.
- Heitkamp, Rae A, et al. Association of *Enterococcus* spp. with Severe Combat Extremity Injury, Intensive Care, and Polymicrobial Wound Infection. **Surgical infections** **19.1** (2018): 95-103.
- HEMATI, S, et al. The correlation between the presence of quorum sensing, toxin-antitoxin system genes and MIC values with ability of biofilm formation in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Iranian journal of microbiology** **6.3** (2014): 133-139.
- HERRERO-CORTINA, B, et al. Impact of Hypertonic Saline Solutions on Sputum Expectoration and Their Safety Profile in Patients with Bronchiectasis: A Randomized Crossover Trial. **Journal of aerosol medicine and pulmonary drug delivery** (2018): 10.1089/jamp.2017.1443.
- HIRAMATSU K, ASADA K, SUZUKI E, OKONOGI K, YOKOTA T. Molecular cloning and nucleotide sequence determination of the regulator region of *mecA* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **FEBS Lett**. 1992 Feb 24;298(2-3):133-6.
- HWANG, Y Y, et al. Antimicrobial activity of nanoemulsion in combination with cetylpyridinium chloride in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial agents and chemotherapy** **57.8** (2013): 3568-3575.
- ILANGO VAN A, CONNERY S, WAKSMAN G. Structural biology of the Gram-negative bacterial conjugation systems. 2015;235: 301-310.
- INSUA JL, LLOBET E, MORANTA D, et al. Modeling *Klebsiella pneumoniae* pathogenesis by infection of the wax moth *Galleria mellonella*. 2013;8110: 3552-3565.
- JAIN N, ÅDÉN J, NAGAMATSU K, ET AL. Inhibition of curli assembly and *Escherichia coli* biofilm formation by the human systemic amyloid precursor transthyretin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 2017;114(46):12184-12189. doi:10.1073/pnas.1708805114.
- JEANNOT, K; BOLARD, A; PLÉSIAT, P. Resistance to polymyxins in Gram-negative organisms. **Int J Antimicrob Agents**. 2017 Feb 3. pii: S0924-8579(17)30032-8.
- JENNINGS, M.C.; MINBIOLE, K. P. C.; WUEST, W. M. Quaternary Ammonium Compounds: An Antimicrobial Mainstay and Platform for Innovation to Address Bacterial Resistance. **ACS Infect. Dis.**, 2015, **1** (7) :288–303.
- KAMPF, G. Adaptive microbial response to low level benzalkonium chloride exposure. **J Hosp Infect**. 2018 May 31. pii: S0195-6701(18)30284-6.
- KANNAPPAN A, GOWRISHANKAR S, SRINIVASAN R, et al. Antibiofilm activity of *Vetiveria zizanioides* root extract against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. 2017;110: 313-324.
- KAPLAN, JEFFREY B, et al. “Low levels of β -lactam antibiotics induce extracellular DNA release and biofilm formation in *Staphylococcus aureus*.” **mBio** **3.4** (2012): e00198-12. doi:10.1128/mBio.00198-12
- KARLOWSKY, JAMES A, ET al. “Resistance among Gram-negative ESKAPE pathogens isolated from hospitalized patients with intra-abdominal and urinary tract infections in Latin American countries: SMART 2013-2015.” *Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases* **21.3** (2017): 343-348.
- KAVANAGH K, REEVES EP. Exploiting the potential of insects for *in vivo* pathogenicity testing of microbial pathogens. **FEMS Microbiol Rev**. 2004 Feb;28(1):101-12. Review.
- KAYE, K.S.; POGUE, J. M. Infections Caused by Resistant Gram-Negative Bacteria: Epidemiology and Management. **Pharmacotherapy**. 2015 Oct; 35(10):949-62.

- KAZMIERCZAK BI, SCHNIEDERBEREND M, JAIN R. Cross-regulation of *Pseudomonas* motility systems: the intimate relationship between flagella, pili and virulence. **Current opinion in microbiology**. 2015;28:78-82.
