

UFPE – Universidade Federal de Pernambuco
Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical

EDUARDO JOSÉ VALENÇA CORDEIRO PIRES

Pseudomonas aeruginosa: estudo epidemiológico e da ação do óxido nítrico sobre biofilmes de amostras mucoides de pacientes com fibrose cística.

VIRTUS IMPAVIDA

Recife – PE
2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

EDUARDO JOSÉ VALENÇA CORDEIRO PIRES

Pseudomonas aeruginosa: estudo epidemiológico e da ação do óxido nítrico sobre biofilmes de amostras mucoides de pacientes com fibrose cística.

Dissertação apresentada como pré-requisito para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Tropical à Universidade Federal de Pernambuco, na área de Microbiologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Amélia Vieira Maciel

Co-orientador: Dr Fábio Brayner dos Santos

Recife – PE
2009

Pires, Eduardo José Valença Cordeiro
Pseudomonas aeruginosa: estudo epidemiológico
e da ação do óxido nítrico sobre biofilmes de
amostras mucoides de pacientes com fibrose cística /
Eduardo José Valença Cordeiro Pires. – Recife : O
Autor, 2009.

V+ 100 folhas : il., fig., tab. e graf.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal
de Pernambuco. CCS. Medicina Tropical, 2009.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Antibacteriano. 2. *Pseudomonas
aeruginosa*. 3. Biofilmes bacterianos. 4.
Fibrose cística. 5. Resistência bacteriana
I.Título.

616.01
617.695

CDU (2.ed.)
CDD (22.ed.)

UFPE
CCS2009-077



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE (CCS)

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)¹

RELATÓRIO DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DO MESTRANDO
EDUARDO JOSÉ VALENÇA CORDEIRO PIRES

No dia 12 de março 2009, às 08h00, na Sala Prof. Murillo La Greca no 3º. and do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CCS/UFPE), os Membros Doutores: Prof^ª. Dr^ª. Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho (UFPE – Membro Interno), a Prof^ª. Dr^ª. Ana Catarina de Souza Lopes (UFPE – Membro Externo) e a Prof^ª. Dr^ª. Danyelly Brunaska Gondim Martins (UFPE – Membro Externo), componentes da Banca Examinadora, em sessão pública, arguíram o mestrando EDUARDO JOSÉ VALENÇA CORDEIRO PIRES sobre a sua Dissertação intitulada “*Pseudomonas aeruginosa*: ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO E DA REAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO SOBRE BIOFILMES DE AMOSTRAS MUCÓIDES DE PACIENTES COM FIBROSE CÍSTICA”. Ao final da arguição de cada membro da Banca Examinadora e resposta do mestrando, as seguintes menções foram publicamente fornecidas.

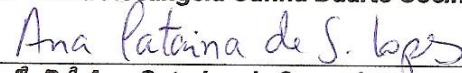
Prof^ª. Dr^ª. Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho APROVADA

Prof^ª. Dr^ª. Ana Catarina de Souza Lopes APROVADA

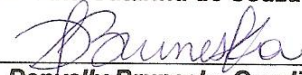
Prof^ª. Dr^ª. Danyelly Brunaska Gondim Martins Aprovado



Prof^ª. Dr^ª. Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho



Prof^ª. Dr^ª. Ana Catarina de Souza Lopes



Prof^ª. Dr^ª. Danyelly Brunaska Gondim Martins

¹ Endereço: Av. Prof. Moraes Rêgo, s/n – Bloco A – Térreo do Hospital das Clínicas da UFPE. CEP.: 50670-420, Cidade Universitária, Recife-PE. Fone/Fax: (081) 2126.8527. Sítio: <http://www.ufpe.br/ppgmedtrop>

Agradecimentos

Agradeço ao meu pai pelo amor, apoio e dedicação prestados durante toda minha formação;

A minha mãe, pela criação, amor e dedicação;

Aos meus padrinhos, por toda força, conselhos, apoio, carinho e amor; e palavras são poucas para agradecer tamanha dedicação;

Às minhas tias Elizabete e Eliane por toda criação e amor;

A Prof.^a Dr.^a. Amélia Maciel, pelo reconhecimento, por ter me orientado com tanto amor, carinho, presteza e dedicação desde a minha graduação até este grau;

A Prof.^a Dr.^a. Ana Catarina, pela amizade, carinho e paciência ao esclarecer minhas dúvidas sempre que precisei;

Ao Dr. Fábio Brayner, pela amizade e dedicação;

Ao Dr. Luiz Alves, por toda atenção e amizade;

A todos outros professores e funcionários, em especial a Sr.^a Dejanira, da Disciplina de Microbiologia e Imunologia, pela amizade e carinho;

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical que direta ou indiretamente contribuíram para minha formação;

Ao Dr. Marcelo Magalhães e Dr. Murilo Amorim pela presteza na obtenção das amostras;

A minha tia, Dr.^a Júlia Correia pelo incentivo e ajuda na obtenção das amostras clínicas;

A minha namorada Rebecca Santos, pelo amor e carinho nas horas mais difíceis;

Agradeço a Carmem, do laboratório de bacteriologia do HC, pela presteza e paciência;

A minha amiga Dyana Veras pelo carinho, paciência e dedicação;

A mestrandia Veridiana, pela ajuda e presteza;

Aos amigos: Raoni, Lucas, Márcio, Diogo e Odnilson, pela grande amizade e parceria;

Aos professores e funcionários desta instituição, que de alguma maneira ajudaram em minha formação pessoal e profissional;

A Universidade Federal de Pernambuco, por me ensinar a viver;

A CAPES/UFPE, pelo apoio financeiro;

A estes acima mencionados e a todos outros amigos, primos, tios e irmãos, fica minha eterna gratidão por construírem com tanto carinho a pessoa que eu sou. Obrigado!

Dedico este trabalho aos meus pais, o Dr. Cleyder Pires e Sr^{te} Edilene Pires, e aos meus padrinhos, o Sr. Rômulo Corrêa e Dr^{te} Angélica Corrêa, sem os quais jamais conseguiria alcançar este grau.

“E ainda que tivesse o dom da profecia, e conhecesse todos os mistérios de toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria”.

Coríntios 13:13

Resumo

Atualmente, a *Pseudomonas aeruginosa* é o bacilo Gram-negativo mais reportado em casos de infecções hospitalares. Sua elevada resistência a antimicrobianos e desinfetantes químicos pode ser explicada, em parte, pela forma de crescimento em biofilmes. A variante mucóide da *P. aeruginosa*, comumente isolada de pacientes com fibrose cística, é capaz de produzir grandes quantidades de alginato, resultando em biofilmes extremamente complexos. O presente estudo objetivou realizar um levantamento da prevalência da *P. aeruginosa*, bem como seu perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC), assim como avaliar a ação do óxido nítrico sobre biofilmes de amostras mucóides da mesma bactéria oriundas de pacientes com fibrose cística do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP), Recife-PE. Para a análise da prevalência, foi realizado um estudo retrospectivo baseado no livro de registros de secreções diversas do laboratório de bacteriologia do HC. Biofilmes de amostras mucóides e não-mucóides de pacientes com fibrose cística do IMIP foram analisados sobre microscopia eletrônica de varredura. As bactérias mais frequentes, isoladas das secreções diversas, foram *P. aeruginosa* (26%) e *S. aureus* (25%). Quanto à origem, a *P. aeruginosa* parece ser um patógeno essencialmente respiratório, uma vez que 33% das amostras positivas para esta bactéria foram de secreções traqueais e 21% nasais. Os antimicrobianos mais eficazes contra a *P. aeruginosa* foram Amicacina, Imipenem, Meropenem e Aztreonam. Biofilmes de amostras mucóides da *P. aeruginosa* são muito mais complexos se comparados aos das amostras não-mucóides. No primeiro caso, as bactérias se agregam em estruturas que lembram teias de aranha que se fixam ao substrato formando grandes estruturas complexas no interior das microcolônias. Portanto, apesar da elevada prevalência no HC, a *P. aeruginosa* mostrou boa sensibilidade aos antimicrobianos testados naquele hospital. Ainda concluindo, biofilmes desta bactéria apresentam grande complexidade e necessitam de estudos mais aprofundados. Apesar de mais complexos, biofilmes mucóides da *P. aeruginosa* podem ser inibidos na presença de concentrações nanomolares do nitroprussiato de sódio.

UNITERMOS: *Pseudomonas aeruginosa*, Biofilmes bacterianos, Fibrose Cística, Resistência bacteriana

Summary:

Pseudomonas aeruginosa has been reported all over the world as the most prevalent gram-negative bacilli in hospital infections cases. Its high resistance to antimicrobial drugs and chemical compounds can be partially explained by the biofilm mode of growth. The mucoid type of *P. aeruginosa*, commonly isolated from cystic fibrosis patients, is known to produce high amounts of alginate, resulting on extremely complex biofilms. The present study aimed on an epidemiologic analysis of *P. aeruginosa* and evaluates its susceptibility to antimicrobial agents at the Clinical Hospital from Federal University of Pernambuco (HC) as well as to evaluate the action of nitric oxide on mucoid samples of *P. aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients at the Medicina Integral Professor Fernando Figueira. For the epidemiologic analysis, a retrospective study has been done based on the registry book of miscellaneous secretions from the bacteriology laboratory of HC. The most frequent bacteria, isolated from miscellaneous secretions, were *P. aeruginosa* (26%) and *S. aureus* (25%). Related to the origin, the *P. aeruginosa* seems to be essentially a respiratory pathogen, once 33% of the positive samples for these bacteria were from tracheal secretion and 21% nasal. The most efficient antimicrobial drugs against the *P. aeruginosa* were, Amikacin, Imipenem, Meropenem e Aztreonam. Biofilms of mucoid type of *P. aeruginosa* are far more complex if compared with non-mucoid samples. In the first case, bacteria stick on spider web like structures that binds to the surface creating complex structures well known as microcolonies. Thus, despite the high prevalence at HC, *P. aeruginosa* has shown a good susceptibility to antimicrobial drugs tested on that hospital. In addition, biofilms of *P. aeruginosa* are of great complexity and further studies are necessary to understand such structures. Although mucoid biofilms are more complex, these structures could not resist to treatment with nanomolar concentrations of sodium nitroprussid.

Key Words: *Pseudomonas aeruginosa*, Bacterial biofilms, Cistic Fibrosis, Bacterial resistance

Abreviaturas

| | |
|-------|--|
| AIDS | Síndrome da imunodeficiência adquirida |
| ATM | Aztreonam |
| BHI | Brain Heart Infusion (Infusão de cérebro e coração) |
| CAZ | Ceftazidima |
| CF/FC | Cystic Fibrosis/ Fibrose Cística |
| CTX | Cefotaxima |
| EMB | Eosina Azul de Metileno |
| ESBL | Beta-lactamase de espectro estendido |
| HC | Hospital das Clínicas |
| IMIP | Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira |
| LPS | Lipopolissacarídeo |
| MDR | Multi droga resistente |
| MEV | Microscopia Eletrônica de Varredura |
| MIC | Concentração Mínima Inibitória |
| ON/NO | Óxido Nítrico/Nítric Oxide |
| SNP | Nitroprussiato de Sódio |

Lista de Tabelas e Gráficos

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Concentrações Inibitórias Mínimas para <i>P. aeruginosa</i> frente a antimicrobianos | 29 |
|--|----|

Artigo I

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Frequência dos diversos microrganismos isolados das amostras de secreções diversas do HC entre Janeiro e Junho de 2008 | 45 |
| Tabela 2 - Frequência da origem das secreções de onde se isolou a <i>P. aeruginosa</i> no HC entre Janeiro e Junho de 2008 | 46 |
| Gráfico 1 - Perfil de susceptibilidade às Cefalosporinas para as amostras testadas de <i>P. aeruginosa</i> no HC entre Janeiro e Junho de 2008 | 47 |
| Gráfico 2 - Perfil de susceptibilidade aos Aminoglicosídeos para as amostras testadas de <i>P. aeruginosa</i> no HC entre Janeiro e Junho de 2008. | 47 |
| Gráfico 3 - Perfil de susceptibilidade aos Carbapenêmicos para as amostras testadas de <i>P. aeruginosa</i> no HC entre Janeiro e Junho de 2008. | 48 |
| Gráfico 4 - Outros antimicrobianos e seus devidos perfís de susceptibilidade para as amostras testadas de <i>P. aeruginosa</i> no HC entre Janeiro e Junho de 2008. | 48 |

