UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Epidemiologia molecular e características genéticas de adaptação de *Pseudomonas aeruginosa* causando infecção crônica em pacientes com Fibrose Cística e sua correlação com dados clínicos

Natália Candido Caçador

Ribeirão Preto

2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Epidemiologia molecular e características genéticas de adaptação de *Pseudomonas aeruginosa* causando infecção crônica em pacientes com Fibrose Cística e sua correlação com dados clínicos

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientada: Natália Candido Caçador

Orientadora: Profª Drª Ana Lúcia da Costa Darini

Ribeirão Preto

2016

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.

Candido Caçador, Natália
Epidemiologia molecular e características genéticas de adaptação de *Pseudomonas aeruginosa* causando infecção crônica em pacientes com Fibrose Cística e sua correlação com dados clínicos. Ribeirão Preto, 2016.

77 p. : il. ; 30cm.
Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.
Orientadora: Darini, Ana Lúcia da Costa.
1. Fibrose cística. 2. *Pseudomonas aeruginosa*. 3.Infecção crônica.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Natália Candido Caçador

Epidemiologia molecular e características genéticas de adaptação de *Pseudomonas aeruginosa* causando infecção crônica em pacientes com Fibrose Cística e sua correlação com dados clínicos

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Profª Drª Ana Lúcia da Costa Darini

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Dedico este trabalho à minha amada família, meus pais Conceição e Ronaldo, meus irmãos Elton e Felipe e meu noivo Getúlio. Obrigada por todo amor e carinho, pela força e companheirismo em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me guardar, iluminar e guiar em todos os momentos da minha vida.

Agradeço aos meus pais, Conceição Candido Caçador e Ronaldo Caçador, por acreditarem em mim e nunca colocarem limites nos meus sonhos. Aos meus irmãos, Elton Candido Caçador e Felipe Candido Caçador, pelo companheirismo de sempre.

Agradeço ao meu amado noivo, Getúlio Guedes de Souza, por toda amizade, amor e compreensão nesses longos anos de distância.

Agradeço às amigas Camila Sayuri Matsumoto, Franciele Przygodda, Fernanda Gomes Cardoso, Letícia Magalhães Arruda e Patrícia Reis por dividirem comigo o árduo caminho da pós-graduação, tornando a jornada mais prazerosa. E ao meu amigo Hudson Caetano Polonini por sempre me socorrer e incentivar nos momentos de dificuldade.

À Profª. Drª. Ana Lúcia da Costa Darini, por acreditar em mim, conceder a oportunidade de trabalhar em seu laboratório e por todos os ensinamentos. Minha enorme gratidão.

À Dra. Lidia Alice Gomes Monteiro Marin Torres, do Ambulatório de Fibrose Cística do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto pelo incansável acompanhamento e discussões sobre os dados clínicos dos pacientes.

Agradeço ao Prof. Dr. Niels Høiby, pela oportunidade de estágio em seu laboratório, supervisão e grande colaboração ao meu crescimento profissional. Sua calma e compreensão fizeram com que a adaptação ao novo ambiente de trabalho fosse fácil. Agradeço também à Profª. Drª. Oana Ciofu pelos ensinamentos e constante discussão dos resultados.

Agradeço às microbiologistas Ulla Rydahl Johansen e Tina Wassermann pela paciência, troca de experiências e acompanhamento constante nos experimentos. Também agradeço à Tina Rathmann por facilitar as burocracias, sempre com um sorriso no rosto.

Agradeço aos pesquisadores da Universidade de Copenhague, Mette Kolpen e Hengzhuang Wang pela parceria e ensinamentos compartilhados.

Aos amigos Wenna Gleyce Nascimento Araújo e Patrick S. Melsted por tornarem meus dias longe de casa mais curtos e prazerosos.

Aos amigos do LEBEM, Anelise Ballaben, Carolina P. C. Capizzani, Joseane Cristina Ferreira, Isabela Araújo, Leonardo Neves de Andrade, Ludmilla Tonani, Renata Galetti, Rubens Eduardo da Silva pela amizade, ótimos momentos, ajudas e sugestões. Com vocês o trabalho em equipe é sempre divertido.

Ao Ambulatório de Fibrose Cística e Laboratório de Microbiologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, por permitirem o acompanhamento das coletas dos espécimes clínicos de pacientes com fibrose cística e por cederem o material clínico para esta pesquisa.

Aos pacientes com fibrose cística atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, por confiarem neste trabalho e manifestarem interesse em participar, assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

À Lucélia Aparecida Pereira, biologista do Laboratório de Microbiologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, pelo apoio e informações fornecidas.

Ao Henrique Theodoro, funcionário do Serviço de Pós-graduação desta Unidade, por todos os serviços prestados.

Agradeço à FAPESP pelo auxílio financeiro ao projeto (Projeto Temático 2014/14494-8), pela bolsa de Doutorado concedida (2013/13358-0) e pela bolsa de estágio no exterior - BEPE (2014/19310-2).

"É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota"

(Theodore Roosevelt)

RESUMO

CAÇADOR, N. C. **Epidemiologia molecular e características genéticas de adaptação de *Pseudomonas aeruginosa* causando infecção crônica em pacientes com Fibrose Cística e sua correlação com dados clínicos. 2016**. 77 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, **2016**.

A infecção crônica das vias aéreas por *Pseudomonas aeruginosa* (PA) é a principal causa de morbidade e mortalidade em pacientes com fibrose cística (FC), devido à contínua degradação do tecido pulmonar, que leva ao declínio da função pulmonar, gerada pela infecção e pelo processo inflamatório. O objetivo do presente estudo foi analisar características genéticas de PA que levam à sua adaptação às vias aéreas destes pacientes com infecção pulmonar crônica, atendidos no Centro de Referência em FC do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP e relacionar com resultados de tipagem molecular, resistência a antibióticos, cronicidade e dados clínicos dos pacientes em acompanhamento clínico no período de julho/2011 a abril/2014. As características genéticas dos isolados investigados englobam pesquisa de 18 genes de virulência e genes do sistema *quorum sensing* (genes *lasR* e *rhlR*), associação entre mutações e conversão para fenótipo mucoide (*operon algTmucABD*) e caracterização de linhagens hipermutantes (genes *mutS* e *mutL*). A identificação de *P. aeruginosa* foi realizada por PCR e MALDI-TOF, que mostraram alta concordância. Foram considerados os dados clínicos dos pacientes: índice de massa corpórea, escore de Shwachman, medidas de capacidade vital forçada e volume expiratório forçado no primeiro segundo. A porcentagem de pacientes com infecção pulmonar crônica por PA observada foi similar aos dados disponíveis na literatura, entretanto, a alta incidência em pacientes jovens foi preocupante. O perfil de macrorrestrição do DNA genômico por PFGE se mostrou útil para definição de colonização crônica/intermitente em associação com critérios clínicos e, juntamente com a detecção de mutações nos genes *mucA* e *mucD* confirmaram transmissão interpacientes. Foi observada alta ocorrência dos genes de fatores de virulência pesquisados para grande maioria dos isolados de pacientes crônicos. A resistência aos antibióticos pesquisados dos isolados de *P. aeruginosa* foi baixa e está de acordo com a literatura nacional e internacional e com a antibioticoterapia adotada no hospital. Não foi observada resistência aos carbapenêmicos e às fluoroquinolonas devido à presença de genes de resistência plasmideais. As mutações no gene *mucA* foram o principal mecanismo de conversão para o fenótipo mucoide e o fenótipo revertente não-mucoide ocorreu principalmente por mutações no gene *algT*. Foram detectadas novas mutações nos genes *mutS* e *mutL* que também suportam a ideia que hipermutação em PA está associada com mutações do sistema *mismatch* de reparo do DNA. O sistema *quorum sensing* dos isolados estudados está parcialmente prejudicado devido às várias mutações no gene *lasR*, mas todos conservam o gene *rhlR* intacto, que sustenta alguma atividade *quorum sensing* envolvida na produção de fatores de virulência importantes. Pacientes com infecção pulmonar crônica por PA com isolamento de outros bacilos gram-negativos não-fermentadores apresentaram maior alteração da função pulmonar quando comparados com pacientes com infecção pulmonar crônica por PA com ou sem isolamento de *Staphylococcus aureus*. As alterações presentes no *operon algTmucABD*, *quorum sensing* e hipermutabilidade contribuem para a cronicidade dos pacientes com FC em relação à infecção por *P. aeruginosa*.