- KIM M, WEIGAND MR, OH S, HATT JK, KRISHNAN R, TEZEL U, PAVLOSTATHIS SG, KONSTANTINIDIS KT. Widely used benzalkonium chloride disinfectants can promote antibiotic resistance. **Appl Environ Microbiol**. 2018 Jun 29. pii: AEM.01201-18.
- KRZYŚCIAK P, CHMIELARCZYK A, POBIEGA M, et al. *Acinetobacter baumannii* isolated from hospital-acquired infection: biofilm production and drug susceptibility. **APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**. 2017;125(11):1017-1026.
- KUOK, C.F; HOI, S.O; HOI, C.F; CHAN, C.H; FONG, I.H; NGOK, C.K; MENG, L.R; FONG P. Synergistic antibacterial effects of herbal extracts and antibiotics on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A computational and experimental study. **Exp Biol Med** (Maywood). 2017 Jan 1:1535370216689828.
- KWADHA, CHARLES A, Et al. “The Biology and Control of the Greater Wax Moth, *Galleria mellonella*.” **Insects** **8.2** (2017): 61.
- LANDINI, P.; ANTONIANI, D.; BURGESS, J. G et al. Molecular mechanisms of compounds affecting Bacterial biofilm formation and dispersal. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 2010 Apr. 86 (3): 813-823.
- LEAVIS, H. L.; BONTEN, M. J.; WILLEMS, R. J. Identification of high-risk enterococcal clonal omplexes: global dispersion and antibiotic resistance. **Curr Opin Microbiol**. 2006 Oct;9(5):454-60.
- LEBEAUX D, GHIGO JM, BELOIN C. Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. 2014;783: 510-543.
- LEUKO S, RAIVIO TL. Mutations that impact the enteropathogenic *Escherichia coli* Cpx envelope stress response attenuate virulence in *Galleria mellonella*. 2012;809: 3077-3085.
- LI Y-H, TIAN X. Quorum sensing and bacterial social interactions in biofilms. **Sensors** (Basel, Switzerland). 2012;12(3):2519-2538. doi:10.3390/s120302519.
- LIN, QIAO, ET al. “Prevention of ESKAPE pathogen biofilm formation by antimicrobial peptides WLBU2 and LL37.” **International journal of antimicrobial agents** (2018): S0924-8579(18)30128-6.
- LIU YY, WANG Y, WALSH TR 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 Infect Dis**. 2016;16(2):161-8.
- LORA-TAMAYO, JAIME, et al. “Activity of colistin combined with doripenem at clinically relevant concentrations against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in an in vitro dynamic biofilm model.” **Journal of antimicrobial chemotherapy** **69.9** (2014): 2434-2442.
- MAGIORAKOS A.P; SRINIVASAN A; CAREY R.B; 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**. 2012 Mar;18(3):268-81.
- MAIN, ELEANOR, et al. “Airway clearance strategies in cystic fibrosis and non-cystic fibrosis bronchiectasis.” **Seminars in respiratory and critical care medicine** **36.2** (2015): 251-266.
- MAKOVCOVA J, BABAK V, KULICH P, et al. Dynamics of mono- and dual-species biofilm formation and interactions between *Staphylococcus aureus* and Gram-negative bacteria. **Microbial biotechnology**. 2017;10(4):819-832. doi:10.1111/1751-7915.12705.
- MAROTTA-OLIVEIRA, S.S.; MARCHETTI, J.M. Determinação de heparina fracionada em preparações farmacêuticas utilizando turbidimetria. *Quim. Nova*. Mar 2011, 34(6):1063-1067

- MATHERS, A.J.; PEIRANO, G.; PITOUT, J.D. The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. **Clin Microbiol Rev.** 2015 Jul;28(3):565-91.
- MAUNDERS E, WELCH M. Matrix exopolysaccharides; the sticky side of biofilm formation. **FEMS microbiology letters**, 364.13, fnx120.
- SCHABERG, D.R.; CULVER, D.H.; GAYNES, R.P. Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection. **Am J Med.** 1991 Sep 16;91(3B):72S-75S.