Artigo II

| | |
|--|----|
| Tabela 1 – Cepas de <i>P. aeruginosa</i> isoladas de pacientes com FC e suas MICs | 61 |
| Foto 1 – Formação de biofilme pela <i>P. aeruginosa</i> não-mucóide | 61 |
| Foto 2 – Hiper produção de alginato pela <i>P. aeruginosa</i> mucóide. | 62 |
| Foto 3 – O início da formação de biofilme pela <i>P. aeruginosa</i> mucóide | 63 |
| Foto 4 – Variante mucóide da <i>P. aeruginosa</i> tratada com o SNP | 63 |

Sumário

| | |
|--|------------|
| RESUMO NA LÍNGUA VERNÁCULA | I |
| RESUMO NA LÍNGUA ESTRANGEIRA | II |
| ABREVIATURAS E SÍMBOLOS | III |
| LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS | IV |
| 1. INTRODUÇÃO | 3 |
| 2. REVISÃO DA LITERATURA | 7 |
| 2.1. A PSEUDOMONAS AERUGINOSA | 8 |
| 2.1.1. <i>Diagnóstico</i> | 9 |
| 2.1.2. <i>Características microbiológicas</i> | 9 |
| 2.1.3. <i>Fatores associados à Virulência</i> | 11 |
| 2.1.4. <i>Epidemiologia</i> | 17 |
| 2.1.5. <i>Resistência a antimicrobianos</i> | 19 |
| 2.1.6. <i>Alginate</i> | 22 |
| 2.2. BIOFILMES | 23 |
| 3. OBJETIVOS | 25 |
| 3.1. GERAL | 26 |
| 3.2. ESPECÍFICOS | 26 |
| 4. METODOLOGIA..... | 27 |
| 4.1. AMOSTRAS CLÍNICAS..... | 28 |
| 4.2. ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICA DA P. AERUGINOSA NO HC | 28 |
| 4.3. CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (MIC)..... | 29 |
| 4.4. FORMAÇÃO DOS BIOFILMES..... | 30 |
| 4.5. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA..... | 30 |
| 5. RESULTADOS | 32 |
| 5.1 ARTIGO I..... | 33 |
| Análise epidemiológica de isolados clínicos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> provenientes do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco | |
| <i>Página Título</i> | 34 |
| <i>Resumo</i> | 35 |
| <i>Summary</i> | 36 |
| <i>Introdução</i> | 37 |
| <i>Método</i> | 38 |
| <i>Resultados</i> | 39 |
| <i>Discussão</i> | 41 |
| <i>Conclusões</i> | 44 |
| TABELAS E GRÁFICOS | 34 |
| <i>Referências</i> | 49 |
| 5.2 ARTIGO II | 51 |

“Biofilm Lifestyle: dispersion of mucoid biofilms of Pseudomonas aeruginosa from cystic fibrosis patients.”

| | |
|--|-----------|
| <i>Abstract</i> | 53 |
| <i>Introduction</i> | 54 |
| <i>Materials and methods</i> | 55 |
| <i>Results</i> | 56 |
| <i>Discussion</i> | 57 |
| <i>Acknowledgements</i> | 59 |
| <i>Figures and Tables</i> | 60 |
| <i>References:</i> | 64 |
| 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS | 66 |
| 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 68 |
| 8. ANEXOS | 78 |
| 8.1 NORMAS DA REVISTA BRASILEIRA DE TERAPIA INTENSIVA | 79 |
| 8.2 NORMAS DA REVISTA “LETTERS ON APPLIED MICROBIOLOGY” | 84 |
| 8.3 TRADUÇÃO DO ARTIGO ESTRANGEIRO PARA LÍNGUA VERNÁCULA | 94 |

1. Introdução

Bactéria ubíqua, de vida livre e encontrada normalmente em ambientes úmidos, a *Pseudomonas aeruginosa* raramente provoca doenças em indivíduos saudáveis, sendo considerada um patógeno essencialmente oportunista e, portanto, de grande ameaça para pacientes hospitalizados especialmente aqueles com patologias imunossupressoras como o câncer, AIDS e queimados (KONEMAN *et al.*, 2001). Ela é um agente importante de infecções graves em crianças e neonatos, causando septicemia, infecções do trato urinário, pneumonia associada à ventilação, infecções de pele e mucosas, queimaduras, trauma, entre outros. Esta bactéria também está significativamente associada a casos crônicos de otite média supurativa e infecções respiratórias associadas à fibrose cística (WHO, 2008). Este pseudomonídeo é bem conhecido pela ampla resistência a diversos grupos de antimicrobianos usados na rotina e vêm se tornando motivo de preocupação para médicos e pesquisadores em todo mundo.

Estudos anteriores mostraram que a *P. aeruginosa* desenvolve-se preferencialmente formando biofilmes (COSTERTON, 1984) e que estes são formados por uma matriz gelatinosa de polímero orgânico composta essencialmente de alginato (COSTERTON *et al.*, 1987). Biofilmes bacterianos têm sido reportados em todo o mundo como um grande problema para a indústria, contaminando tubulações de água, bem como para a medicina, dificultando o combate a infecções. O prejuízo no setor industrial logo impulsionou o desenvolvimento dos primeiros métodos para eliminação daqueles biofilmes. Enquanto que para medicina moderna ainda há muito que se estudar sobre a influência dessas formações na resistência bacteriana. Sabe-se que a estrutura natural do biofilme bacteriano e os atributos fisiológicos desses microrganismos conferem a eles uma resistência inerente a agentes antimicrobianos, sejam eles antibióticos, desinfetantes ou germicidas (DONLAN E

COSTERTON, 2002). Bactérias incrustadas em tais estruturas podem ser até 1000 vezes mais resistentes a antimicrobianos do que células bacterianas planctônicas (BROOUN, LIU E LEWIS, 2000).

Comum na população caucasiana, a fibrose cística é uma doença hereditária que afeta, entre outros órgãos, os pulmões, tornando-os mais susceptíveis a infecções bacterianas oportunistas. O principal patógeno responsável por essas infecções é a *P. aeruginosa*. A cepa selvagem, responsável pela colonização e infecção inicial é relativamente fácil de tratar sob terapia antimicrobiana adequada. A falha deste tratamento acarreta normalmente na mutação daquela cepa a uma variante mucóide, normalmente responsável pela cronificação da infecção, levando o paciente muitas vezes a óbito.

Tendo em vista que a forma de crescimento em biofilmes aumenta em vários aspectos a resistência bacteriana, a dissociação de tais estruturas ajudaria no tratamento de infecções onde bactérias assumem essa forma de crescimento. Neste aspecto, alguns pesquisadores deram um passo à frente na eliminação de biofilmes bacterianos. Barraud *et al.*, 2006, demonstraram experimentalmente a dispersão de biofilmes de cepas padrões PAO1 e PAO1-GFP de *P. aeruginosa* na presença de concentrações baixíssimas (subletais) de óxido nítrico. No mesmo contexto, a dispersão ou prevenção da formação de biofilmes de *P. aeruginosa* em pacientes infectados por essa bactéria, poderia ajudar no tratamento dessas infecções. Desta forma, este combate dentro de ambientes hospitalares romperia ou, ao menos, diminuiria a cadeia de disseminação de microrganismos com grande potencial patogênico como a *P. aeruginosa* mucóide.

Este estudo procurou abranger dois aspectos referentes à *P. aeruginosa*: o primeiro seria estimar a prevalência desta bactéria em hospitais públicos de grande fluxo de

pacientes, neste caso o Hospital das Clínicas de Pernambuco (HC); o segundo aspecto foi buscar compreender melhor os biofilmes dessas bactérias, tanto linhagens mucóides quanto não-mucóides, bem como utilizar o nitroprussiato de sódio (SNP) como doador de oxido nítrico (NO), para dispersão de biofilmes de amostras padrões e amostras mucóides de *P. aeruginosa* oriundas de pacientes com fibrose cística.

2. Revisão da literatura

2.1. A *Pseudomonas aeruginosa*

As primeiras observações sobre a *P. aeruginosa* datam do século XIX onde, em 1850, um cirurgião militar francês chamado Sédillot observou a formação de pus de coloração azulada nas feridas dos soldados. Porém, apenas três décadas após a observação do médico francês, em 1882, o farmacêutico e bacteriologista Carle Gessard descreveu o organismo responsável pela pigmentação nomeando o bacilo de *Bacillus pyocyanea*. Foi em 1900 que Migula adotou o nome genérico de *Pseudomonas* (do grego “*pseudes*”, falso; “*monas*”, unidade) e chamou a espécie de *Pseudomonas pyocyanea*. O nome *aeruginosa* (do latim, *aeruginosus*, cheio de óxido de cobre), apelido dado ao bacilo, ficou tão conhecido que acabou virando nome da espécie.

A *P. aeruginosa* é capaz de infectar desde insetos e plantas até animais como humanos (RAHME et al., 1995). A capacidade desta bactéria de causar infecções tão diferentes pode ser atribuída ao amplo arsenal de fatores de virulência que esta produz (VAN DELDEN & IGLEWSKI, 1998).

A *P. aeruginosa* é um dos principais agentes causadores de infecções hospitalares em todo o mundo e com resistência a diversas condutas terapêuticas (EMORI & GAYNES, 1993). Bactéria ubíqua e de vida livre, é encontrada normalmente em ambientes úmidos e raramente provoca doenças em indivíduos saudáveis. Sendo um microrganismo oportunista, a *P. aeruginosa* precisa driblar as defesas do organismo para iniciar uma infecção. Ela pode causar infecções urinárias, dermatites, infecções respiratórias e até sistêmicas, além de outras consequências em pacientes imunocomprometidos (TODAR, 2004). Pacientes com fibrose cística (FC) são notavelmente mais susceptíveis a infecções crônicas pela *P.*

aeruginosa, sendo a principal causa de mortalidade nesta população (GOVAN & DERETIC, 1996).

Esta bactéria é inerentemente resistente a vários antibióticos clinicamente relevantes e produz uma ampla variedade de fatores de virulência incluindo lipases, proteases, exotoxinas e inúmeros metabólitos secundários (SMITH & IGLEWSKI, 2003).

2.1.1. Diagnóstico

O diagnóstico de rotina da *P. aeruginosa* é baseado no isolamento e identificação da bactéria. Ela cresce bem na maioria dos meios de cultivos usados na rotina laboratorial e é comumente isolada em meios de Ágar Sangue, Ágar eosina azul de metileno (EMB) e cetil-trimetil cloreto de amônio (cetrimide), sendo este último seletivo para a *P. aeruginosa*. Por ser resistente a compostos de amônio quaternário, em particular o cetrimide, vários fabricantes desenvolveram meios de cultivo contendo este composto para isolar seletivamente a *P. aeruginosa*. Sua identificação pode ser feita inicialmente pelo exame macroscópico das colônias, odor peculiar de frutas. Posteriormente pela coloração de Gram, inabilidade de fermentação da lactose, oxidação da glicose em meio basal (oxidase positivo), utilização de citrato como única fonte de carbono (citrato positivo), inabilidade de descarboxilar a lisina (lisina negativo) e incapacidade de utilização do aminoácido triptofano (indol negativo).

2.1.2. Características microbiológicas

A *P. aeruginosa* é um bastonete Gram-negativo de comprimento variável, movido por meio de um único flagelo polar, sendo o oxigênio molecular necessário para sua motilidade (PITT & SIMPSON, 2006). Pode ser encontrada no solo ou na água. Seu

metabolismo é aeróbio e nunca fermentativo, mas pode crescer na ausência de oxigênio utilizando para isso o nitrato como aceptor final de elétrons. Seu requerimento nutricional é muito simples, pois já foi observado crescimento da *P. aeruginosa* em água destilada (FAVERO et al., 1971). O meio de cultivo mais simples, composto por acetato como fonte de carbono e sulfato de amônio como fonte de nitrogênio pode fornecer um bom crescimento da *P. aeruginosa* em laboratório. Estudantes da Universidade Federal do Ceará desenvolveram um meio de cultivo para esta bactéria a base de suco de Cajú com bons resultados (SOUZA et al., 2005). Seu metabolismo versátil permite que ela use mais de setenta e cinco compostos orgânicos para seu crescimento (TODAR, 2004). Sua temperatura ideal de crescimento é de 37°C, mas pode desenvolver-se sem maiores problemas em temperaturas elevadas como 42°C. A *P. aeruginosa* é resistente a várias condições físicas como altas temperaturas, alta concentração de sal e corantes, a vários compostos desinfetantes, além de um amplo espectro de antibióticos de uso corriqueiro.