Palavras-chave: Fibrose cística, *Pseudomonas aeruginosa*, infecção crônica.

ABSTRACT

CAÇADOR, N. C. **Molecular epidemiology and adaptive genetic characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* related to chronic infection in patients with Cystic Fibrosis and their correlation with clinical data. 2016**. 77 f. Thesis (Doctoral). School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto – University of São Paulo, Ribeirão Preto, **2016**.

The chronic airway infection by *P. aeruginosa* (PA) is the leading cause of morbidity and mortality in cystic fibrosis (CF) patients, due to continuous degradation of the pulmonary tissue. This leads to decline in lung function, which is generated by the related infection and inflammation. The aim of this study was to analyze genetic characteristics associated with the adaptation of PA to the airways of patients with chronic pulmonary infection attended at the CF Reference Center from the Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP; and to correlate these findings with the results of molecular typing, antibiotic resistance, chronicity and clinical data of patients in clinical follow-up from July/2011 to April/2014. The genetic characteristics of isolates investigated includes the research of 18 virulence genes and the quorum sensing system genes (*lasR* and *rhlR* genes), association between mutations and conversion to the mucoid phenotype (*algTmucABD* operon), and characterization of hypermutable strains (*mutS* and *mutL* genes). Identification of PA was performed by PCR and MALDI-TOF, which showed a high correlation. The patients' clinical data considered were: body mass index, Shwachman score, forced vital capacity measures and forced expiratory volume in one second. The percentage of patients with chronic PA infection observed was similar to the data available in the literature; however, a worrying high incidence in young patients was noticed. The macrorestriction profile of genomic DNA by PFGE proved to be useful to define chronic/intermittent colonization in association with clinical criteria and it confirmed interpatient transmission, in combination with the detection of mutations in the *mucA* and *mucD* genes. High occurrence of virulence genes was detected for the vast majority of isolates from chronic CF patients. Antibiotic resistance for PA isolates was low and is in accordance with national and international literature and antibiotic therapy adopted in the hospital. There was no resistance to carbapenems and fluoroquinolones by the presence of plasmid mediated resistance genes. Mutations in the *mucA* gene were the main mechanism to conversion to mucoidy, and the non-mucoid revertants occurred mainly by mutations in the *algT* gene. New mutations in *mutS* and *mutL* genes were detected, which support the idea that hypermutation in PA is associated with mutations in the DNA mismatch repair system. The quorum sensing system of the isolates is partially damaged due to several mutations in the *lasR* gene, but all isolates maintain an intact *rhlR* gene, which holds some quorum sensing activity with production of important virulence factors. Patients with chronic PA infection with isolation of other non-fermenting gram-negative rods had greater change in lung function compared with patients with chronic PA infection with or without isolation of *Staphylococcus aureus*. The changes presented in the *algTmucABD* operon, quorum sensing and hypermutability contribute to the chronicity of CF patients in relation to infection by *P. aeruginosa*.

Keywords: cystic fibrosis, *Pseudomonas aeruginosa*, chronic infection.

RESUMEN

CAÇADOR, N. C. **Epidemiología molecular y características genéticas de adaptación de *Pseudomonas aeruginosa* causando infección crónica en pacientes con Fibrosis Quística y su correlación con datos clínicos. 2016**. 77 f. Tesis (Doctoral). Facultad de Farmacia de Ribeirão Preto – Universidad de São Paulo, Ribeirão Preto, **2016**.

La infección crónica de las vías aéreas por *P. aeruginosa* (PA) es la principal causa de morbilidad y mortalidad en pacientes con FQ, debido a la continua degradación del tejido pulmonar, que lleva a la disminución de la función pulmonar, generada por la infección y por el proceso inflamatorio. El objetivo del presente estudio fue analizar características genéticas de la PA que llevan a su adaptación a las vías aéreas de estos pacientes con infección pulmonar crónica, atendidos en el Centro de Referencia de FQ del Hospital das Clínicas de la Facultad de Medicina de Ribeirão Preto – USP, y relacionarlas con resultados de tipificación molecular, resistencia a antibióticos, cronicidad y datos clínicos de los pacientes con acompañamiento clínico en el período de julio/2011 a abril/2014. Las características genéticas de los aislados investigados engloban una investigación de 18 genes de virulencia y genes del sistema *quorum sensing* (genes *lasR* y *rhlR*), la asociación entre mutaciones y la conversión al fenotipo mucoide (*operon algTmucABD*), y la caracterización de cepas hipermutantes (genes *mutS* y *mutL*). La identificación de *P. aeruginosa* fue realizada por PCR y MALDI-TOF, que mostraron alta concordancia. Fueron considerados los datos clínicos de los pacientes: índice de masa corporal, puntaje de Shwachman, medidas de capacidad vital forzada y volumen espiratorio forzado en el primer segundo. El porcentaje de pacientes con infección pulmonar crónica por PA observado fue similar al de los datos disponibles en la literatura, sin embargo, la alta incidencia en pacientes jóvenes fue preocupante. El perfil de macro-restricción del ADN genómico por PFGE se mostró útil para la definición de la colonización crónica/intermitente en asociación con criterios clínicos y, junto con la detección de mutaciones en los genes, confirmaron la transmisión entre pacientes. Fue observada una alta ocurrencia de los genes de factores de virulencia investigados en la gran mayoría de pacientes crónicos aislados. La resistencia a los antibióticos investigados de los aislados por *P. aeruginosa* fue baja y está de acuerdo con la literatura nacional e internacional y con la antibióticoterapia adoptada en el hospital. No fue observada resistencia a los carbapenémicos ni a las fluoroquinolonas debido a la presencia de genes de resistencia en plásmidos. Las mutaciones en el gen *mucA* fueron el principal mecanismo de conversión para el fenotipo mucoide; y el fenotipo revertiente no-mucoide ocurrió principalmente por mutaciones en el gen *algT*. Fueron detectadas nuevas mutaciones en los genes *mutS* y *mutL* que también soportan la idea de que la hipermutación en PA está asociada con mutaciones del sistema *mismatch* de reparación del ADN. El sistema *quorum sensing* de los aislados estudiados está parcialmente perjudicado debido a las varias mutaciones en el gen *lasR*, pero todos conservan el gen *rhlR* intacto, lo cual sustenta alguna actividad *quorum sensing* envuelta en la producción de factores de virulencia importantes. Los pacientes con infección pulmonar crónica por PA con aislamiento de otros bacilos gramnegativos no fermentadores presentan mayor alteración de la función pulmonar cuando comparados con pacientes con infección pulmonar crónica por PA con o sin aislamiento de *S. aureus.* Las alteraciones presentes en el *operon algTmucABD*, *quorum sensing* y la hipermutabilidad contribuyen a la cronicidad de los pacientes con FQ en relación con la infección por *P. aeruginosa*.