- MICHEL B, SANDLER SJ. Replication Restart in Bacteria. 2017;19913: e00102-17. doi:10.1128/JB.00102-17
- MICHON, A. L.; BILAK, E. J.; CHIRON, R.; LAMY, B.; MARCHANDIN, H.. Advances toward the elucidation of Hypertonic Saline Effects on *Pseudomonas aeruginosa* from Cystic Fibrosis Patients . **PLOS ONE**. 2014 Feb 28; 9(2): e90164.
- MILLER, DANIEL P, et al. "Transcriptome Analysis of Porphyromonas gingivalis and cinetobacter baumannii in Polymicrobial Communities." **Molecular oral microbiology** (2018): 10.1111/omi.12238.
- MONTE DF, MEM A, FERNANDES MR, et al. Chicken Meat as a Reservoir of Colistin-Resistant *Escherichia coli* Strains Carrying *mcr-1* Genes in South America. 2017;615: e02718-16. doi:10.1128/AAC.02718-16
- MOSHARAF, M K, et al. "Metal-Adapted Bacteria Isolated From Wastewaters Produce Biofilms by Expressing Proteinaceous Curli Fimbriae and Cellulose Nanofibers." **Frontiers in microbiology** 9 (2018): 1334-1334. doi:10.3389/fmicb.2018.01334
- MOURA Q, FERNANDES MR, SILVA KC, MONTE DF, ESPOSITO F, DROPA M, NORONHA C, MORENO AM, LANDGRAF M, NEGRÃO FJ, LINCOPAN N. Virulent nontyphoidal *Salmonella* turanoproducing CTX-M and CMY-2 β -lactamases from livestock, food and human infection, Brazil. **Virulence**. 2017 Jan 19:0.
- MURAKAMI K, YUMOTO H, MURAKAMI A, AMOH T, VIDUCIC D, HIROTA K, TABATA A, NAGAMUNE H, KOURAI H, MATSUO T, MIYAKE Y. Evaluation of the effectiveness of the potent bis-quaternary ammonium compound, 4,4'-(α,ω -hexamethylenedithio) bis(1-octylpyridinium bromide) (4DTBP-6,8) on *Pseudomonas aeruginosa*. **J Appl Microbiol**. 2016 Dec 30.
- NAMAEI MH, YOUSEFI M, ZIAEE M, et al. First Report of Prevalence of CTX-M-15-Producing *Escherichia coli* O25b/ST131 from Iran. **Microbial drug resistance** (Larchmont, NY). 2017;23(7):879-884.
- NAPARSTEK, LIVNAT, et al. "Biofilm formation and susceptibility to gentamicin and colistin of extremely drug-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*." **Journal of antimicrobial chemotherapy** 69.4 (2014): 1027-1034.
- Nascimento APB, Ortiz MF, Martins WMBS, et al. Intracolon Genome Stability of the Metallo- β -lactamase SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* ST277, an Endemic Clone Disseminated in Brazilian Hospitals. **Frontiers in microbiology**. 2016;7:1946. doi:10.3389/fmicb.2016.01946.
- NIGAM, A., GUPTA, D., SHARMA, A.. Treatment of infectious disease: beyond antibiotics. **Microbiological research**, (2014)169.9-10, 643-651.
- OBERMEIER, ANDREAS, et al. "Viable adhered Staphylococcus aureus highly reduced on novel antimicrobial sutures using chlorhexidine and octenidine to avoid surgical site infection (SSI)." **PloS one** 13.1 (2018): e0190912-e0190912. doi:10.1371/journal.pone.0190912
- OLIVEIRA FA, ZACCARIOTTO TR, et al. MCR-1-positive colistin-resistant *Escherichia coli* in immunocompromised hospitalised patients. **Int J Antimicrob Agents**. 2018 Jun 23. pii: S0924-8579(18)30178-X.
- OLIVEIRA S, et al., 2014. Isolation of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains belonging to the high-risk multiresistant clonal complex 11 (ST437 and ST340) in urban rivers. **J Antimicrob Chemother** 69:849-852.