A morfologia das colônias, crescidas em Ágar a 37°C, pode variar muito. Pitt e Simpson (2006) classificam a forma das colônias em até seis diferentes tipos sendo as mais comuns as planas, difusas e com bordas irregulares (tipo1); e com aparência coliforme (tipo2).

A pigmentação é uma característica fascinante da *P. aeruginosa*, corando os meios onde cresce do azul ao negro. A maioria das cepas produz o pigmento azulado piocianina e amarelado fluoresceína também conhecida como pioverdina, que difundidas no meio de crescimento colorem-no de um azul-esverdeado. A produção de piocianina é única da espécie (KING et al., 1954). O pigmento azul pode ser melhor visualizado em meios próprios de cultivo contendo concentrações suficientes de sais de potássio e magnésio que

impedem a produção da fluoresceína como os meios King's A e Ágar Cetrimide. Dois outros pigmentos incomuns são a piorubrina (vinho) e a piomelanina (do marrom ao preto), sendo este último melhor visualizado no meio Ágar tirosina (PITT & SIMPSON, 2006). Outro pigmento interessante e pouco estudado é a pioluteorina, que é um potente antifúngico resultado do metabolismo secundário da espécie *P. fluorescens*, mas que já foi observado na *P. aeruginosa* (OHMORI *et al.*, 1978). A piocianina é extremamente tóxica para o tecido epitelial ciliar do trato respiratório humano, impedindo o funcionamento normal dos cílios e induzindo a produção de mediadores inflamatórios pelos fagócitos aumentando a lesão tecidual.

2.1.3. Fatores associados à Virulência

É importante ressaltar, como dito anteriormente, que a *P. aeruginosa* é um patógeno oportunista e dificilmente consegue infectar pessoas em seu perfeito estado de saúde. Vários destes fatores podem ser atribuídos a características físicas da própria célula bacteriana e outros a substâncias secretadas por estas. Estes incluem a exotoxina A, fosfolipase, protease alcalina, elastase, piocianina, pili, flagelo e lipopolissacarídeos (SALYERS & WHITT, 1994). Um importante e recentemente descoberto fator de virulência da *P. aeruginosa* é o sistema de secreção tipo III, comum em bactérias Gram-negativas (KANG *et al.*, 1997; YAHR *et al.*, 1996). Este tipo de secreção permite que o microrganismo secrete e injete proteínas efetoras dentro da célula do hospedeiro. Até hoje, quatro proteínas efetoras foram identificadas: ExoS, ExoT, ExoU (também chamada de PepA) e ExoY (FELTMAN *et al.*, 2001). A porção amino-terminal da ExoS, encarrega-se de destruir os microfilamentos de actina abalando os “alicerces” da célula do hospedeiro, enquanto que a porção carboxi-terminal é citotóxica a células eucariontes (FRITZH-

LINDSTEN *et al.*, 1997; GOEHRING *et al.*, 1999; PEDERSON *et al.*, 1999; VALLIS *et al.*, 1999).

O processo invasivo e toxigênico geralmente estão associados em infecções causadas pela *P. aeruginosa*. O decurso da patogênese é composto por etapas e cada uma delas depende da outra para instalar-se, podendo ser interrompida em qualquer uma delas. O ato tem início com a fixação e colonização do microrganismo, seguido pela invasão tecidual local, terminando com a disseminação e doença. Os diversos fatores de virulência são responsáveis por cada um desses estágios e estes determinam a sintomatologia de cada fase da doença (TODAR, 2004).

A *P. aeruginosa* é conhecida pela sua ampla resistência a diversos grupos de antibióticos. Ela é naturalmente resistente a vários antibióticos devido a sua membrana lipopolissacarídica (LPS) externa, que funciona como uma barreira seletiva. Junte-se a isso a sua tendência de formação de biofilmes que protege as colônias contra concentrações terapêuticas dos antibióticos. Uma vez que a *P. aeruginosa* é um habitante do solo, sua convivência com outros microrganismos produtores naturais de antibióticos como os actinomicetos promoveram o desenvolvimento de uma resistência natural (TODAR, 2004).

2.1.3.1. Adesão

A aderência da bactéria ao tecido do hospedeiro é o primeiro passo na colonização e infecção de superfícies mucosas (GIBBONS, 1977). O epitélio lesionado predispõe a fixação e colonização da *P. aeruginosa*. O organismo cresce naturalmente como um biofilme tanto em superfícies, quanto em grandes glicoproteínas como aquelas encontradas no muco do trato respiratório (PITT & SIMPSON, 2006). A forma como elas se adere pode variar de cepa para cepa ou dependendo da superfície aonde irá se ligar, mas existem cinco

principais grupos de adesinas, presentes na *P. aeruginosa*, capazes de fixá-la aos diversos tecidos presentes no nosso organismo. Eles são o *pili*, a membrana externa que se liga ao muco (OM) proteína F, lectinas de superfície e o alginato. A fixação da *P. aeruginosa* a superfície epitelial é o primeiro passo para o estabelecimento de uma infecção do trato respiratório por esta bactéria em um paciente susceptível (RIVERA & NICOTRA, 1982).

Em condições favoráveis, quase todas as cepas de *P. aeruginosa* produzem *pili* (PITT & SIMPSON, 2006). A interação inicial das bactérias com a superfície é mediada por estruturas como flagelos e fimbrias (ou *pili*) do tipo IV (“type IV *pili*” ou “type IV fimbriae”) (Soto & Hultgren, 1999). Pilis tipo IV são longas fibras que se estendem da superfície bacteriana compostas por monômeros chamados de pilina. A pilina é codificada pelo gene *pilA* localizado no operon *pil* (MATTICK, 2002).

A superfície do trato respiratório é protegida por uma malha de muco rica em fibronectina, para colonizá-lo a *P. aeruginosa* libera proteases que quebram aquela estrutura expondo os receptores onde as fimbrias podem se ligar. Tecidos danificados ou irritados por uma virose, por exemplo, facilitam o processo de colonização e esse mecanismo recebe o nome de aderência oportunista (RAMPHAL *et al.*, 1980).

O receptor nas células do epitélio traqueal para o Pili da *Pseudomonas* é provavelmente o ácido siálico (Ácido N-acetilneuramínico). Cepas mucóides, que produzem um exopolissacarídeo (alginato) em larga escala tem uma alternativa adicional de adesina que se liga ao muco traqueo-bronqueal (N-acetilglicosasamina) (TODAR, 2004). Camadas de alginato formam a matriz do biofilme da *P. aeruginosa* os quais ancoram as células ao seu ambiente e, em situações clínicas, protegem a bactéria das defesas do hospedeiro como linfócitos, fagócitos, ação dos cílios do trato respiratório, anticorpos e

complemento (PITT & SIMPSON, 2006). Biofilmes de cepas mucóides da *P. aeruginosa* também são menos susceptíveis a antibióticos do que cepas planctônicas. O flagelo e o pili tipo IV parecem ser desnecessários para a formação do biofilme, mas eles têm seu papel no desenvolvimento do mesmo (KLAUSEN *et al.*, 2003).

Em meios líquidos, a *P. aeruginosa* desloca-se nadando por meio de um único flagelo polar e em superfícies o faz utilizando o *pili* tipo IV (SEMMLER *et al.*, 1999). Os pesquisadores O'Tooler e Kolter (1998) demonstraram que a locomoção por meio do flagelo é necessária para a formação do biofilme pela *P. aeruginosa* PA14 e que o pili tipo IV também é útil neste processo, além da formação das microcolônias. O flagelo seria então utilizado para “aportar” na superfície ou tecido e dele sair nadando. E, uma vez sobre o substrato, utilizaria a locomoção através dos pilis tipo IV, “rastejando” sobre os mesmos para formar as microcolônias.

2.1.3.2. Lipopolissacarídeos (LPS)

O principal fator de virulência associado à superfície da *P. aeruginosa*, o lipopolissacarídeo (LPS), tem um importante papel imunogênico e estrutural, além de mediar a interação entre a superfície celular bacteriana e o ambiente externo (ROCCHETTA *et al.*, 1999). Estruturalmente, o LPS da *P. aeruginosa* é composto de uma região hidrofóbica de lipídeo A, um núcleo central de oligossacarídeo e uma porção de repetidos polissacarídeos, chamado de antígeno-O (ROCCHETTA *et al.*, 1999). O antígeno-O é uma estrutura extremamente dinâmica do LPS na *P. aeruginosa*. Esta molécula pode compreender uma banda A e/ou B, composta de repetidas unidades de açúcares e representam a principal fonte da diversidade estrutural e sorotípica entre isolados de *P. aeruginosa* (AUGUSTIN *et al.*, 2007). É sabido que a composição do antígeno-O

muda rapidamente quando as células da *P. aeruginosa*, originalmente associadas ao biofilme, são expostas a condições que as forcem a voltar à forma planctônica (BEVERIDGE et al., 1997). Acredita-se que estas mudanças rápidas associadas à superfície tenham uma ampla relação com a patogênese, mas até hoje não há estudos mais aprofundados sobre o fato (AUGUSTIN et al., 2007).

2.1.3.3. Polissacarídeos Extracelulares

A *P. aeruginosa* produz uma camada extracelular pegajosa característica da espécie (HAYNES, 1951). Mais de 50% do peso seco desta camada é composta de polissacarídeos, em sua maioria de polímeros de glicose, ramnose e manose, seguido de galactosamina, ácido glicurônico e ácidos nucleicos (20%) e proteínas em menor fração (BROWN, FOSTER & CLAMP, 1969). Cepas mucóides de *P. aeruginosa* são isoladas principalmente de secreção do trato respiratório de pacientes, normalmente crianças, com fibrose cística (PIER et al., 2004; YOON et al., 2006; JELSBK et al., 2007; GOVAN & DERETIC, 1996). O polissacarídeo extracelular produzido por cepas mucóides de *P. aeruginosa* foi caracterizado como um polímero acetilado de ácido manurônico e ácido glicurônico que é similar ao ácido algínico produzido por algas marinhas (LINKER & JONES, 1964), conhecido como alginato. O polissacarídeo alginato é largamente produzido por cepas mucóides de *P. aeruginosa* e é composto de ácido beta-1,4-D-manurônico e ácido L-glicurônico. A quantidade de cada uma destas moléculas confere a amostra maior ou menor viscosidade alterando as características macro e microscópicas das colônias (PITT & SIMPSON, 2006)

2.1.3.4. Exoenzimas e Toxinas

ExoToxina A (ETA), uma proteína de 66-kDa, é considerada o fator mais tóxico secretado pela *P. aeruginosa* (SCHÜMANN *et al.*, 1998; SCHÜMANN, BLUETHMANN & TIEGS, 2000; HIRAKATA *et al.*, 1993; HAMOOD, GRISWOLD & DUHAN, 1996). É aceito que a ETA é internalizada pelo receptor de superfície celular CD₉₁ (KOUNNAS *et al.*, 1992), realizando sua toxicidade celular através do bloqueio da síntese de proteínas por meio da ribosilação do ADP do fator de alongação 2 (EF2) (PERENTESIS, MILLER & BODLEY, 1992). Porém, a inibição da síntese protéica por toxinas não é suficiente para induzir a lise da célula alvo (MORIMOTO & BONAVIDA, 1992). A ETA é otimamente produzida em condições de baixas concentrações de ferro e é codificada pelo gene *toxA* e regulado por outros dois genes em um operon (WICK *et al.*, 1990). Outra exotoxina produzida pela *P. aeruginosa* é a exotoxina S codificada pelo gene *exoS*. Cepas que carecem unicamente desse gene são menos virulentas em modelos animais, mas mais de 80% dos isolados possuem o gene *exoS* (LANOTTE *et al.*, 2004).

Duas hemolizinas são produzidas pela *P. aeruginosa*: a fosfolipase C (PLC) que é termolábil e outra termoestável chamada de ramnolipídeo. A primeira delas é inerente à espécie e é virtualmente produzida por todas as cepas. A PLC degrada principalmente fosfolipídeos que compõem o surfactante pulmonar, sendo um importante fator de virulência, particularmente para pacientes com infecções no trato respiratório por esse microrganismo. O ramnolipídeo age como um detergente degradando fosfolipídeos e em altas concentrações, atrai e destrói leucócitos e ainda é capaz de inibir os movimentos ciliares do trato respiratório (WOODS & VASIL, 1994).