Palabras-clave: Fibrosis quística, *Pseudomonas aeruginosa*, infección crónica.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração da complexa regulação de produção de alginato 5

Figura 2. Perfil de não-sensibilidade aos antimicrobianos testados 24

Figura 3. Presença de genes relacionados com fatores de virulência 25

Figura 4. Diferentes morfotipos de alginato em isolados de *P. aeruginosa* 28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Pares de *primers* utilizados para pesquisa de genes de resistência aos carbapenêmicos e quinolonas 14

Tabela 2. Pares de *primers* utilizados na detecção de genes de virulência 15

Tabela 3. Distribuição por faixa etária dos pacientes e isolamento de *P. aeruginosa* em amostras de escarro 22

Tabela 4. Dados clínicos de 31 pacientes com infecção crônica por *P. aeruginosa*, dados bacteriológicos e epidemiológicos dos isolados de *P. aeruginosa* 23

Tabela 5. Mutações e alterações ocorridas na sequência do gene *mucA* em isolados mucoides e não-mucoides de *P. aeruginosa* provenientes de 40 pacientes com FC 29

Tabela 6. Mutações e alterações ocorridas na sequência dos genes *mucB* e *mucD* nos 19 isolados de *P. aeruginosa* classificados como tipo IV de produção de alginato .. 30

Tabela 7. Mutações e alterações ocorridas na sequência do gene *algT* em isolados mucoides e não-mucoides de *P. aeruginosa* provenientes de 40 pacientes com FC 31

Tabela 8. Mutações e respectivas alterações determinadas na sequência do gene *lasR* em isolados mucoides e não-mucoides de *P. aeruginosa* 31

Tabela 9. Determinação da CIM de 9 antimicrobianos para isolados de *P. aeruginosa* 32

Tabela 10. Mutações e alterações ocorridas nos genes *mutS* e *mutL* de isolados de *P. aeruginosa* com fenótipo hipermutável 34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

USP	Universidade de São Paulo
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
HCFMRP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
LEBEM	Laboratório Especial de Bacteriologia e Epidemiologia Molecular
A	Adenina
Ala	Alanina
AMK	Amicacina
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Ácido aspártico
ATCC	*American Type Culture Collection*
ATM	Aztreonam
BGN-NF	Bacilo gram-negativo não-fermentador
BHI	*Brain Heart Infusion*
C	Citosina
CAZ	Ceftazidima
CBc	Complexo *Burkholderia cepacia*
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CFTR	*Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator*
CIM	Concentração inibitória mínima
CIP	Ciprofloxacina
Cl^-	Íons cloro (cloreto)
CLSI	*Clinical and Laboratory Standards Institute*
CVF	Capacidade vital forçada

Cys	Cisteína
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxiribonucleotídeo tri-fosfato
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ES	EDTA sarcosil
FC	Fibrose Cística
FEP	Cefepima
G	Guanina
GEN	Gentamicina
Gln	Glutamina
Glu	Ácido glutâmico
Gly	Glicina
HCl	Cloreto de hidrogênio
His	Histidina
Hp	Hipermutável, frequência de mutação fortemente aumentada
I	Resistência intermediária
Ile	Isoleucina
IMC	Índice de massa corpórea
IMI	Imipenem
KCl	Cloreto de Potássio
LB	Luria Bertani
Leu	Leucina
LEV	Levofloxacina
LPS	Lipopolissacarídeo
Lys	Lisina
M	Mucoide

MALDI-TOF	*Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight*
MDR	*multidrug-resistant*
MEM	Meropenem
Met	Metionina
mg	Miligrama(s)
$MgCl_2$	Cloreto de magnésio
mL	Mililitro(s)
MLST	*Multi-Locus Sequence Typing*
mM	Milimolar
MMR	*Mismatch-repair system*
Na^+	Íons sódio
NaCl	Cloreto de sódio
ng	Nanograma(s)
nHp	frequência de mutação não aumentada
nm	Nanômetro
NM	Não-mucoide
PA	*P. aeruginosa*
PAB	*Pseudomonas* ágar base
pb	Pares de bases
PCR	*Polymerase chain reaction*
PFGE	*Pulsed-field gel electrophoresis*
pH	Potencial de hidrogênio
Phe	Fenilalanina
PIA	*Pseudomonas isolation agar*
PIV	Tris NaCl
pmol	Picomol

PMQR	*Plasmid-Mediated Quinolone Resistance*
Pro	Prolina
q.s.p.	Quantidade suficiente para
R	Resistente
rDNA	Ácido desoxirribonucleico ribossômico
Ser	Serina
SS	Escore de Shwachman
T	Timina
Taq	*Thermus aquaticus*
TBE	Tris borato EDTA
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Thr	Treonina
TIC	Ticarcilina ácido-clavulânico
TOB	Tobramicina
Tyr	Tirosina
TZP	Piperacilina-tazobactam
U	Unidade
UFC	Unidade(s) formadora(s) de colônia
Val	Valina
VEF_1	Volume expiratório forçado no primeiro segundo
wHp	frequência de mutação fracamente aumentada

LISTA DE SÍMBOLOS

µg	Micrograma(s)
®	Marca Registrada
β	Beta
X	Vezes
ºC	Graus Centígrados
µL	Microlitro(s)
%	Porcentagem
g	Força centrífuga relativa
M	Molar

SUMÁRIO

Resumo i
Abstract ii
Resumen iii
Lista de Figuras iv
Lista de Tabelas v
Lista de Abreviaturas e Siglas vi
Lista de Símbolos x

1. INTRODUÇÃO 1
1.1. Fibrose cística 1
1.2. Fibrose cística e *Pseudomonas aeruginosa* 2
1.3. Infecção crônica por *P. aeruginosa* e o fenótipo mucoide..... 4
1.4. Fenótipo bacteriano hipermutante 6
1.5. Fatores de virulência em *Pseudomonas aeruginosa* 6

2. OBJETIVOS 8
2.1. Objetivo geral 9
2.2. Objetivos específicos 9

3. MATERIAL E MÉTODOS 10
Parte I 11
3.1. Pacientes e dados clínicos..... 11
3.1.1. Critério de infecção crônica 12
3.2. Isolados bacterianos 12
3.2.1. Identificação dos isolados 13
3.3. Testes de sensibilidade aos antimicrobianos 13
3.4. Investigação de genes de resistência 14
3.5. Pesquisa de genes de virulência 15
3.6. Eletroforese em campo pulsado 16
3.7. Análise estatística 17
Parte II 17
3.8. Identificação dos isolados por espectrometria de masssa MALDI-TOF 18
3.9. Investigação dos fenótipos de produção de alginato 18
3.10. Análise da sequência do *operon algTmucABD* 19
3.11. Determinação da concentração inibitória mínima 19
3.12. Investigação de mutabilidade 20
3.12.1. Frequência de mutação 20
3.12.2. Sequenciamento de genes anti-mutação 20
3.13. Sequenciamento de genes do sistema *quorum sensing* 20

4. RESULTADOS 21
Parte I **22**
4.1. Pacientes e isolados bacterianos 22
4.2. Sensibilidade aos antimicrobianos e genes de resistência 24
4.3. Genes relacionados com fatores de virulência 25

4.4. Similaridade genômica dos isolados 26
Parte II 26
4.5. Identificação dos isolados bacterianos 26
4.6. Distribuição em diferentes fenótipos de produção de alginato 26
4.7. Mutações no *operon algTmucABD* 29
4.8. Alterações genéticas nos genes *lasR* e *rhlR* 31
4.9. Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos 32
4.10. Frequência de mutação dos isolados de *P. aeruginosa* e sequências de genes anti-mutação 34

5. DISCUSSÃO 35

6. CONCLUSÕES..... 48

7. REFERÊNCIAS 51

APÊNDICES 59

ANEXOS 71

1. INTRODUÇÃO

1.1. Fibrose cística

Fibrose cística (FC) é uma doença hereditária autossômica recessiva que acomete principalmente a população de raça branca. Trata-se de uma doença com baixa taxa de sobrevida, na qual somente metade dos pacientes sobrevive até a terceira década de vida. Ela ocorre devido a mutações no gene *cftr* (do inglês *Cystic Fibrosis Transmembrane condutance Regulator*), que leva à codificação de proteína CFTR modificada ou até mesmo à sua ausência. A proteína CFTR é responsável pelo efluxo de cloreto (Cl^-), sódio (Na^+) e água através da membrana celular, e consequentemente, responsável pela manutenção do equilíbrio iônico e osmótico da célula. Alterações em sua atividade, por mutação levam à disfunção das glândulas de secreção exócrina, caracterizando a doença como crônica, complexa e grave, pois compromete os sistemas digestivo, respiratório e reprodutor (ANTUNES, 2009; RODRIGUES et al., 2008). Apesar das manifestações clínicas da doença serem variáveis, 80 a 95% dos pacientes sucumbem devido à insuficiência respiratória (LYCZAK; CANNON; PIER, 2002).