- OMS- Organização Mundial de Saúde. 2017. Disponível em <http://http://who.int/mediacentre/news/releases/2017/Bacteria-antibiotics-needed/en/> (acessado em março de 2017)
- ONG HS, OETTINGER-BARAK O, DASHPER SG, et al. Effect of azithromycin on a red complex polymicrobial biofilm. 2017;91: 1339579-1339579. doi:10.1080/20002297.2017.1339579
- OTANI S, HIRAMATSU K, HASHINAGA K, et al. Sub-minimum inhibitory concentrations of ceftazidime inhibit *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. **Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy**. 2018;24(6):428-433. doi:10.1016/j.jiac.2018.01.007.
- OTTON LM, DA SILVA CAMPOS M, MENEGHETTI KL, et al. Influence of twitching and swarming motilities on biofilm formation in *Pseudomonas strains*. **Archives of microbiology**. 2017;199(5):677-682. doi:10.1007/s00203-017-1344-7.
- PARK, JI YOUNG, ET AL. “Prevalence and Characteristics of Sequence Type 131 *Escherichia coli* Isolated from Children with Bacteremia in 2000-2015.” **Microbial drug resistance** (Larchmont, N.Y.) (2018): 10.1089/mdr.2017.0224.
- PARKER A, CUREOGLU S, DE LAY N, MAJDALANI N, GOTTESMAN S. Alternative pathways for *Escherichia coli* biofilm formation revealed by sRNA overproduction. **Molecular microbiology**. 2017;105(2):309-325. doi:10.1111/mmi.13702.
- PELEG, A.Y.; JARA, S.; MONGA, D.; et al. *Galleria mellonella* as a model system to study *Acinetobacter baumannii* pathogenesis and therapeutics. **Antimicrob Agents Chemother**. Jun. 2009 ;53(6):2605-9.
- PIETSCH M, ELLER C, WENDT C, et al. Molecular characterisation of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolates from hospital and ambulatory patients in Germany. **Veterinary microbiology**. 2017;200:130-137. doi:10.1016/j.vetmic.2015.11.028.
- PIMCHAN T, MAENSIRI D, EUMKEB G. Synergy and mechanism of action of α -mangostin and ceftazidime against ceftazidime-resistant *Acinetobacter baumannii*. 2017;654: 285-291.
- PINGLE, HITESH, et al. “Controlled Attachment of *Pseudomonas aeruginosa* with Binary Colloidal Crystal-Based Topographies.” **Small** (Weinheim an der Bergstrasse, Germany) 14.14 (2018): e1703574-e1703574.
- PIRK, C.W.; STRAUSS, U.; YUSUF, A.A.; DÉMARES, F.; Human, H. Honeybee health in Africa—A review. **Apidologie** 2015, 47, 276–300.
- PLETZER D, MANSOUR SC, HANCOCK REW. Synergy between conventional antibiotics and anti-biofilm peptides in a murine, sub-cutaneous abscess model caused by recalcitrant ESKAPE pathogens. **PLoS Pathog**. 2018 Jun 21;14(6):e1007084.
- POWELL, LYDIA C, et al. “Targeted disruption of the extracellular polymeric network of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by alginate oligosaccharides.” **NPJ biofilms and microbiomes** 4 (2018): 13-13.
- RAMARAO, N., Nielsen-Leroux, C., Lereclus, D. The Insect *Galleria mellonella* as a Powerful Infection Model to Investigate Bacterial Pathogenesis. **J. Vis. Exp.** (70), e4392, doi:10.3791/4392 (2012).
- REEN, F JERRY, ET AL. “The expanding horizon of alkyl quinolone signalling and communication in polycellular interactomes.” **FEMS microbiology letters** 365.9 (2018): 10.1093/femsle/fny076.
- REEVES EP, MOLLOY K, POHL K, MCELVANEY NG. Hypertonic saline in treatment of pulmonary disease in cystic fibrosis. 2012;2012: 465230-465230.