A superfície do trato respiratório é protegida por uma malha de muco rica em fibronectina, para colonizá-lo a *P. aeruginosa* libera proteases que quebram aquela estrutura expondo os receptores onde as fimbrias podem se ligar. A *P. aeruginosa* faz uso de três classes de proteases para realizar exercer suas funções proteolíticas, a protease, a elastase e a protease alcalina, que diferem entre si pelo pH de funcionamento (WOODS & VASIL, 1994).

2.1.4. Epidemiologia

As infecções hospitalares são um dos principais problemas mundial de saúde, principalmente porque eleva as taxas de mortalidade e morbidade, tempo de internação e custos financeiros para o seu controle. Estudos realizados em países desenvolvidos e em desenvolvimento demonstraram que estas infecções representam de 5 a 10 % das hospitalizações (GARNER, 1996). Em centros hospitalares, a transmissão bacteriana pode ser de pessoa a pessoa ou através de alimentos, insetos, medicamentos, na maioria dos casos são microrganismos multirresistentes, sendo difícil de ser monitorada e controlada adequadamente (SEVERINO, DARINI & MAGALHÃES, 1999). A *P. aeruginosa* pode disseminar-se facilmente em ambientes hospitalares, pias, sanitários e alimentos, além de ser resistente a desinfetantes químicos, os anti-sépticos como composto de amônio quaternário, fenol e hexaclorofeno (CHUACHUEN *et al*, 2001). Essas fontes podem servir de focos de disseminação da *P. aeruginosa* em surtos epidêmicos dentro de hospitais, geralmente relacionados à falta de cuidados médicos e de funcionários do hospital, bem como descuido nos processos de esterilização e desinfecção.

A *P. aeruginosa* pode infectar virtualmente qualquer região do corpo em um paciente susceptível. Pode causar infecções de pele em queimados (MACEDO *et al.*, 2005) e

neonatos (FOCA *et al.*, 2007), infecções oculares (SIGEARS *et al.*, 2005), em feridas (BECK-SAGUÉ, BANEIJEE & JANDS, 1994), ossos e juntas (MADER *et al.*, 1994), trato urinário (KUNIN, 1994), ou em qualquer região onde os processos naturais de defesa estejam debilitados. Mas são nos pacientes com fibrose cística que a *P. aeruginosa* desenvolve todo seu potencial letal.

2.1.4.1 Fibrose Cística

A susceptibilidade de pacientes com fibrose cística (FC) a infecções pulmonares é conhecida desde as primeiras descrições da doença na década de 1930 (DEQUEKER *et al.*, 2002). A FC é a desordem letal hereditária mais comum na população caucasiana (BYE *et al.*, 1994). Segundo a organização mundial de saúde (OMS), a incidência da FC no Brasil em 2004 foi estimada em 1/6900 nascidos vivos (WHO, 2004).

A *P. aeruginosa* é o patógeno mais comumente associado com a morbidade e mortalidade em pacientes que sofrem de FC, causando infecções crônicas nos pulmões que, uma vez estabelecidas, são difíceis de erradicar mesmo com tratamento intensivo com antibióticos (HØIBY & FREDERIKSEN, 2000). As primeiras amostras mucóides de *P. aeruginosa* cultivadas datam do século passado, sendo obtidas de uma fistula de abscesso de vesícula biliar (SONNENSCHNEIN, 1927). Mas foi na década de 1960 que a variante mucóide foi isolada de pacientes com FC (DOGGETT, HARRISON & WALLIS, 1964; IACocca, SIBINGA & BARBERO, 1963). Até o advento da terapia antimicrobiana, a maioria dos pacientes com FC morria na infância por infecções estafilocócicas (GOVAN & DERETIC, 1996). Atualmente o maior problema para pacientes com esta afecção são as seqüelas causadas por infecções persistentes por *P. aeruginosa*. A colonização pela *P. aeruginosa*, particularmente as variantes mucóides produtoras de grandes quantidades de

alginate, é indicador de mau prognóstico para a doença, uma vez estabilizada, esta bactéria é dificilmente erradicada (GOVAN e DERETIC, 1996). De fato, a amostra mucóide de *P. aeruginosa* é tão fortemente associada com a FC que sua cultura oriunda de secreções respiratórias foi sugerida a ser quase um termo patognomônico para a doença (REYNOLDS *et al.*, 1976).

Todas as cepas não-mucóides, selvagens, de *P. aeruginosa* parecem ter potencial genético para produzir o alginato, tornando-se variantes mucóides (GOVAN *et al.*, 1978; ANASTASSIOU *et al.*, 1987). Durante a colonização inicial, a *P. aeruginosa* não é mucóide, sendo a persistência do microrganismo nos pulmões dos pacientes com FC responsável pela expressão do fenótipo mucóide (KOCH & HOIBY, 1993). Não se sabe ao certo em quanto tempo ocorre à mudança da forma selvagem para a mucóide. A variável temporal dessa emergência garante que esta mudança seja causada por um processo randômico de mutação, seguida de uma prevalência da variante mucóide em pacientes com FC (GOVAN & DERETIC, 1996). May *et al.*, 1991, notaram que algumas condições de crescimento “*in vitro*” como falta de nutrientes, presença de surfactantes e baixas concentrações de antimicrobianos poderiam estimular o desenvolvimento do fenótipo mucóide. Este fato reforça a idéia de que a produção de alginato e formação de estruturas sésseis como os biofilmes ajudariam estes microrganismos a se protegerem de ameaças externas.

2.1.5. Resistência a antimicrobianos

A produção de enzimas capazes de inibir o efeito de um largo espectro de antimicrobianos confere a *P. aeruginosa* grande poder patogênico e desperta o interesse de muitos pesquisadores. O uso indiscriminado de antibióticos β -lactâmicos nos últimos

cinquenta anos gerou uma grande pressão seletiva no ecossistema bacteriano, selecionando cepas multirresistentes produtoras de novas enzimas β -lactamases, codificadas por genes cromossômicos e plasmidiais. A emergência de bactérias multirresistentes é um problema que vem se ampliando e requer ações contínuas e mais eficazes para o controle das infecções nosocomiais. As bactérias multi drogas resistentes (MDRs) estão definidas como resistentes a três ou mais grupos de drogas antimicrobianas. Relatórios do Programa de Vigilância Antimicrobiana na América Latina e Brasil (SENTRY) referem que entre as bactérias mais preocupantes em relação à multi droga resistência são os bacilos não-fermentadores (*Acinetobacter* spp. e *Pseudomonas aeruginosa*) e as enterobactérias produtoras das β -lactamases de espectro estendido (ESBL) (SADER *et al.*, 2001). Os antimicrobianos carbapenêmicos são os agentes mais potentes usados em infecções por bactérias Gram-negativas devido ao seu amplo espectro de atividade e estabilidade à hidrólise pela maioria das β -lactamases, incluindo as de espectro ampliado (ESBLs-extended-spectrum- β -lactamases) (LIVERMORE, 1995).

Alguns isolados de *P. aeruginosa* são resistentes a vários se não a todos agentes antimicrobianos disponíveis. Em 1998, estudos microbiológicos demonstraram que isolados do *P. aeruginosa* já eram resistentes a todos antimicrobianos em um hospital do Rio de Janeiro, atualmente foram identificados 14 genes relacionados à resistência antimicrobiana (*Pseudomonas*, Projeto Genoma, 2004). Vários autores têm sugerido a vantagem do uso combinado de um aminoglicosídeo com um β -lactâmico (cefalosporina de terceira geração, monobactâmico ou um carbapenêmico) em relação a monoterapia beta-lactâmica, baseados no potencial sinergismo gerado por estas drogas “in vitro”, bem como na prevenção do desenvolvimento de resistência (GIAMARELLOU *et al.*, 1984;

GIAMARELLOU *et al.*, 1986; KLASTERSKY *et al.*, 1977; KLASTERSKY *et al.*, 1982; HOLLANDER *et al.*, 1997; MOUTON, 1999; WU *et al.*, 1999). Paul *et al.* (2004), realizaram um ensaio clínico randomizado pondo à prova a terapia conjugada e sugeriram que esta deve ser abandonada, pois, em seus estudos, os autores observaram que enquanto a mortalidade permanecia inalterada, os fatores de risco associados ao uso combinado aumentavam.

A *P. aeruginosa* possui quatro mecanismos distintos para defender-se dos mais diversos antimicrobianos. O primeiro deles seria a baixa permeabilidade da parede celular e da membrana externa que funcionam de barreira seletiva, devido por exemplo a mutações que bloqueiam a expressão das porinas, impedindo a entrada de agentes nocivos para dentro da célula bacteriana. O segundo mecanismo estaria relacionado à produção de enzimas “suicidas” que se ligariam irreversivelmente às moléculas antimicrobianas, inutilizando-as ou hidrolisando-as. Essas enzimas são produzidas por genes cromossômicos e plasmidiais e são conhecidas por β -lactamases, aminoglicosidases, cefalosporinases e carbapenemases. A terceira técnica de defesa utilizada pela *P. aeruginosa* é a modificação de proteínas de superfície receptoras de antibióticos. A mais conhecida dessas é a proteína ligadora de penicilinas. O quarto e último conhecido mecanismo nesta espécie seria o mecanismo de efluxo de antimicrobianos que bombeiam antibióticos para fora da célula bacteriana. O mais conhecido deles é o MexAB-OprM que bombeia para fora da bactéria uma série de antimicrobianos incluindo os β -lactâmicos, clorafenicol, quinolonas, macrolídeos, além de vários corantes e detergentes nocivos a vida do microrganismo. De fato, uma combinação do mecanismo de efluxo, perda da porina OprD e impermeabilidade a aminoglicosídeos

confere resistência a todos antimicrobianos anti-*Pseudomonas* conhecidos exceto polimixina (LIVERMORE, 2002).

2.1.6. Alginato

O alginato é um polissacarídeo gelatinoso produzido por espécies de *Pseudomonas spp.* (EVANS & LINKER, 1973) composto pelos ácidos D-manurônico e L-glicurônico ligados por uma ligação glicosídica do tipo β -1-4 (GACESA, 1988). Esta mesma substância é isolada de alguns tipos de algas marinhas marrons (LIN & HASSID, 1966) e utilizada largamente utilizada na indústria de alimentos como emulsificante, bem como para a farmacêutica para indigestão, assim como na preparação de moldes odontológicos.

A biossíntese do alginato pela *P. aeruginosa* é controlada pelo gene *algD*. O elemento chave regulação do *algD* e produção do alginato é o fator alternativo sigma *algT*, também conhecido como *algU* ou ainda σ^{22} . Este co-fator induz a expressão do *algD* e aumenta a expressão de proteínas reguladoras que amplificam a transcrição do *algD* (GOVAN & DERETIC, 1996). O *algT* está inserido em um operon que possui outros quatro genes: *mucA*, *mucB*, *mucC* e *mucD*. Qualquer mutação que ocorra em *mucA* (GOLDBERG *et al.*, 1993), *mucB* (MARTIN *et al.* 1993) ou *mucD* (WOOD & OHMAN, 2006) pode levar a bactéria a expressar o fenótipo mucóide. Isto sugere, portanto, que estes três genes exerçam uma regulação negativa sobre o *algT*. Variantes com mutações em *mucA* são fenotipicamente mais mucóides se comparados a mutantes de outros genes (B-D), sugerindo que o *mucA* é o principal fator responsável pela regulação do *algT* (MATHEE, MCPHERSON & OHMAN, 1997).

2.2. Biofilmes

A definição de biofilme evoluiu através dos últimos 25 anos, podendo ser atualmente descrito por uma comunidade microbiana sésil caracterizada por células que são aderidas irreversivelmente a um substrato, interface ou entre as mesmas, envolvidas por uma matriz composta por substâncias poliméricas extracelulares produzidas por elas e exibindo um fenótipo alterado a respeito da taxa de crescimento e transcrição gênica (DONLAN E COSTERTON, 2002). Em geral, biofilmes são estruturas altamente hidratadas (HOIBY *et al.*, 2001) compostos de 73% a 98% de materiais e espaços extracelulares (LAWRENCE *et al.*, 1991). O resultado são microscópicas edificações em forma de cogumelos que partem do substrato, compostas principalmente de alginato e cercadas de microscópicos canais de água que poderiam ser comparados com um sistema circulatório muito primitivo.