Em condições normais de saúde, a superfície das vias aéreas é coberta por uma fina película de líquido, chamado fluído periciliar, que desempenha papel fundamental na depuração mucociliar. O fluído periciliar também está envolvido na captura e remoção de patógenos inalados sem desencadear resposta imunológica inata. Nos pulmões de pacientes com FC, este fluído é mais fino do que em condições normais e desidrata como resultado da função CFTR deficiente. O cloreto não é eliminado e para compensar esse excesso e manter o equilíbrio iônico a célula absorve sódio e água, levando à desidratação da superfície celular. Isto resulta na secreção de muco mais espesso do que em indivíduos normais e uma drástica diminuição na sua remoção, que podem facilitar colonização/infecção bacteriana crônica e também inflamação. Consequentemente, ocorre um ciclo vicioso de retenção de muco, infecção e inflamação. Os sintomas respiratórios mais comuns em pacientes com FC são devidos à deterioração progressiva da função pulmonar por infecções patogênicas crônicas, principalmente por *Pseudomonas aeruginosa* com fenótipo mucoide (CANTON; DEL CAMPO, 2010; RATJEN, 2009).

1.2. Fibrose cística e *Pseudomonas aeruginosa*

Os microrganismos que mais acometem as vias aéreas dos pacientes com FC são *Staphylococcus aureus*, *P. aeruginosa* e bactérias do Complexo *Burkholderia cepacia* (CBc). Outros microrganismos também têm sido isolados destes pacientes, são os chamados patógenos

emergentes (oportunistas), mas a importância clínica destes isolados ainda está sendo investigada (LYCZAK et al., 2002). Os pacientes mais jovens (até a primeira década de vida) costumam ter infecções causadas por *S. aureus, Haemophilus influenzae* e, ocasionalmente, por *P. aeruginosa*. Quando os pacientes atingem a adolescência, *P. aeruginosa* passam a ser mais frequentes como agentes de infecção nestes pacientes. As infecções por *P. aeruginosa* podem se tornar crônicas, principalmente devido ao fenótipo mucoide, que ocorre pela produção de cápsula polissacarídica (alginato mucoide) que protege a bactéria da fagocitose e ação de antibióticos, podendo ainda fixá-la às superfícies celulares, sobretudo em pacientes com FC (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009; ZOCCOLI et al., 2009). A infecção crônica das vias aéreas por *P. aeruginosa* é a principal causa de morbidade e mortalidade em pacientes com FC, devido à contínua degradação do tecido pulmonar, que leva ao declínio da função pulmonar, devido em parte pela infecção e em parte pelo processo inflamatório gerado (BURMOLLE et al., 2010).

Com o intuído de eliminar *P. aeruginosa* não-mucoide e evitar (ou adiar) a transição para o fenótipo mucoide, o uso prolongado de antibióticos é inevitável. No entanto, o uso contínuo destas drogas, pode selecionar naturalmente bactérias resistentes (MARTHA et al., 2010). *P. aeruginosa* possui notável resistência intrínseca a diversas classes de antimicrobianos, restringindo as opções de antibioticoterapia. Em adição a esta característica, mutações em genes conferindo fenótipo de resistência e aquisição horizontal de genes de resistência carreados por plasmídeos têm contribuído amplamente para a seleção de *P. aeruginosa* multirresistentes. Os principais mecanismos de resistência desta bactéria são: (i) alteração na permeabilidade da membrana externa que dificulta ou impede a entrada do antibiótico na célula, (ii) hiperexpressão de sistemas de efluxo que excretam o antibiótico do interior para o exterior da célula, (iii) alteração do sítio alvo que dificulta ou impede a ligação do antibiótico e (iv) produção de enzimas que degradam ou inativam o antibiótico, como por exemplo as β-lactamases, que degradam antibióticos β-lactâmicos (HENRY; SPEERT, 2011; NORMARK; NORMARK, 2002). As carbapenemases constituem o grupo mais versátil de β-lactamases, tendo capacidade de hidrolisar praticamente todos os antibióticos β-lactâmicos, com destaque para a classe dos carbapenêmicos (QUEENAN; BUSH, 2007). A resistência às quinolonas em *P. aeruginosa* é normalmente causada por mutações cromossômicas e por hiperexpressão de sistemas de efluxo. Atualmente, genes de resistência às quinolonas mediados por plasmídeos têm sido crescentemente reportados em enterobactérias. A pesquisa desses genes em *Pseudomonas* tem

sido pouco realizada e/ou relatada, merecendo maior atenção, pois, a ampla utilização do antibiótico ciprofloxacina (fluoroquinolona) no tratamento de infecções por esta bactéria contribuiria para a seleção desses determinantes de resistência (COBAN et al., 2011).

1.3. Infecção crônica por *P. aeruginosa* e o fenótipo mucoide

O início da infecção crônica das vias aéreas por *P. aeruginosa* em pacientes com FC é geralmente precedido por um período de recorrente colonização intermitente das vias aéreas, na maioria das vezes por linhagens ambientais (FOLKESSON et al., 2012). Durante a infecção pulmonar crônica, *P. aeruginosa* é capaz de persistir e sobreviver por décadas sob pressão seletiva imposta por resposta inflamatória oscilante, exposição contínua à antibióticos e disponibilidade variável de nutrientes. Isto é devido principalmente a um modo de crescimento em biofilme com contribuições de fatores de virulência, tais como alginato, e evolução adaptativa mediada por variação genética. As condições de estresse encontradas por *P. aeruginosa* levam a mutações nos genes reguladores globais, como *mucA* e *lasR*, e essas linhagens acabam sendo selecionadas durante a fase de adaptação (BJARNSHOLT; JENSEN; et al., 2010; FOLKESSON et al., 2012; YANG et al., 2011).

Tem sido demonstrado que estas condições de estresse, que ocorrem nos pulmões de fibrocísticos, podem afetar a produção de alginato. Uma vez que a bactéria se torna mucoide é muito difícil erradicar a infecção, devido ao modo de crescimento em biofilme (BJARNSHOLT; TOLKER-NIELSEN; et al., 2010; BURMOLLE et al., 2010). Clinicamente, a presença do fenótipo mucoide está associada a um pior prognóstico, devido à deterioração progressiva da função pulmonar (CANTON; DEL CAMPO, 2010). A principal característica do fenótipo mucoide é a produção do exopolissacarídeo alginato, uma camada espessa de mucopolissacarídeo. Isolados mucoides e não-mucoides de pacientes com FC têm mostrado grande heterogeneidade fenotípica, incluindo morfologia da colônia, resistência aos antibióticos e capacidade de formação de biofilme (CIOFU et al., 2008).

Para melhor compreensão da formação de biofilme é importante ressaltar que o *operon* de biossíntese do alginato está sob o controle do promotor *algD*, o qual é controlado por genes de vários *loci* (Figura 1). Uma proteína importante na regulação *algD* é AlgT (também conhecida como AlgU ou σ^{22}), o fator sigma alternativo, que induz a expressão *algD* e aumenta a expressão de proteínas reguladoras que aumentam a transcrição de *algD* (WOOD; OHMAN, 2015). O gene *algT* pertence a um *operon* com quatro outros genes, *mucABCD*. Mutações em

mucA, *mucB* ou *mucD* podem levar à conversão para o fenótipo mucoide, sugerindo que os produtos destes genes têm efeito regulador negativo sobre *algT* (CIOFU et al., 2008; SAUTTER et al., 2012). Os isolados com mutações em *mucA* apresentam fenótipo altamente mucoide, enquanto mutantes em *mucB* ou *mucD* são levemente mucoides e apresentam produção de alginato durante crescimento em meios específicos, com indutores de alginato (BOUCHER et al., 1996; MATHEE; MCPHERSON; OHMAN, 1997).