- RIZZOTTI L, ROSSI F, TORRIANI S. Biocide and antibiotic resistance of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from the swine meat chain. 2016;60: 160-164.
- ROSSI E, CIMDINS A, LÜTHJE P, et al. “It’s a gut feeling” - *Escherichia coli* biofilm formation in the gastrointestinal tract environment. **Critical reviews in microbiology**. 2018;44(1):1-30. doi:10.1080/1040841X.2017.1303660.

- ROSSI, F. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. **Clinical infectious diseases** : an official publication of the Infectious Diseases Society of America, (2011). 52.9, 1138-1143.
- ROZWANDOWICZ, M., BROUWER, M., FISCHER, J., Wagenaar, J. A., Gonzalez-Zorn, B., Guerra, B., ... Mevius, D. J. Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, (2018). 73.5, 1121-1137.
- RUBINI, DURAIRAJAN, et al. "Essential oils from unexplored aromatic plants quench biofilm formation and virulence of Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*." **Microbial pathogenesis** **122** (2018): 162-173.
- SABIR N, IKRAM A, ZAMAN G, ET AL. Bacterial biofilm-based catheter-associated urinary tract infections: Causative pathogens and antibiotic resistance. **American journal of infection control**. 2017;45(10):1101-1105. doi:10.1016/j.ajic.2017.05.009.
- SACRAMENTO, A.G.; CERDEIRA, L.T.; DE ALMEIDA, et al. Environmental dissemination of vanA-containing *Enterococcus faecium* strains belonging to hospital-associated clonal lineages. **J Antimicrob Chemother**. 2015 Oct 12. pii: dkv320.
- SAMPAIO JL, GALES AC. Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae in Brazil: focus on β -lactams and polymyxins. 2016;47 **Suppl 1**: 31-37.
- SCHABERG, T.; LODE, H.. Antibiotische Therapie der ambulant erworbenen Pneumonien. **Deutsche medizinische Wochenschrift** 1991, 116.50, 1917-1920.
- SELLERA FP et al. *Escherichia coli* carrying IncX4 plasmid-mediated mcr-1 and bla_{CTX-M} genes in infected migratory Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*). **The Journal of antimicrobial chemotherapy**. 2017 72:1255-1256
- SHARMA IM, PETCHIAPPAN A, CHATTERJI D. Quorum sensing and biofilm formation in mycobacteria: role of c-di-GMP and methods to study this second messenger. **IUBMB life**. 2014;66(12):823-834. doi:10.1002/iub.1339.
- SMITH WD, BARDIN E, CAMERON L, et al. Current and future therapies for *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cystic fibrosis. 2017;36414: 10.1093/femsle/fnx121.
- SOLANO C, ECHEVERZ M, LASA I. Biofilm dispersion and quorum sensing. **Current opinion in microbiology**. 2014;18:96-104. doi:10.1016/j.mib.2014.02.008.
- STRAUSS FG, HOLMES DL, NORTMAN DF, FRIEDMAN S. Hypertonic saline compresses: therapy for complicated exit-site infections. 1993;9: 248-250.
- SWANSON, E A, et al. "Biofilm-infected wounds in a dog." **Journal of the American Veterinary Medical Association** 244.6 (2014): 699-707.
- TA CAK, ARNASON JT. Mini Review of Phytochemicals and Plant Taxa with Activity as Microbial Biofilm and Quorum Sensing Inhibitors. **Molecules** (Basel, Switzerland). 2015;21(1):E29. doi:10.3390/molecules21010029.
- TÄNGDÉN T. Combination antibiotic therapy for multidrug-resistant Gram-negative bacteria. **Upsala journal of medical sciences**. 2014;119(2):149-153. doi:10.3109/03009734.2014.899279.
- TENG, F; HE, T; HUANG, S; et al. Cetylpyridinium chloride mouth rinses alleviate experimental gingivitis by inhibiting dental plaque maturation. **Int J Oral Sci**. 2016 Sep 29;8(3):182-90.
- TENOVER, F.C. Mechanisms of antimicrobial resistance in Bacteria. **Am J Infect Control**. 2006 Jun;34(5 Suppl 1):S3-10; discussion S64-73. Review.