A maioria das bactérias cresce sob forma de biofilmes e estas bactérias sésseis diferem profundamente de suas companheiras planctônicas (COSTERTON, GEESEY & CHENG, 1978). Esta teoria não teve boa aceitação na época, mas o desenvolvimento tecnológico forneceu maiores esclarecimentos sobre o assunto e hoje é amplamente divulgada sua natureza ubíqua no ambiente e sua relação com infecções. O ciclo de desenvolvimento de um biofilme pode ser resumido em quatro fases: a iniciação, a maturação, a manutenção e a dissolução. Esta liberdade fenotípica permite que bactérias se adaptem às alterações impostas pelo meio ambiente ao qual estão submetidas (BRENO LEITE *et al.*, 2001). Os biofilmes são formados preferencialmente em ambientes de grande turbulência líquida (CHARACKLIS & MARSHALL, 1990). Os engenheiros especulam que as correntes turbulentas aumentam a aderência e formação do biofilme devido ao atrito

das células planctônicas sobre a superfície do substrato (DONLAN & COSTERTON, 2002).

A estrutura natural do biofilme e seus atributos fisiológicos conferem a este uma resistência inerente a agentes antimicrobianos. Hoyle *et al.*, 1992, demonstraram que células bacterianas dispersas eram 15 vezes mais susceptíveis a tobramicina que células em biofilmes intactos. Suci *et al.*, 1994, demonstraram uma penetração retardada de ciprofloxacina em biofilmes de *P. aeruginosa*. O que normalmente requeria 40 segundos numa superfície lisa tomava 21 minutos na mesma superfície impregnada pelo biofilme. Hatch e Schiller, 1998, mostraram que 2% de uma suspensão de alginato isolado da mesma bactéria, inibiam a difusão de gentamicina e tobramicina, efeito que podia ser revertido com o uso de alginato liase. Células bacterianas associadas à biofilmes crescem significativamente mais lentas que células planctônicas, como resultado, assimilam antimicrobianos mais devagar (DONLAN E COSTERTON, 2002). Anwar *et al.*, 1992, descobriram que biofilmes de *P. aeruginosa* mais velhos (10 dias de crescimento) eram significativamente mais resistentes a tobramicina e piperacilina que os mais jovens (2 dias de crescimento).

3. Objetivos

3.1. Geral

Estimar a prevalência e perfil de susceptibilidade antimicrobiana de isolados de *P. aeruginosa* provenientes de um hospital público de Recife-PE e verificar se a presença de Nitroprussiato de Sódio, doador de Óxido Nítrico, em concentrações nanomolares impede a formação de biofilmes por amostras mucóides *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de pacientes com fibrose cística.

3.2. Específicos

- Estimar a prevalência da *P. aeruginosa* sobre outras bactérias isoladas no Hospital das Clínicas de Pernambuco no período de Janeiro a Junho de 2008.
- Analisar as principais origens das amostras de onde foram isoladas a *P. aeruginosa* no Hospital das Clínicas de Pernambuco no período de Janeiro a Junho de 2008.
- Analisar o perfil de susceptibilidade antimicrobiana das amostras de *P. aeruginosa* registradas no Hospital das Clínicas de Pernambuco no período.
- Analisar a ação do óxido nítrico sobre biofilmes de amostras mucóides de *P. aeruginosa* de pacientes com fibrose cística.

4. Metodologia

4.1. Amostras Clínicas

As amostras clínicas de *P. aeruginosa* do Hospital das Clínicas de Pernambuco foram fornecidas pelo laboratório de bacteriologia da instituição. Por outro lado, as quatro amostras de pacientes com fibrose cística foram provenientes do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP), doadas pelo laboratório Marcelo Magalhães, que é responsável pelas amostras de pacientes com fibrose cística desse hospital. As amostras provindas do HC não são sítios específicos e foram isoladas de diversos tipos de secreções (Artigo I, Tabela 2), enquanto as do IMIP são específicas do trato respiratório de pacientes com Fibrose Cística. Por se tratar de um estudo microbiológico e morfofisiológico de um microrganismo, não existem relatos na literatura de determine um tamanho amostral (N) ideal para conclusão dos resultados. As amostras foram confirmadas através de cultura no meio de cultivo, seletivo para *P. aeruginosa*, Ágar Cetrimide. Foram analisadas e posteriormente estocadas em caldo BHI contendo 20% de glicerol a -20°C, servindo de base para estudos futuros.

4.2. Análise Epidemiológica da *P. aeruginosa* no HC

Foi realizado um estudo retrospectivo referente ao primeiro dia de Janeiro de 2008 até o último dia de Junho do mesmo ano, baseado em dados retirados do livro de registros de Secreções Diversas do Laboratório de Bacteriologia do Hospital das Clínicas de Pernambuco (HC). Os processos atuais de isolamento e identificação, bem como o antibiograma, praticados nesta instituição são manuais e o registro dos resultados na base de dados desse trabalho é manuscrito.

O perfil de resistência e sensibilidade para a *P. aeruginosa* foi separado por grupos de antimicrobianos, uma vez que a rotina do laboratório em questão parece não seguir um padrão definido.

Este estudo faz parte do projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, registro CEP/CCS/UFPE N° 015/08.

4.3. Concentração Inibitória Mínima (MIC)

É a concentração mínima necessária de um determinado antimicrobiano capaz de inibir o crescimento de um dado microrganismo. O ponto de corte utilizado para resistência/sensibilidade aos antimicrobianos será aquele proposto no décimo sétimo suplemento informacional do NCCLS (2007), o qual determina os padrões de desempenho para testes de susceptibilidade antimicrobiana (Tabela 1).

| Antimicrobianos | Ponto de corte para MIC ($\mu\text{g/ml}$) | |
|-----------------|--|----------|
| | Resistente | Sensível |
| Aztreonam | ≥ 32 | ≤ 8 |
| Ceftazidima | ≥ 32 | ≤ 8 |
| Cefotaxima | ≥ 64 | ≤ 8 |

4.4. Formação dos Biofilmes

Os biofilmes da *P. aeruginosa* foram formados “in-vitro” em lamínulas de vidro circulares estéreis de 10mm de diâmetro, dispostas no fundo dos poços de uma placa de 24 poços para cultivo de células (24-well Tissue Culture Plate by TPP). Sendo a capacidade volumétrica de cada poço de 3ml, estes foram preenchidos com 0,5ml de caldo BHI estéril e outros 0,5ml de um inóculo padrão contendo aproximadamente 10^5 bactérias por ml do mesmo meio de cultivo. Neste processo, foram utilizadas quatro amostras de pacientes com fibrose cística do IMIP, sendo duas delas mucóides e duas não-mucóides. Para a observação da ação do óxido nítrico, cada uma das amostras teve um poço repetido onde os 0,5ml meio estéril continham 1000nM de SNP, de forma que ao se adicionar outros 0,5ml de inóculo mantivesse uma solução final de 1ml de SNP 500nM. Da mesma maneira, poços contendo antimicrobianos (aqueles presentes na Tabela 1) foram feitos de maneira tal que ficassem em uma concentração final de 64 μ g/ml de meio. Como os biofilmes são formados preferencialmente em ambientes de grande turbulência líquida (CHARACKLIS & MARSHALL, 1990), as placas foram incubadas a 37°C por 48 horas sob rotação de 120 rpm na incubadora “Bio Shaker” BR-300LF (Bionexus®) do LIKA/UFPE. Para a análise da formação desses biofilmes foi utilizada a microscopia eletrônica de varredura (MEV).

4.5. Microscopia Eletrônica de Varredura

Após o período de incubação no “shaker”, a fase líquida (cultura bacteriana em meio líquido) foi desprezada em solução de hipoclorito de sódio 2%. Três lavagens sucessivas, de 10 minutos cada, foram realizadas utilizando-se tampão fosfato 0,1M em cada poço da placa de 24 poços que continham as lamínulas. Uma vez lavadas, as lâminas de vidro contendo os biofilmes foram fixadas em solução de Tampão fosfato 0,1M, contendo 2,5%

de Glutaraldeído (G.A) e 4% de Para-formaldeído (PFA). Após outras três lavagens, iguais as anteriores, as laminas foram então pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 0,1% em tampão fosfato 0,1M por 90 minutos. Decorrido este tempo, mais três lavagens idênticas foram realizadas preparando a amostra para posterior desidratação, utilizando-se uma série crescente de etanol a 30%, 50%, 70%, 90% e 100%. Para cada uma dessas etapas de desidratação foi utilizado um intervalo de 10 minutos para cada título, sendo a de etanol a 100% repetida três vezes. Desidratadas, as laminas passaram por um processo chamado ponto crítico para a substituição do etanol por dióxido de carbono e assim poder se obter a secagem completa do material para a metalização, realizada pela cobertura do material por uma fina camada de ouro que possibilita a visualização da superfície dos biofilmes bacterianos. Todas as lâminas foram analisadas em todas suas extensões a procura de biofilmes no Microscópio Eletrônico de Varredura do LIKA/UFPE.

5. Resultados

Os resultados desta dissertação serão apresentados em forma de artigos:

Primeiro Artigo: Análise epidemiológica da *Pseudomonas aeruginosa* entre isolados bacterianos do Hospital das Clínicas de Pernambuco

Segundo Artigo: “Biofilm Lifestyle: dispersion of mucoid biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients.”

5.1 Artigo I

“Análise epidemiológica de isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco”

Artigo Original que será Submetido para publicação na
Revista Brasileira de Terapia Intensiva

Página Título

Página Título

Análise epidemiológica de isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco
Epidemiologic analysis of clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from the Hospital das Clínicas of the Federal University of Pernambuco

Eduardo José Valença Cordeiro Pires¹
Valdemir Vicente da Silva Júnior²
Ana Catarina de Souza Lopes³
Dyana Leal Veras⁴
Larissa Espíndola Leite⁵
Maria Amélia Vieira Maciel⁶

¹Biomédico graduado pela Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e aluno de Mestrado em Medicina Tropical – UFPE

²Aluno de Graduação em Biomedicina – UFPE

³Médica Veterinária, Profª. Drª. da Disciplina de Microbiologia e Imunologia – UFPE

⁴Biomédica, Técnica do Laboratório de Microscopia Eletrônica – Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA)/UFPE

⁵Aluna de Graduação em Biomedicina – UFPE

⁶ Médica, Profª. Drª. do Departamento de Medicina Tropical – UFPE

Dados do Autor:

Eduardo José Valença Cordeiro Pires

Rua Hermógenes de Moraes, 264. Madalena, Recife-PE. Cep:50610-160

Fone: (81) 3446-1602/(81) 8805-2145

E-mail: eduardojvc@gmail.com

Resumo:

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS: A *Pseudomonas aeruginosa* é um patógeno oportunista que tem se destacado ao longo dos anos quanto à prevalência em casos de infecções hospitalares. Sua ampla resistência aos diversos grupos de antimicrobianos garante a este microrganismo um papel de destaque entre as bactérias mais prevalentes associadas à infecção nosocomial. O objetivo deste estudo foi realizar um levantamento epidemiológico da *P. aeruginosa*, bem como do seu perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC).

MÉTODO: Foi realizado um estudo retrospectivo baseado no livro de registro de secreções diversas do laboratório de bacteriologia do HC no período compreendido entre Janeiro a Junho de 2008. Entre os registros, identificamos aqueles que foram positivos para a *P. aeruginosa*, analisando sua origem e perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos utilizados na rotina daquele laboratório.

RESULTADOS: As bactérias mais frequentes, isoladas das secreções diversas, foram *P. aeruginosa* (26%) e *S. aureus* (25%). Quanto à origem, a *P. aeruginosa* foi isolada principalmente de infecções respiratórias, pois 33% das amostras positivas para esta bactéria foram provenientes de secreções traqueais e 21% nasais. Os antimicrobianos mais eficazes contra a *P. aeruginosa* foram: Amicacina, Imipenem, Meropenem e Aztreonam.

CONCLUSÕES: Estes resultados mostram uma alta prevalência da *P. aeruginosa*, no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco. Apesar de apresentar grande resistência a antimicrobianos mais antigos como as cefalosporinas de primeira e segunda geração, assim como clorafenicol, em geral, este patógeno demonstrou boa sensibilidade às drogas utilizadas na rotina deste hospital.

UNITERMOS: *Pseudomonas aeruginosa*, Resistência bacteriana a antimicrobianos, Infecção nosocomial.

Summary

BACKGROUND AND OBJECTIVES: The *P. aeruginosa* is an opportunist pathogen that has been taking place as one of most prevalent bacteria in hospital infection's cases. Its high rates of resistance to many antimicrobial drugs have given this microorganism the importance it deserves among other prevalent bacteria involved on nosocomial infection. The aim of this study was to analyze epidemiologic characteristics of *P. aeruginosa* and evaluate its susceptibility to antimicrobial agents at Clinic Hospital of Federal University of Pernambuco (HC).