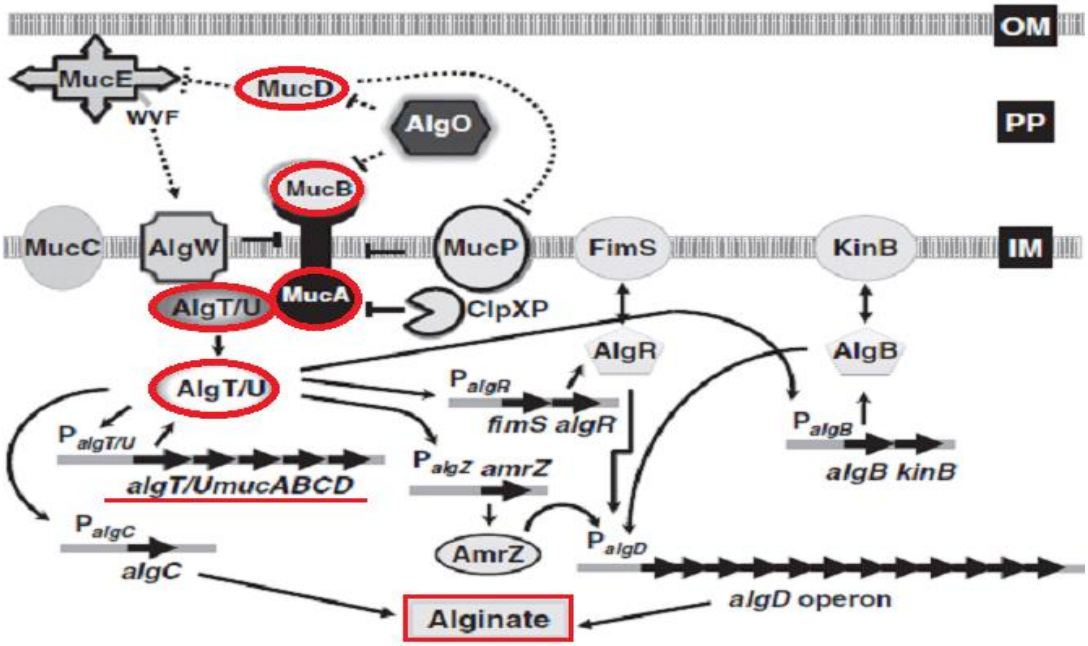

Figura 1. Ilustração da complexa regulação de produção de alginato. Resumidamente: A produção de alginato é controlada pelo *operon algD*. A expressão de *algD* é regulada por AlgR, AlgB, AmrZ e fator sigma AlgT/U. A atividade de AlgT é inibida por MucB, MucD e pelo fator antissigma MucA. A atividade de MucA é regulada por MucD (entre outras proteases). Em uma linhagem com mutação em *mucA*, como PDO300 (PAO*mucA*22), a inibição de AlgT por MucA, MucB e MucD é removida. AlgT livre ativa todos os genes no *regulon alg*: *operons fimS-algR*, *algB-kinB*, *amrZ*/*algZ* e *algD*, inclusive a si mesmo. Fonte: SAUTTER et al., 2012.

Em adição à produção de alginato, AlgT regula grande número de resposta ao estresse e genes associados à virulência e, também, está envolvida na regulação da motilidade em *P. aeruginosa* (FOLKESSON et al., 2012). Portanto, quando AlgT não é controlada, ou seja, está em excesso, representa vantagem seletiva à bactéria e aparenta ser vital para que esta seja capaz de persistir em pacientes com FC com infecção crônica (SCHURR et al., 1994). No entanto, é comum observar *P. aeruginosa* mucoide em co-infecções com revertentes, isolados não-mucoides que contêm mutação em *mucA*. Os revertentes podem ocorrer por mutações secundárias em *algT* ou em outros genes reguladores do alginato (CIOFU et al., 2008).

1.4. Fenótipo bacteriano hipermutante

Considera-se que a hipermutabilidade desempenha papel importante na evolução adaptativa das bactérias, em particular em doenças infecciosas. O acúmulo de mutações leva a alterações fenotípicas em isolados de pacientes com FC, como aumento da produção de alginato e ocorrência do fenótipo mucoide, perda de motilidade, perda do sistema *quorum sensing*, redução da virulência, capacidade reduzida de formação de biofilme *in vitro* e aumento da resistência aos antibióticos (CIOFU et al., 2010; CIOFU et al., 2005).

Um dos mecanismos mais importantes de reparo do DNA em bactérias é o sistema MMR (do inglês, *mismatch-repair system*), que inclui os genes *mutS* e *mutL*. A inativação deste sistema conduz ao aumento da taxa de mutação, devido à sua incapacidade para reparar erros no pareamento de bases nucleotídicas de forma eficiente. A remoção do sistema MMR aumenta a frequência de transferência horizontal de genes, mecanismo importante de aquisição de resistência aos antibióticos em bactérias (LUTZ, L. et al., 2013; OLIVER, 2000). Estudos têm mostrado que a prevalência de *P. aeruginosa* hipermutantes aumenta com a persistência da infecção crônica devido à seleção positiva de mutantes nos pulmões destes pacientes (CIOFU et al., 2005; MENA et al., 2008).

A inativação do sistema MMR também favorece o aparecimento *in vitro* de variantes fenotípicas consideradas marcadores típicos de infecção nos pulmões de pacientes com FC, como o fenótipo mucoide, devido a mutações no gene *mucA* e perda de sistema *quorum sensing*, devido a mutações nos genes *las* e *rhl* (BJARNSHOLT; JENSEN; et al., 2010; CIOFU et al., 2010).

1.5. Fatores de virulência em *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa pode sobreviver nos pulmões de pacientes fibrocísticos por anos e sofrer diversas adaptações para este ambiente, incluindo características de virulência citadas abaixo e a conversão para fenótipo mucoide (WILLIAMS; DEHNBOSTEL; BLACKWELL, 2010).

Fatores de superfície bacterianos como lipopolissacarídeo (LPS), pili e flagelo, assim como processos ativos como *quorum sensing*, formação de biofilme e secreção de toxinas (exotoxinas e citotoxinas) são determinantes de virulência que causam impacto nas infecções. A interação desses determinantes com o sistema imune do hospedeiro controla a sinalização de

moléculas, modula a resposta do hospedeiro, o que impacta na gravidade da doença devido à influência na taxa de depuração bacteriana e por causar dano colateral aos tecidos do hospedeiro. Outros fatores de virulência também são secretados, como piocianinas (pigmentos), proteases (elastases, por exemplo) e fosfolipases não específicas (VEESENMEYER et al., 2009).

Os fatores de virulência são requeridos nas infecções agudas, no entanto, durante as infecções crônicas eles podem sofrer mutações ou regulação. A explicação para este fato é, presumivelmente, a evasão da resposta imune do hospedeiro, pois este reconhece diversos fatores de virulência e tenta eliminar as células que os produzem, selecionando, portanto, as células que possuem mutações nos fatores ou reguladores de virulência, ou ainda, que simplesmente regulam a expressão destes fatores (SMITH et al., 2006).

Presença de genes que determinam fatores de virulência, presença de mutações que afetam a biossíntese, expressão e/ou regulação gênica e tipagem pela análise de macrorrestrição do DNA genômico, fornecem dados que englobam a epidemiologia molecular bacteriana e contribuem grandemente para a qualidade da análise da variabilidade genética dos isolados.