- TOLEMAN, M. A., A. M. SIMM, T. A. MURPHY, A. C. Gales, D. J. Biedenbach, R. N. Jones, and T. R. Walsh. 2002. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. **J. Antimicrob. Chemother**.50673-679

- TRENTIN DS, SILVA DB, AMARAL MW, et al. Tannins possessing bacteriostatic effect impair *Pseudomonas aeruginosa* adhesion and biofilm formation. 2013;86: e66257-e66257. doi:10.1371/journal.pone.0066257
- TSAI CJ, LOH JM, PROFT T. *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. 2016;73: 214-229.
- TURANO H, GOMES F, MEDEIROS M, 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**. 2016 86:80-82
- VALIZADEH N, VALIAN F, SADEGHIFARD N, et al. The Role of *Peganum harmala* Ethanolic Extract and Type II Toxin Antitoxin System in Biofilm Formation. **Drug research**. 2017;67(7):385-387. doi:10.1055/s-0043-102060.
- VELÁZQUEZ-ACOSTA, CONSUELO, et al. “Cepas E-ESKAPE multidrogorresistentes aisladas en hemocultivos de pacientes con cáncer.” **Salud publica de Mexico** **60.2** (2018): 151-157.
- VILCINSKAS A. The role of epigenetics in host-parasite coevolution: lessons from the model host insects *Galleria mellonella* and *Tribolium castaneum*. **Zoology (Jena)**. 2016 Aug;119(4):273-80.
- VUOTTO C, LONGO F, PASCOLINI C, et al. Biofilm formation and antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* urinary strains. **Journal of applied microbiology**. 2017;123(4):1003-1018. doi:10.1111/jam.13533.v
- WAND M.E; BOCK L.J; TURTON J.F; NUGENT P.G; SUTTON J. M. *Acinetobacter baumannii* virulence is enhanced in *Galleria mellonella* following biofilm adaptation. **J Med Microbiol**. 2012 Apr;61(Pt 4):470-7.
- WANG J, NONG X-H, ZHANG X-Y, et al. Screening of Anti-Biofilm Compounds from Marine-Derived Fungi and the Effects of Secalonic Acid D on *Staphylococcus aureus* Biofilm. **Journal of microbiology and biotechnology**. 2017;27(6):1078-1089. doi:10.4014/jmb.1609.09053.
- WEI WJ, YANG HF. Synergy against extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* *in vitro* by two old antibiotics: colistin and chloramphenicol. **Int J Antimicrob Agents**. 2017 Feb 3. pii: S0924-8579(17)30035-3.
- WEILER, S., & CORTI, N. (2014). Antibiotikatherapie: Wirkung und Resistenz. **Medizinische Klinik, Intensivmedizin und Notfallmedizin**, 109.3, 167-174.
- WOJDA I. Immunity of the greater wax moth *Galleria mellonella*. 2017;243: 342-357.
- WUNDERINK, R. G., & WALLEY, K. R. Update in sepsis and pulmonary infections 2013. **American journal of respiratory and critical care medicine**, (2014). 190.1, 25-31.
- YEUNG, AMY T Y, et al. “Mucin promotes rapid surface motility in *Pseudomonas aeruginosa*.” **mBio** **3.3** (2012): e00073-12.
- YUKSEL, FATMA NESLIHAN, et al. “Does subinhibitory concentrations of clinically important antibiotic induce biofilm production of *Enterococcus faecium* strains?.” **Acta microbiologica et immunologica Hungarica** 65.1 (2018): 27-38.
- ZACARIN, Giuliano G.; GOBBI, Nivar; CHAUD-NETTO, José. Preferência de *Apanteles galleriae* Wilkinson (Hymenoptera: Braconidae) por *Galleria mellonella* (L.) ou *Achroia grisella* (Fabricius) (Lepidoptera: Pyralidae). **Neotrop. Entomol., Londrina** , v. 33, n. 1, p. 65-70, Feb. 2004.