METHODS: A retrospective study has been done based on the registry book of miscellaneous secretions from the bacteriology laboratory of HC on the period between January and June of 2008. Among these registers, were identified those positive samples for *P. aeruginosa*, identifying their origin and evaluating its susceptibility to antimicrobial drugs used on that laboratory's routine.

RESULTS: The most frequent bacteria, isolated from miscellaneous secretions, were *P. aeruginosa* (26%) and *S. aureus* (25%). As for the origin, the *P. aeruginosa* has been mainly isolated from respiratory infections, considering that 33% of the positive samples for this bacterium were from tracheal secretions and 21% were nasal. The most efficient antimicrobial drugs against the *P. aeruginosa* were: Amikacin, Imipenem, Meropenem and Aztreonam.

CONCLUSIONS: These results show a high prevalence of *P. aeruginosa* at the Clinic Hospital of Federal University of Pernambuco. Despite of the high rates of resistance to older antimicrobial agents, like the first and second generations of cephalosporins and clorafenichol, this pathogen has shown a good susceptibility to antimicrobial agents used on this hospital.

Key Words: *Pseudomonas aeruginosa*, Antimicrobial drugs resistance, Nosocomial Infections

Introdução

A *Pseudomonas aeruginosa* vem se destacando ao longo dos anos entre os agentes infecciosos mais freqüentemente isolados em ambientes hospitalares. Apesar do grande avanço tecnológico e do grande número de antimicrobianos conhecidos, bilhões de anos de evolução conferiram a este microrganismo mecanismos naturais e adquiridos de resistência que, por vezes, frustram a conduta terapêutica moderna.

A *P. aeruginosa* pode infectar qualquer região do corpo em um paciente susceptível. Pode causar infecções de pele em queimados¹ e neonatos², oculares³, em feridas⁴, ossos e articulações⁵, no trato urinário⁶ e, mais freqüentemente, infecções do trato respiratório^{7, 8, 9, 10, 11, 12}, ou ainda em qualquer região onde os processos naturais de defesa do organismo estejam debilitados. Dessa forma, pacientes em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) são particularmente mais susceptíveis a infecções pela *P. aeruginosa*. Esta bactéria pode disseminar-se facilmente em ambientes hospitalares, além de ser resistente a desinfetantes químicos e anti-sépticos como compostos quaternários de amônio, fenol e hexaclorofeno¹³.

Atualmente, é quase impossível falar em infecção hospitalar e não relatar a *P. aeruginosa*. Nas últimas quatro décadas, este microrganismo foi responsável por 10% de todos os casos de infecções nosocomiais relatados^{14, 15, 16}. Iniciado em 1997, o SENTRY (*Antimicrobial Surveillance Program*), é um estudo de vigilância de resistência aos antimicrobianos, que envolve centros médicos de todo o mundo⁷. Apesar dos esforços de vários pesquisadores envolvidos neste programa, dados brasileiros publicados na época não foram representativos da realidade do país¹⁷. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, os estudos multicêntricos incluíram poucos centros brasileiros e um número pequeno de amostras aquém da realidade de um país continental¹⁷. Em 1999, foi iniciado no Brasil o MYSTIC (*Meropenem Yearly Susceptibility Information Collection*), um programa anual de vigilância que visa comparar a atividade de vários agentes antimicrobianos de largo espectro entre centros médicos que utilizam carbapenênicos¹⁸.

Desta forma, estudos epidemiológicos ajudam na monitoração de microrganismos de grande potencial patogênico como a *P. aeruginosa*. Portanto, o objetivo deste estudo foi analisar a prevalência da *P. aeruginosa* entre outros microrganismos isolados de pacientes do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco entre os meses de Janeiro a Junho de 2008, bem como avaliar a sua origem e o seu

perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos utilizados na rotina do laboratório de bacteriologia do referido hospital.

Método

Foi realizado um estudo retrospectivo referente ao período de Janeiro à Junho de 2008, baseado em dados microbiológicos obtidos do livro de registros de Secreções Diversas do Laboratório de Bacteriologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (HC). As amostras clínicas procedentes de todas as enfermarias foram analisadas de acordo a sua procedência, mês e dados bacteriológicos.

A *P. aeruginosa* foi identificada através da análise das colônias microbianas suspeitas em Ágar Sangue de Carneiro (5%), em seguida, repicadas em meio seletivo e diferencial, Agar cetil-trimetil cloreto de amônio (cetrimide), juntamente a testes bioquímicos de produção de oxidase, motilidade e produção de piocianina, a fim de isolar e identificar o gênero e espécie do microrganismo envolvido na infecção. Foram contabilizados os diversos registros referentes a cada microrganismo, com o propósito de estimar a prevalência da *P. aeruginosa* sobre os demais isolados. Também foram analisadas amostras clínicas com registro positivo para a *P. aeruginosa*.

A análise do perfil de resistência e sensibilidade para a *P. aeruginosa* foi realizada através do método de Kirby-Bauer para leitura de difusão, de acordo com os critérios do *National Committee for Clinical and Laboratory Standards* (NCCLS) de acordo com os grupos de antimicrobianos (cefalosporinas, aminoglicosídeos, carbapenêmicos, quinolonas, sulfas, tetraciclina, além do Azteronam e Clorafenicol).

Este estudo faz parte do projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, registro CEP/CCS/UFPE N° 015/08.

Resultados

A *P. aeruginosa* foi o microrganismo mais freqüentemente isolado durante o referido período estando presente em um total de 182 (26%) das 701 amostras que apresentaram crescimento bacteriano satisfatório. Noventa e sete (53,3%) dessas 182 secreções foram de pacientes internados em unidades de terapia intensiva (UTI). O segundo microrganismo mais freqüente foi o *Staphylococcus aureus*, o qual esteve presente em 173 (25%) de culturas positivas. 136 (19%) não tiveram gênero ou espécie identificada e foram registrados como bacilos gram-negativos não fermentadores (BGNNF), alterando dessa forma um claro diagnóstico e introduzindo um viés de prevalência de microrganismos como a própria *P. aeruginosa*. Outros microrganismos como a *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Escherichia coli*, foram menos freqüentes nas diversas secreções (Tabela 1).

(Tabela 1)

Entre os 182 registros positivos para a *P. aeruginosa*, 60 (34%) foram isolados de secreções traqueais e 39 (21%) de secreções nasais. Outras origens menos freqüentes que as amostras respiratórias, foram [origem da amostra (%): Ponta de cateter (8%); Fragmento ósseo (7%); Ferida operatória (6%); Escaras de decúbito (6%); Ulcerações (6%); Leões de pele (3%); Escarro (2%); Secreção oftálmica (1%); e em outros 7% não houve registro da origem da amostra (Tabela 2)

(Tabela 2)

A análise do perfil de susceptibilidade antimicrobiana demonstrou que a *P. aeruginosa* apresentou, em geral, boa sensibilidade aos antimicrobianos utilizados na rotina do laboratório de bacteriologia do HC. Quanto ao grupo das cefalosporinas, a resistência foi inversamente proporcional à geração desses antibióticos. Entre as 182 amostras isoladas de *P. aeruginosa*, 181 foram testadas para a cefalotina (cefalosporina de primeira geração – C1), sendo 180 destas, resistentes. Para a cefoxitina (cefalosporina de segunda geração – C2), a razão de resistência foi ainda maior, de modo que 100% das 169 amostras não foram inibidas por esses antimicrobianos. Uma redução dessa elevada resistência começa a ser observada a partir da cefotaxima (cefalosporina de terceira geração – C3), onde 73% (125) das 170 amostras testadas foram resistentes e para a cefepima (cefalosporina de quarta geração – C4) este percentual foi de 45% (74) (Figura 1).

(Figura 1)

O nível de resistência para o grupo dos aminoglicosídeos foi menor em relação ao das cefalosporinas. Para a gentamicina, 46,6% (69) dos 148 isolados testados foram resistentes. Quanto à tobramicina, a sensibilidade foi ainda maior e 61,1% (88) das 144 amostras testadas foram sensíveis a esta droga. Já para a amicacina, apenas 15,4% (26) das 169 *P. aeruginosa* testadas não foram inibidas por este antibiótico (Figura 2).

(Figura 2)

As amostras dos pacientes do HC demonstraram boa sensibilidade aos antimicrobianos carbapenêmicos no período analisado. Entre as 77 amostras avaliadas quanto à susceptibilidade ao imipenem, 63 (81,8%) destas foram sensíveis ao antibiótico. Apenas 29 amostras foram testadas frente ao meropenem, porém 23 (79,3%) destas foram inibidas por ação desta droga. Para o ertapenem o número testado foi ainda menor (19) e a sensibilidade a este antimicrobiano foi de 42,1% (Figura 3).

(Figura 3)

Outros antimicrobianos utilizados na rotina do antibiograma do laboratório de bacteriologia do HC são [antibiótico (% sensível)]: Aztreonam (74,4%); Ciprofloxacina (47,1%); Sulfametoxazol (13,5%); Tetraciclina (0%); e Clorafenicol (8,0%) (Figura 4).

(Figura 4)

Discussão

A bactéria mais isolada de secreções diversas do Hospital das Clínicas de Pernambuco foi *P. aeruginosa*, seguida de *S. aureus*. Lisboa e col.¹⁹ realizando um estudo de prevalência em 16 unidades de terapia intensiva do Estado do Rio Grande do Sul, determinaram que 122 pacientes estavam infectados e 51(29%) desses adquiriram a infecção na própria UTI. Os microrganismos mais relatados foram o *S. aureus* (42%) e a *P. aeruginosa* (31%). Poucos anos antes, Sader e col.⁷, levantaram dados de 11 hospitais brasileiros entre 1997 e 1998 como parte do programa SENTRY, avaliando um total de 525 amostras bacterianas de trato respiratório inferior de pacientes internados naqueles estabelecimentos. As cinco espécies mais frequentes foram (n/%): *Pseudomonas aeruginosa* (158/30,1%), *Staphylococcus aureus* (103/19,6%), *Acinetobacter spp.* (68/13,0%), *Klebsiella spp.* (50/9,5%), e *Enterobacter spp.* (44/8,4%). Na América do Norte, Hoban e col.¹⁴, também levantaram dados epidemiológicos naquela região relacionados ao SENTRY, os autores estudaram 2712 amostras isoladas de pacientes com pneumonia em 30 centros médicos diferentes (25 nos Estados Unidos e 5 no Canadá). Mais de 30 microrganismos foram identificados entre as amostras, sendo o *S. aureus* (28%) e a *P. aeruginosa* (20%) os microrganismos mais prevalentes. Mais recentemente, Kiffer e col. (2005) realizaram um estudo de susceptibilidade de bactérias Gram-negativas envolvidas em infecções nosocomiais como parte da quarta edição do programa MYSTIC Brasil 2003, sendo a *P. aeruginosa* (30,3%) o microrganismo mais prevalente entre os 1550 isolados estudados¹⁸.

A *P. aeruginosa* parece ter um apurado tropismo pelo trato respiratório. No corrente estudo, foi possível observar que mais de 50% das amostras foram de origem respiratória, se considerarmos secreções nasais e traqueais juntas. Mas seria isto de fato um tropismo desse microrganismo? Ou simplesmente uma facilitação da infecção pela condição do paciente internado? Em primeiro lugar, devemos lembrar que esta bactéria é aeróbia facultativa, mas cresce preferencialmente na presença de oxigênio. Como foi dito, a *P. aeruginosa* é um patógeno essencialmente oportunista e o indivíduo hospitalizado encontra-se debilitado não só pela condição do enfermo, mas também por fatores hospitalares como ventilação mecânica, medicações e a própria condição emocional de internação. A superfície do trato respiratório é protegida por uma malha de muco rica em fibronectina, para colonizá-lo a *P. aeruginosa* libera proteases que quebram aquela estrutura

expondo os receptores onde as fimbrias podem se ligar. Tecidos danificados ou irritados por uma virose, por exemplo, facilitam o processo de colonização e esse mecanismo recebe o nome de aderência oportunista¹⁹.