6. CONCLUSÕES

- As técnicas de PCR e MALDI-TOF, utilizadas para de identificação de *P. aeruginosa*, apresentaram alta concordância;
- A porcentagem de pacientes fibrocísticos com infecção pulmonar crônica por *P. aeruginosa* observada neste estudo é similar aos dados disponíveis na literatura, entretanto, a alta incidência em pacientes jovens merece atenção dos clínicos;
- Tipagem molecular por PFGE se mostrou útil para definição de infecção crônica/intermitente em associação com critérios clínicos;
- Linhagens idênticas ou altamente relacionadas em pacientes não relacionados por parentesco pode ser explicada por possível transmissão de linhagens bacterianas entre pacientes em alguma ocasião de contato ou por exposição a fontes comuns;
- Foi observada alta ocorrência dos genes de fatores de virulência pesquisados para grande maioria dos isolados de pacientes crônicos;
- Perfil de resistência aos antibióticos pesquisados dos isolados de *P. aeruginosa* foi baixo e está de acordo com as literaturas nacional e internacional e com a antibioticoterapia adotada no hospital;
- A resistência ao imipenem e meropenem observada nos isolados não ocorre pela produção de carbapenemases e a resistência às fluoroquinolonas (ciprofloxacina e levofloxacina) não se dá pela presença de genes de resistência plasmideais, mas é importante monitorar estes mecanismos de resistência na população com FC;
- Nos pares de isolados NM e M de pacientes deste estudo, as mutações no gene *mucA* foram o principal mecanismo de conversão para o fenótipo mucoide; o mesmo foi observado nos isolados de pacientes que só apresentaram o fenótipo mucoide. Um dos fatores que explicam o fenótipo revertente NM destes pacientes foram as mutações encontradas no gene *algT*, resultados semelhantes aos encontrados em isolados de pacientes com FC da Escandinávia;
- O perfil de macrorrestrição do DNA genômico e mutações nos genes *mucA* e *mucD* confirmaram transmissão interpacientes;
- Foram detectadas novas mutações nos genes *mutS* e *mutL* que também suportam a ideia que hipermutação em *P. aeruginosa* está associada com mutações do sistema *mismatch* de reparo do DNA;
- O sistema *quorum sensing* dos isolados estudados está parcialmente prejudicado, devido às várias mutações no gene *lasR*, mas todos os isolados conservam o gene *rhlR* intacto, que

sustenta alguma atividade *quorum sensing* com produção de fatores de virulência importantes;

- Pacientes com infecção crônica por *P. aeruginosa* com isolamento de outros BGN-NF apresentam maior alteração da função pulmonar do que pacientes com infecção crônica por *P. aeruginosa* com ou sem isolamento de *S. aureus* concomitante;
- As alterações presentes no *operon algTmucABD*, *quorum sensing* e hipermutabilidade contribuem para a cronicidade dos pacientes com FC em relação à infecção por *P. aeruginosa*.

7. REFERÊNCIAS[1]

[1] As referências foram apresentadas de acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) NBR 6023 e organizadas pelo programa EndNote X7.

ANTHONY, M. et al. Genetic Analysis of Pseudomonas aeruginosa Isolates from the Sputa of Australian Adult Cystic Fibrosis Patients. **J Clin Microbiol,** v. 40, n. 8, p. 2772-2778, 2002.

ANTUNES, E. T. Epidemiologia. In: NETO, N. L. (Ed.). **Fibrose cística: enfoque multidisciplinar**. 2. Florianópolis, 2009. cap. 1, p.688.

BAUDRY, P. J. et al. Mechanisms of resistance and mobility among multidrug-resistant CTX-M-producing Escherichia coli from Canadian intensive care units: the 1st report of QepA in North America. **Diagn Microbiol Infect Dis,** v. 63, n. 3, p. 319-26, Mar 2009.

BILTON, D. et al. Pulmonary exacerbation: towards a definition for use in clinical trials. Report from the EuroCareCF Working Group on outcome parameters in clinical trials. **J Cyst Fibros,** v. 10 Suppl 2, p. S79-81, Jun 2011.

BJARNSHOLT, T. et al. Pseudomonas aeruginosa biofilms in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. **Pediatr Pulmonol,** v. 44, n. 6, p. 547-58, Jun 2009.

BJARNSHOLT, T. et al. Quorum sensing and virulence of Pseudomonas aeruginosa during lung infection of cystic fibrosis patients. **PLoS One,** v. 5, n. 4, p. e10115, 2010.

BJARNSHOLT, T. et al. Interference of Pseudomonas aeruginosa signalling and biofilm formation for infection control. **Expert Rev Mol Med,** v. 12, p. e11, 2010.

BOLANO, A. et al. Rapid methods to extract DNA and RNA from Cryptococcus neoformans. **FEMS Yeast Res,** v. 1, n. 3, p. 221-4, Dec 2001.

BOUCHER, J. C. et al. Two distinct loci affecting conversion to mucoidy in Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis encode homologs of the serine protease HtrA. **J Bacteriol,** v. 178, n. 2, p. 511-23, Jan 1996.

BOUCHER, J. C. et al. Mucoid Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis: characterization of muc mutations in clinical isolates and analysis of clearance in a mouse model of respiratory infection. **Infect Immun,** v. 65, n. 9, p. 3838-46, Sep 1997.

BRADBURY, R. S. et al. Virulence gene distribution in clinical, nosocomial and environmental isolates of Pseudomonas aeruginosa. **J Med Microbiol,** v. 59, n. Pt 8, p. 881-90, Aug 2010.

BRAGONZI, A. et al. Sequence diversity of the mucABD locus in Pseudomonas aeruginosa isolates from patients with cystic fibrosis. **Microbiology,** v. 152, n. Pt 11, p. 3261-9, Nov 2006.

BURMOLLE, M. et al. Biofilms in chronic infections - a matter of opportunity - monospecies biofilms in multispecies infections. **FEMS Immunol Med Microbiol,** v. 59, n. 3, p. 324-36, Aug 2010.

CANTON, R. et al. Antimicrobial therapy for pulmonary pathogenic colonisation and infection by Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis patients. **Clin Microbiol Infect,** v. 11, n. 9, p. 690-703, Sep 2005.

CANTON, R.; DEL CAMPO, R. Cystic fibrosis: deciphering the complexity. **Clin Microbiol Infect,** v. 16, n. 7, p. 793-7, Jul 2010.

CARDOSO, O.; ALVES, A. F.; LEITAO, R. Metallo-beta-lactamase VIM-2 in Pseudomonas aeruginosa isolates from a cystic fibrosis patient. **Int J Antimicrob Agents,** v. 31, n. 4, p. 375-9, Apr 2008.

CATTOIR, V. et al. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance qnr genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. **J Antimicrob Chemother,** v. 60, n. 2, p. 394-7, Aug 2007.

CAVALLO, J. D. et al. Mechanisms of beta-lactam resistance in Pseudomonas aeruginosa: prevalence of OprM-overproducing strains in a French multicentre study (1997). **J Antimicrob Chemother,** v. 50, n. 6, p. 1039-43, Dec 2002.

CIOFU, O. et al. Investigation of the algT operon sequence in mucoid and non-mucoid Pseudomonas aeruginosa isolates from 115 Scandinavian patients with cystic fibrosis and in 88 in vitro non-mucoid revertants. **Microbiology,** v. 154, n. Pt 1, p. 103-13, Jan 2008.

CIOFU, O. et al. Genetic adaptation of Pseudomonas aeruginosa during chronic lung infection of patients with cystic fibrosis: strong and weak mutators with heterogeneous genetic backgrounds emerge in mucA and/or lasR mutants. **Microbiology,** v. 156, n. Pt 4, p. 1108-19, Apr 2010.

CIOFU, O. et al. Phenotypes selected during chronic lung infection in cystic fibrosis patients: implications for the treatment of Pseudomonas aeruginosa biofilm infections. **FEMS Immunol Med Microbiol,** v. 65, n. 2, p. 215-25, Jul 2012.

CIOFU, O. et al. Occurrence of hypermutable Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis patients is associated with the oxidative stress caused by chronic lung inflammation. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 49, n. 6, p. 2276-82, Jun 2005.

CLIMACO, E. C. Análise molecular de mecanismos determinantes de resistência a antibióticos em Pseudomonas aeruginosa e Acinetobacter spp.. 08/07/2011. 77f. Tese (Doutorado em Ciências). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2011.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Doc M100-S23, v. 33, n. 1,. 2013.

COBAN, A. Y. et al. [Investigation of plasmid-mediated quinolone resistance in Pseudomonas aeruginosa strains isolated from cystic fibrosis patients]. **Mikrobiyol Bul,** v. 45, n. 4, p. 602-8, Oct 2011.

CYSTIC FIBROSIS TRUST. 2012. Disponível em: < http://www.cysticfibrosis.org.uk/ >.

DA SILVA FILHO, L. V. et al. Molecular epidemiology of Pseudomonas aeruginosa infections in a cystic fibrosis outpatient clinic. **J Med Microbiol,** v. 50, n. 3, p. 261-7, Mar 2001.

DE BAETS, F. et al. Achromobacter xylosoxidans in cystic fibrosis: prevalence and clinical relevance. **J Cyst Fibros,** v. 6, n. 1, p. 75-8, Jan 2007.

DETTMAN, J. R. et al. Evolutionary genomics of epidemic and nonepidemic strains of Pseudomonas aeruginosa. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 110, n. 52, p. 21065-70, Dec 24 2013.

DEVRIES, C. A.; OHMAN, D. E. Mucoid-to-nonmucoid conversion in alginate-producing Pseudomonas aeruginosa often results from spontaneous mutations in algT, encoding a putative alternate sigma factor, and shows evidence for autoregulation. **J Bacteriol,** v. 176, n. 21, p. 6677-87, Nov 1994.

DORING, G. et al. Distribution and transmission of Pseudomonas aeruginosa and Burkholderia cepacia in a hospital ward. **Pediatr Pulmonol,** v. 21, n. 2, p. 90-100, Feb 1996.

ELLINGTON, M. J. et al. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo-beta-lactamases. **J Antimicrob Chemother,** v. 59, n. 2, p. 321-2, Feb 2007.

FELIZIANI, S. et al. Mucoidy, quorum sensing, mismatch repair and antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa from cystic fibrosis chronic airways infections. **PLoS One,** v. 5, n. 9, 2010.

FERNANDEZ-OLMOS, A. et al. Population structure and antimicrobial susceptibility of both nonpersistent and persistent Pseudomonas aeruginosa isolates recovered from cystic fibrosis patients. **J Clin Microbiol,** v. 51, n. 8, p. 2761-5, Aug 2013.

FERREIRA, A. G. et al. Low-level resistance and clonal diversity of Pseudomonas aeruginosa among chronically colonized cystic fibrosis patients. **Apmis,** v. 123, n. 12, p. 1061-8, Dec 2015.

FINNAN, S. et al. Genome diversity of Pseudomonas aeruginosa isolates from cystic fibrosis patients and the hospital environment. **J Clin Microbiol,** v. 42, n. 12, p. 5783-92, Dec 2004.

FOLKESSON, A. et al. Adaptation of Pseudomonas aeruginosa to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. **Nat Rev Microbiol,** v. 10, n. 12, p. 841-51, Dec 2012.

FUGERE, A. et al. Interspecific small molecule interactions between clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus from adult cystic fibrosis patients. **PLoS One,** v. 9, n. 1, p. e86705, 2014.

GAUTOM, R. K. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of Escherichia coli O157:H7 and other gram-negative organisms in 1 day. **J Clin Microbiol,** v. 35, n. 11, p. 2977-80, Nov 1997.

GIBSON, L. E.; COOKE, R. E. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. **Pediatrics,** v. 23, n. 3, p. 545-9, Mar 1959.

HANSEN, C. R. et al. Inflammation in Achromobacter xylosoxidans infected cystic fibrosis patients. **J Cyst Fibros,** v. 9, n. 1, p. 51-8, Jan 2010.

HENRY, D. A.; SPEERT, D. P. *Pseudomonas*. In: VERSALOVIC, J.;CARROLL, K. C*., et al* (Ed.). **Manual of Clinical Microbiology**, 2011.

HUBERT, D. et al. Association between Staphylococcus aureus alone or combined with Pseudomonas aeruginosa and the clinical condition of patients with cystic fibrosis. **J Cyst Fibros,** v. 12, n. 5, p. 497-503, Sep 2013.

JOHANSEN, H. K. et al. Colonisation and infection of the paranasal sinuses in cystic fibrosis patients is accompanied by a reduced PMN response. **J Cyst Fibros,** v. 11, n. 6, p. 525-31, Dec 2012.

JORGENSEN, K. M. et al. Diversity of metabolic profiles of cystic fibrosis Pseudomonas aeruginosa during the early stages of lung infection. **Microbiology,** v. 161, n. 7, p. 1447-62, Jul 2015.

LANOTTE, P. et al. Genetic features of Pseudomonas aeruginosa isolates from cystic fibrosis patients compared with those of isolates from other origins. **J Med Microbiol,** v. 53, n. Pt 1, p. 73-81, Jan 2004.

LARTIGUE, M. F. et al. Identification of Streptococcus agalactiae isolates from various phylogenetic lineages by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **J Clin Microbiol,** v. 47, n. 7, p. 2284-7, Jul 2009.

LEE, T. W. R. et al. Reduction in prevalence of chronic Pseudomonas aeruginosa infection at a regional pediatric cystic fibrosis center. **Pediatric Pulmonology,** v. 37, n. 2, p. 104-110, 2004.

LOPES, A. J. et al. Is the type of chronic pulmonary infection a determinant of lung function outcomes in adult patients with cystic fibrosis? **Monaldi Arch Chest Dis,** v. 77, n. 3-4, p. 122-8, Sep-Dec 2012.

LUTZ, J. K.; LEE, J. Prevalence and antimicrobial-resistance of Pseudomonas aeruginosa in swimming pools and hot tubs. **Int J Environ Res Public Health,** v. 8, n. 2, p. 554-64, Feb 2011.

LUTZ, L. et al. Hypermutable Pseudomonas aeruginosa in Cystic fibrosis patients from two Brazilian cities. **J Clin Microbiol,** v. 51, n. 3, p. 927-30, Mar 2013.

LYCZAK, J. B.; CANNON, C. L.; PIER, G. B. Lung Infections Associated with Cystic Fibrosis. **Clin Microbiol Rev,** v. 15, n. 2, p. 194-222, 2002.

MAGIORAKOS, A. P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clin Microbiol Infect,** v. 18, n. 3, p. 268-81, Mar 2012.

MAHENTHIRALINGAM, E. Emerging cystic fibrosis pathogens and the microbiome. **Paediatr Respir Rev,** v. 15 Suppl 1, p. 13-5, Jun 2014.

MARTHA, B. et al. Factors associated with mucoid transition of Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis patients. **Clin Microbiol Infect,** v. 16, n. 6, p. 617-23, Jun 2010.

MARTINS, V. V. et al. Pathogenic potential and genetic diversity of environmental and clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa. **APMIS,** v. 122, n. 2, p. 92-100, Feb 2014.

MARVIG, R. L. et al. Convergent evolution and adaptation of Pseudomonas aeruginosa within patients with cystic fibrosis. **Nat Genet,** v. 47, n. 1, p. 57-64, Jan 2015.

MATHEE, K.; MCPHERSON, C. J.; OHMAN, D. E. Posttranslational control of the algT (algU)-encoded sigma22 for expression of the alginate regulon in Pseudomonas aeruginosa and localization of its antagonist proteins MucA and MucB (AlgN). **J Bacteriol,** v. 179, n. 11, p. 3711-20, Jun 1997.

MCCULLOCH, E. et al. Improved early diagnosis of Pseudomonas aeruginosa by real-time PCR to prevent chronic colonisation in a paediatric cystic fibrosis population. **J Cyst Fibros,** v. 10, n. 1, p. 21-4, Jan 2011.