Visando avaliar a causa de pneumonias por ventilação mecânica, Guimarães e Rocco¹², realizaram um estudo em 278 pacientes internados no Centro de Tratamento Intensivo da Unidade Médico Cirúrgica do Hospital Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, que já estariam a mais de 24 horas respirando por ajuda de aparelhos. Entre outros fatores, 45,3% das pneumonias foram atribuídas a infecções causadas por bactérias Gram-negativas, entre as quais, o mais presente foi a *P. aeruginosa* que representou 22% daquele percentual. Outro estudo realizado na Universidade Estadual de São Paulo por Villas Boas e Ruiz²¹, teve por objetivo avaliar a ocorrência de infecções hospitalares e fatores de riscos associados a estas no hospital universitário da referida instituição entre Setembro de 1999 e Fevereiro de 2000. A maior prevalência de infecção foi a do tipo respiratório que acumulou 27,6% dos casos de infecção desse estabelecimento e o microrganismo mais presente foi a *P. aeruginosa* que apareceu em 37,5% das amostras infectadas. Em Fortaleza-CE, resultados, não muito diferentes dos já citados, pôde ser observado por Menezes e col.²² ao realizarem um estudo de frequência das bactérias isoladas no Hospital Geral de Fortaleza no período de Janeiro a Dezembro de 2002. As bactérias mais frequentes das secreções traqueais foram a *P. aeruginosa* (16%) e a *K. pneumoniae* (15%). Durante os quatro primeiros anos do programa SENTRY, Gales, Sader e Jones²³ levantaram dados de hospitais em toda America Latina com o propósito de avaliar a frequência de ocorrência dos principais patógenos associados a pneumonias. Ao final do estudo os autores constataram que os microrganismos mais frequentes foram (n/%) : *Pseudomonas aeruginosa* (659/26.3%), *Staphylococcus aureus* (582/23.3%), *Klebsiella pneumoniae* (255/10.2%), *Acinetobacter spp.* (239/9.6%), e *Enterobacter spp.* (134/5.4%). Entre as 1550 amostras analisadas por Kiffer e col.¹⁸, 265 foram isoladas do trato respiratório, entre as quais, 121 (45,7%) foram positivas para a *P. aeruginosa*. Portanto, a condição do paciente internado, sob ventilação mecânica ou não, deve ser considerado como um fator de predisposição para a infecção pela *P. aeruginosa* em vias aéreas, da mesma forma que a adaptabilidade deste microrganismo à infecção destas vias não deve ser negligenciada. Em outras palavras, a alta prevalência deste microrganismo no trato respiratório, não deve ser explicada unicamente pela deficiência imunológica do paciente internado, mas também pela facilidade de infecção ligada ao microrganismo.

O percentual de resistência a *P. aeruginosa* a cefepima no presente estudo é de 45%, resultados do estudo de Figueiredo e col (2007), demonstram uma taxa de resistência de 58% no período de 2005 a 2006 no mesmo hospital, sugerindo assim que a resistência a esta cefalosporina está aumentando.

Em seus estudos, Leiser, Tognim e Bedendo¹¹, obtiveram resultados semelhantes quanto à resistência as cefalosporinas entre as amostras testadas de *P. aeruginosa* de UTI. Embora o artigo não traga dados sobre as C1, não foi observada sensibilidade das amostras testadas frente às C2 e 100% das amostras testadas eram resistentes. Para C3, obtiveram uma sensibilidade de apenas 15% e para C4, 34,5% das *P. aeruginosa* testadas foram sensíveis. Sader e col.⁷, também relataram forte resistência às C1 e C2, não havendo registro de sensibilidade para estas drogas. Os mesmos observaram uma sensibilidade de apenas 5% à Ceftriaxona (C3), mas 57,6% das amostras testadas para a Ceftazidima (C3) foram sensíveis e 63,9% à Cefepima (C4).

Sader e col.⁷ utilizaram os mesmos aminoglicosídeos, que são utilizados na rotina HC, em seus estudos. Eles observaram sensibilidade à gentamicina em 56,3% das amostras de *P. aeruginosa* testadas; à tobramicina em 59,5% dos casos; e à amicacina em 63,9% dos isolados. Na América do Norte, Hoban e col.¹⁴, constataram que o antimicrobiano mais eficaz para a *P. aeruginosa* em seus estudos foi a amicacina com 93,7% de sensibilidade. Em seguida, a tobramicina foi a que mais inibiu este patógeno, obtendo uma sensibilidade de 90,2%.

A introdução de antimicrobianos carbapenêmicos na prática clínica representou um grande avanço no tratamento de infecções causadas por bactérias resistentes a outros β -lactâmicos²⁴. Assim, os carbapenêmicos constituem a terapia antimicrobiana de escolha para tratamento de infecções hospitalares graves causadas por gram-negativos²⁴. Sader e col.⁷ relataram uma sensibilidade de 66,5% ao imipenem e de 69% ao meropenem. Na América do Norte, Hoban e col.¹⁴ constataram que 89,1% das amostras testadas foram sensíveis ao meropenem e para o imipenem esta sensibilidade foi de 85,6%. Gales, Sader e Jones²² também registraram uma boa ação do carbapenêmico meropenem e relataram uma sensibilidade a este composto de 71,6%. Apesar de animadores, estes dados contrastam com outros relatos de ampla resistência à carbapenêmicos, devido principalmente à produção de metallo- β -lactamases^{26,27}.

Conclusões:

Os resultados acima discutidos sugerem uma alta prevalência da *P. aeruginosa* no Hospital das Clínicas de Pernambuco. Pode-se observar também que o trato respiratório é o mais afetado por infecções causadas por esta bactéria. Apesar de muito resistentes a alguns antimicrobianos, a *P. aeruginosa* apresentou no geral uma boa sensibilidade as drogas testadas. Portanto, não se justifica o uso exacerbado de antimicrobianos de última geração, uma vez que o controle rigoroso de vias de disseminação desse e outros patógenos, assim como o uso adequado dessas drogas antimicrobianas podem romper o alastramento de infecções por esses microrganismos.

TABELAS E GRÁFICOS:

Tabela 1 **Freqüência dos diversos microrganismos isolados das amostras de secreções diversas do HC entre Janeiro e Junho de 2008**

| Microrganismo | N° de Isolados | % isolado* |
|-------------------------------|-----------------------|-------------------|
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 182 | 26% |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 173 | 25% |
| <i>BGNF</i> | 136 | 19% |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 97 | 14% |
| <i>Proteus mirabilis</i> | 80 | 11% |
| <i>Escherichia coli</i> | 30 | 4% |
| Outros | 132 | 19% |

* O percentual (%isolado) refere-se ao numero de microrganismos isolados dividido pelo total de culturas positivas (701).

Tabela 2 **Frequência da origem das secreções de onde se isolou a *P. aeruginosa* no HC entre Janeiro e Junho de 2008**

| Origem da Amostra | Quantidade | %* |
|--------------------------|-------------------|-----------|
| Sec. Traqueal | 60 | 33% |
| Sec. Nasal | 39 | 21% |
| Ponta de Catéter | 14 | 8% |
| Fragmento Ósseo | 12 | 7% |
| Ferida Operatória | 11 | 6% |
| Escáras de Decúbito | 11 | 6% |
| Ulcerações | 11 | 6% |
| Lesões de Pele | 6 | 3% |
| Escarro | 3 | 2% |
| Secreção Oftálmica | 2 | 1% |
| Outros | 13 | 7% |

* Percentual relativo a razão entre a quantidade de cada tipo de secreção e o total de amostras positivas para *P. aeruginosa* (182)

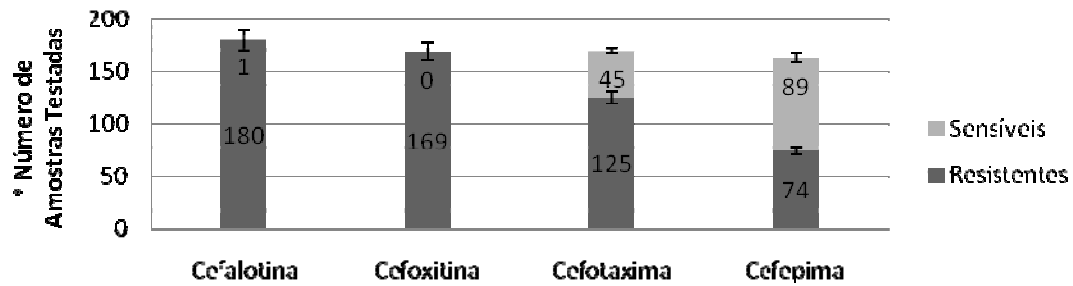


Figura 1 - Perfil de susceptibilidade às Cefalosporinas para as amostras testadas de *P. aeruginosa* no HC entre Janeiro e Junho de 2008.

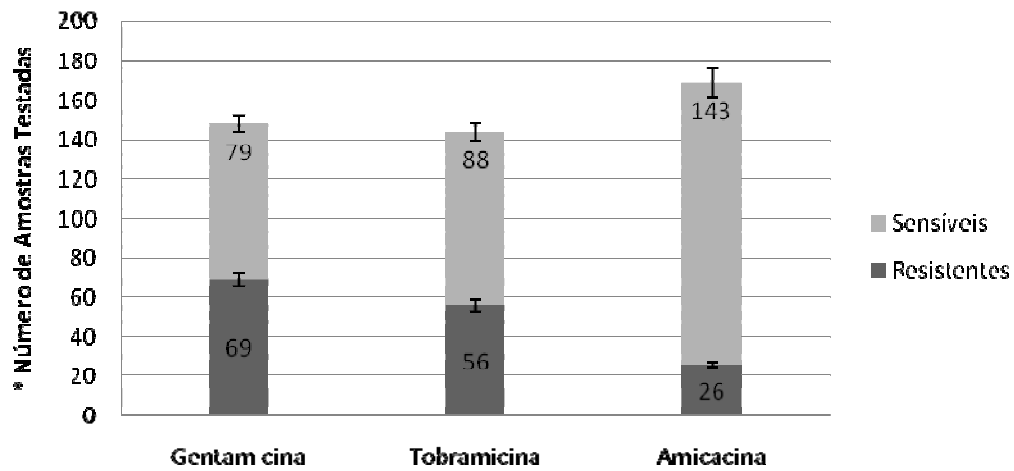


Figura 2 - Perfil de susceptibilidade aos Aminoglicosídeos para as amostras testadas de *P. aeruginosa* no HC entre Janeiro e Junho de 2008.

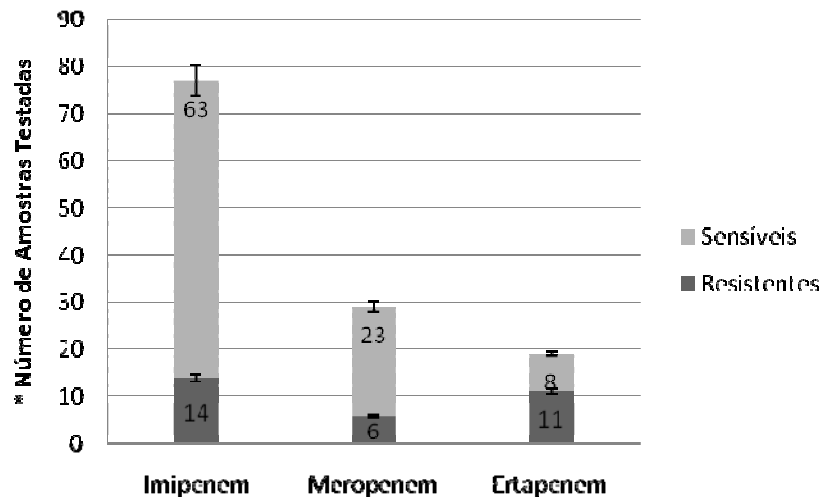


Figura 3 - Perfil de susceptibilidade aos Carbapenêmicos para as amostras testadas de *P. aeruginosa* no HC entre Janeiro e Junho de 2008.

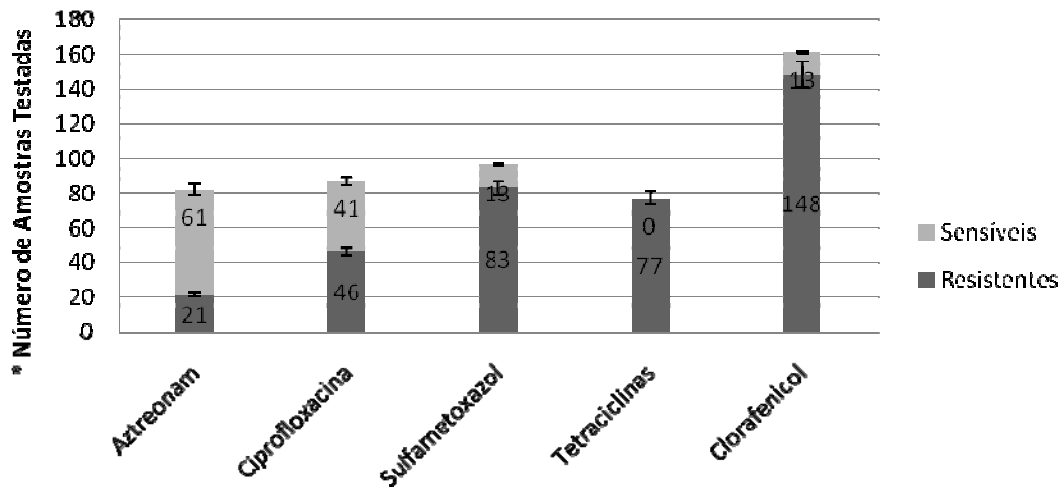


Figura 4 - Outros antimicrobianos e seus devidos perfis de susceptibilidade para as amostras testadas de *P. aeruginosa* no HC entre Janeiro e Junho de 2008.