MENA, A. et al. Genetic adaptation of Pseudomonas aeruginosa to the airways of cystic fibrosis patients is catalyzed by hypermutation. **J Bacteriol,** v. 190, n. 24, p. 7910-7, Dec 2008.

MICHELSEN, C. F. et al. Staphylococcus aureus alters growth activity, autolysis and antibiotic tolerance in a human host adapted Pseudomonas aeruginosa lineage. **J Bacteriol**, Sep 2 2014.

MILLER, M. R. et al. Standardisation of spirometry. **Eur Respir J,** v. 26, n. 2, p. 319-38, Aug 2005.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. *Pseudomonas*. In: MURRAY, P. R.;ROSENTHAL, K. S.*, et al* (Ed.). **Microbiologia Médica**. 6. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. cap. 33, p.329.

NORDMANN, P.; POIREL, L. Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in Enterobacteriaceae. **J Antimicrob Chemother,** v. 56, n. 3, p. 463-9, Sep 2005.

NORMARK, B. H.; NORMARK, S. Evolution and spread of antibiotic resistance. **J Intern Med,** v. 252, n. 2, p. 91-106, Aug 2002.

OLIVER, A. High Frequency of Hypermutable Pseudomonas aeruginosa in Cystic Fibrosis Lung Infection. **Science,** v. 288, n. 5469, p. 1251-1253, 2000.

PARK, C. H. et al. Prevalence in the United States of aac(6')-Ib-cr encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. **Antimicrob Agents Chemother,** v. 50, n. 11, p. 3953-5, Nov 2006.

PEREZ, L. R. et al. When the resistance gets clingy: Pseudomonas aeruginosa harboring metallo-beta-lactamase gene shows high ability to produce biofilm. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis,** v. 31, n. 5, p. 711-4, May 2012.

PITONDO-SILVA, A. et al. High level of resistance to aztreonam and ticarcillin in Pseudomonas aeruginosa isolated from soil of different crops in Brazil. **Sci Total Environ,** v. 474, p. 155-8, 2014.

POIREL, L. et al. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. **Diagn Microbiol Infect Dis,** v. 70, n. 1, p. 119-23, May 2011.

POLLINI, S. et al. Pseudomonas aeruginosa infection in cystic fibrosis caused by an epidemic metallo-beta-lactamase-producing clone with a heterogeneous carbapenem resistance phenotype. **Clin Microbiol Infect,** v. 17, n. 8, p. 1272-5, Aug 2011.

PRESSLER, T. et al. Early rise of anti-pseudomonas antibodies and a mucoid phenotype of pseudomonas aeruginosa are risk factors for development of chronic lung infection--a case control study. **J Cyst Fibros,** v. 5, n. 1, p. 9-15, Jan 2006.

PROESMANS, M. et al. Evaluating the "Leeds criteria" for Pseudomonas aeruginosa infection in a cystic fibrosis centre. **Eur Respir J,** v. 27, n. 5, p. 937-43, May 2006.

QIN, X. et al. Use of Real-Time PCR with Multiple Targets To Identify Pseudomonas aeruginosa and Other Nonfermenting Gram-Negative Bacilli from Patients with Cystic Fibrosis. **J Clin Microbiol,** v. 41, n. 9, p. 4312-4317, 2003.

QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. **Clin Microbiol Rev,** v. 20, n. 3, p. 440-58, table of contents, Jul 2007.

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

RAU, M. H. et al. Early adaptive developments of Pseudomonas aeruginosa after the transition from life in the environment to persistent colonization in the airways of human cystic fibrosis hosts. **Environ Microbiol,** v. 12, n. 6, p. 1643-58, Jun 2010.

RODRIGUES, R. et al. Cystic fibrosis and neonatal screening. **Cad Saude Publica,** v. 24 Suppl 4, p. s475-84, 2008.

SANTOS, C. I. D. S. et al. Análise crítica dos escores de avaliação de gravidade da fibrose cística: estado da arte. **Jornal Brasileiro de Pneumologia,** v. 30, p. 286-298, 2004.

SAUTTER, R. et al. A complex multilevel attack on Pseudomonas aeruginosa algT/U expression and algT/U activity results in the loss of alginate production. **Gene,** v. 498, n. 2, p. 242-53, May 1 2012.

SCHABER, J. A. Analysis of quorum sensing-deficient clinical isolates of Pseudomonas aeruginosa. **J Med Microbiol,** v. 53, n. 9, p. 841-853, 2004.

SCHURR, M. J. et al. Gene cluster controlling conversion to alginate-overproducing phenotype in Pseudomonas aeruginosa: functional analysis in a heterologous host and role in the instability of mucoidy. **J Bacteriol,** v. 176, n. 11, p. 3375-82, Jun 1994.

SHERRILL, D. L. et al. Continuous longitudinal regression equations for pulmonary function measures. **Eur Respir J,** v. 5, n. 4, p. 452-62, Apr 1992.

SHWACHMAN, H.; LEUBNER, H.; CATZEL, P. Mucoviscidosis. **Adv Pediatr,** v. 7, p. 249-323, 1955.

SINGHAL, N. et al. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. **Front Microbiol,** v. 6, p. 791, 2015.

SMITH, E. E. et al. Genetic adaptation by Pseudomonas aeruginosa to the airways of cystic fibrosis patients. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 103, n. 22, p. 8487-92, May 30 2006.

SPILKER, T. et al. PCR-Based Assay for Differentiation of Pseudomonas aeruginosa from Other Pseudomonas Species Recovered from Cystic Fibrosis Patients. **J Clin Microbiol,** v. 42, n. 5, p. 2074-2079, 2004.

STOLLAR, F. et al. Shwachman-Kulczycki score still useful to monitor cystic fibrosis severity. **Clinics (Sao Paulo),** v. 66, n. 6, p. 979-83, 2011.

TENOVER, F. C. et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **J Clin Microbiol,** v. 33, n. 9, p. 2233-9, Sep 1995.

TRAN, A. et al. Cost Savings Realized by Implementation of Routine Microbiological Identification by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. **J Clin Microbiol,** v. 53, n. 8, p. 2473-9, Aug 2015.

VEESENMEYER, J. L. et al. Pseudomonas aeruginosa virulence and therapy: evolving translational strategies. **Crit Care Med,** v. 37, n. 5, p. 1777-86, May 2009.

WILLIAMS, B. J.; DEHNBOSTEL, J.; BLACKWELL, T. S. Pseudomonas aeruginosa: host defence in lung diseases. **Respirology,** v. 15, n. 7, p. 1037-56, Oct 2010.

WOLSKA, K.; SZWEDA, P. Genetic features of clinical Pseudomonas aeruginosa strains. **Pol J Microbiol,** v. 58, n. 3, p. 255-60, 2009.

WOOD, L. F.; LEECH, A. J.; OHMAN, D. E. Cell wall-inhibitory antibiotics activate the alginate biosynthesis operon in Pseudomonas aeruginosa: Roles of sigma (AlgT) and the AlgW and Prc proteases. **Mol Microbiol,** v. 62, n. 2, p. 412-26, Oct 2006.

WOOD, L. F.; OHMAN, D. E. Cell wall stress activates expression of a novel stress response facilitator (SrfA) under sigma22 (AlgT/U) control in Pseudomonas aeruginosa. **Microbiology,** v. 161, n. Pt 1, p. 30-40, Jan 2015.

WYCKOFF, T. J. et al. Static growth of mucoid Pseudomonas aeruginosa selects for non-mucoid variants that have acquired flagellum-dependent motility. **Microbiology,** v. 148, n. Pt 11, p. 3423-30, Nov 2002.

YANG, L. et al. Evolutionary dynamics of bacteria in a human host environment. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 108, n. 18, p. 7481-6, May 3 2011.

ZOCCOLI, C. M. et al. Microbiologia. In: NETO, N. L. (Ed.). **Fibrose cística: enfoque multidisciplinar**. 2. Florianópolis, 2009. cap. 4, p.688.