Referências

1. Macedo JLS, Rosa SC, Macedo KCS, *et al.* - Fatores de risco da sepse em pacientes queimados. *Rev. Col Bras Cir*, 2005; 32(4): 173-7.
2. Foca, M, Jakob K, Whittier S, Latta PD, Factor S, Rubenstein D, and Saiman L - Endemic *Pseudomonas aeruginosa* Infection in a Neonatal Intensive Care Unit. *The new England Journal of Medicine*, 2007; 343: 695-700.
3. Sigears AD, Alarcon I, and Fleiszig J - Relative Roles of Flagellin and Swimming Motility in Corneal Infection by *Pseudomonas aeruginosa*. *Invest Ophthalmol*, 2005; 46.
4. Beck-Sagué CM, Banejee SN and Jands WR - Epidemiology and control of *Pseudomonas aeruginosa* in U.S. hospitals. *Pseudomonas aeruginosa Infections and Treatment*, 1994; 51-71.
5. Mader JT, Vibhagool A, Mader J and Calhoun JH - *Pseudomonas aeruginosa* bone and joint infections. *Pseudomonas aeruginosa Infections and Treatment* 1994; 293-326.
6. Kunin CM - Infections of the urinary tract due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Pseudomonas aeruginosa Infections and Treatment*, 1994; 237-256.
7. Sader HS, Mendes RE, Gales AC, Jones RN, Pfaller MA, Zoccoli C, *et al* - Perfil de sensibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas do trato respiratório baixo de pacientes com pneumonia internados em hospitais brasileiros: resultados do Programa SENTRY, 1997 e 1998. *J Pneumol*, 2001; 27: 59-67.
8. Teixeira PJZ, Teixeira F, Baroni D, *et al.* - Pneumonia associada à ventilação mecânica: impacto da multirresistência bacteriana na morbidade e mortalidade. *J. bras. pneumol*, 2004; 30(6): 540-8.
9. Toufen CJ, Dresler AL, Aires S, *et al.* - Prevalence rates of infection in intensive care units of a tertiary teaching hospital. *Rev Hosp Clin*, 2003; 58(5): 254-9.
10. Oliveira LCBS, Carneiro PPM, Fischer RG, *et al.* - A presença de patógenos respiratórios no biofilme bucal de pacientes com pneumonia nosocomial. *Rev bras ter intensiva*, 2007; 19(4): 428-433.
11. Leiser JJ, Tognim MCB, Bedendo J - Infecções hospitalares em um centro de Terapia Intensiva de um hospital de ensino no norte do Paraná. *Cienc Cuid Saúde*, 2007; 6(2): 181-6.
12. Guimarães MMQ e Rocco JR - Prevalência e prognóstico dos pacientes com pneumonia associada à ventilação mecânica em um hospital universitário. *J bras Pneumol*, 2006; 32(4): 339-346.
13. Chuanchen R., Beilinch K, Hoang TT, Becher A - Cros- resistance triclosan and antibiotics in *P. aeruginosa* is mediated by multidrug efflux pumps *Antimicrob Agents Chemother*, 2001; 45: 428-432.
14. Hoban DJ, Biedenbach DJ, Mutnick AH, Jones RN - Pathogen of occurrence and susceptibility patterns associated with pneumonia in hospitalized patients in North America: results of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Study (2000). *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2003; 45(4): 279-85.
15. Andrade D, Leopoldo VC, Haas VJ - Ocorrência de bactérias multiresistentes em um Centro de Terapia Intensiva de Hospital Brasileiro de Emergências. *Rev Bras Ter Intensiva*, 2006; 18(1): 31-7.

16. Figueiredo-Mendes CM, Sinto S, Mello-Sampaio JL, Cardoso-Leao S, Oplustil CP, Turner P, Veiga-Kiffer CR. *Pseudomonas aeruginosa* clonal dissemination in Brazilian intensive care units. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2005; 23(7): 402-5.
17. ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2005). PROJETO DE IMPLANTAÇÃO DA REDE NACIONAL DE MONITORAMENTO DA RESISTENCIA MICROBIANA EM SERVIÇOS DE SAÚDE. Termo de Cooperação ANVISA/OPAS. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/hsentinelaprojeto_rede_microbiana.pdf.
18. Kiffer C, Hsiung A, Oplustil JS, Sakagami E, Turner P, Mendes C and the MYSTIC Brazil Group - Antimicrobial Susceptibility of Gram-Negative Bacteria in Brazilian Hospitals: The MYSTIC Program Brazil 2003. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 2005; 9(3):216-224.
19. Lisboa T, Faria M, Hoher JÁ, *et al.* - Prevalência de infecção nosocomial em Unidades de Terapia Intensiva do Rio Grande do Sul. *Rev. bras. ter. intensiva*, 2007; 19(4): 414-420.
20. Ramphal R, Small PM, Shands JWJR, Fischlschweiger W and Small PAJR - Adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to Tracheal Cells Injured by Influenza Infection or by Endotracheal Intubation Infection and Immunity, 1980; 614-19.
21. Villas Boas PJF e Ruiz T - Occurrence of hospital infection among interned elderly in a university hospital. *Rev. Saúde Pública*, 2004; 38(3): 372-378.
22. Menezes EA, Miranda K, Cunha FA, *et al.* - Frequência e percentual de suscetibilidade de bactérias isoladas em pacientes atendidos na unidade de terapia intensiva do Hospital Geral de Fortaleza. *J. Bras. Patol. Med. Lab*, 2007; 43(3): 149-155.
23. Gales AC, Sader HS, Jones RN - Respiratory tract pathogens isolated from patients hospitalized with suspected pneumonia in Latin America: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility profile: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2000). *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2002; 44(3): 301-11.
24. Kahan FM, Kropp H, Sundelof JG and Birnbaum J - Thienamycin: development of imipenem-cilastatin. *Antimicrob. Agents Chemother*, 1983; 12(Suppl. D): S1-S35
25. Bradley JS, *et al.* - Carbapenems in clinical practice: a guide to their use in serious infection. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 1999; 11: 93-100.
26. Sader HS, Reis AO, Silbert S, Gales AC - IMPs, VIMs and SPMs: the diversity of metallo- β -lactamases produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian hospital. *Clin Microbiol Infect*, 2005; 11: 73-6.
27. Crespo MP., Woodford N, Sinclair A, Kaufmann ME, Turton J, Glover J, Velez JD, Castañeda CR, Recalde M, Livermore DM - Outbreak of Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Producing VIM-8, a Novel Metallo- β -Lactamase, in a Tertiary Care Center in Cali, Colombia. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004; 42(11): 5094-5101.

5.2 Artigo II

“Biofilm Lifestyle: dispersion of mucoid biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients.”

Artigo Original que será Submetido para publicação na
Revista “ Letters in Applied Microbiology”

“Biofilm Lifestyle: dispersion of mucoid biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients.”

Eduardo José Valença Cordeiro Pires

Maria Amélia Vieira Maciel

Ana Catarina de Souza Lopes

Valdemir Vicente da Silva Júnior

Fábio Brayner dos Santos

Marcelo Magalhães

Murilo Amorim de Brito

Department of Tropical Medicine and Immunopathology Laboratory Keizo Asami (LIKA),
Federal University of Pernambuco, Recife-PE, Brazil.

Correspondence:

Eduardo José Valença Cordeiro Pires
264, Hermógenes de Morais Str.
Madalena, Recife-PE - 50610-160, Brazil.
E-mail: eduardojvc@gmail.com
Phone: 55 81 88052145/55 81 34461602

Present Address:

Maria Amélia Vieira Maciel
Center of Health Science
Department of Tropical Medicine
Hospital das Clínicas, Bloco-A. Prof. Moraes Rego Avenue
Cidade Universitária, Brazil.
E-mail: amelia57@gmail.com

Abstract

Aim: The major objectives of this study were to evaluate if 500nM of sodium nitroprusside (SNP) as nitric oxide (NO) donor as well as if lower or equal MICs titles of antimicrobial drugs could avoid biofilm formation by mucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis' patients.

Methods and Results: Biofilms were grown on glass slides located inside a 24-well Tissue Culture Plate using brain heart infusion (BHI) broth as culture media. Then, along with positive and negative controls, each strain has been challenged against 500nM of SNP as well as with 64µg/ml of Ceftazidime, Cofotaxime and Aztreonam and incubated by rotation of 120rpm at 37°C. The slides were consequently processed for electronic scan microscopy analysis. Biofilms were successful grown and mucoid ones have shown to be far complex than nonmucoid ones. For both phenotypes of *P. aeruginosa*, no biofilm formation could be observed on slides that were treated with SNP or those containing the antimicrobial agents.

Conclusions: SNP has proven to be efficient to avoid biofilm formation as by nonmucoid strains of *P. aeruginosa* as for those robust mucoid ones. Thus, nitric oxide action must not be on alginate binding properties. In addition, though high titles of antimicrobial agents could not kill those strains, they have proved to be efficient on avoiding biofilm formation on lower concentrations.

Significance and Impact of the Study: Once mucoid *P. aeruginosa* forms thicker biofilms than nonmucoid, by intercepting its formation a new hope for those cystic fibrosis patients would appear.

Introduction

Bacterial biofilms have been reported all over the world as a huge economic problem to industries, as they strongly bind to water pipes, becoming extremely hard to be eradicated (Carpentier and Cerf 1993).

Moreover, this bacterial behavior has led modern antimicrobial chemotherapy to a new reality, once biofilms can greatly improve bacterial resistance to antimicrobial agents. In addition, this bacterial mode of growth has been reported to attach to many different medical apparatus like implants and catheters (Ory *et al.* 1987; Croizé *et al.* 1989; Sheretz *et al.* 1990; Curtin *et al.* 2003). The term biofilm could be defined as a sessile group of microorganisms that grows attached to a substrate surface, or to each other, for mutual advantages, raising their defenses against external agents. Brooun, Liu, and Lewis (2000) have shown that bacteria embedded on biofilms could be a thousand times more resistant to antimicrobial agents than planktonic bacterial cells.

Pseudomonas aeruginosa is an opportunistic pathogen that grows preferentially forming biofilms (Costerton 1984). Although *P. aeruginosa* inflicts many different immune-compromised patients, are on cystic fibrosis (CF) cases that this bacterium can turn these patients' lives into a nightmare (Lyczak, Cannon and Pier 2002). Very common to Caucasian populations (Bye, Ewig and Quittell 1994), CF is an inherited, recessive lethal disorder that commonly affects the lungs, turning them more prone for bacterial infections. Even though a CF lung can be infected by several different microorganisms like *Staphylococcus aureus* (Moisan *et al.* 2006) and *Burkholderia cenocepacia* (Pirone *et al.* 2008), *P. aeruginosa* is by far the most prevalent bacterium on CF patients. Earlier infections are normally caused by wild strains of *P. aeruginosa* and are quite easy to be eliminated from the organism by correct antimicrobial treatment. The fail of this therapy can lead to a chronic infection that normally occurs when those wild-types of *P. aeruginosa* mutate into a mucoid variant.

It seems that all nonmucoid *P. aeruginosa* has the potential to transform into a mucoid-type (Govan and Fyfe 1978), which is characterized by alginate overproduction. This sticky substance can be produced by all strains of *P. aeruginosa* (Evans and Linker 1973; Gacesa 1988) and normally by mutation of a Sigma factor (Govan and Deretic 1996), which regulates its synthesis, alginate is freely produced. It is not known exactly

when this mutation happens or what precisely leads to it, but once established, infections from these mutants are virtually impossible to be expelled from the organism, often leading its host to his death.

Thus, the dispersion of biofilms would be of great importance, mainly for those formed by pathogens as dangerous as the mucoid *P. aeruginosa*. Barraud *et al.* (2006), have successfully dispersed standard, wild type biofilms of this bacterium using nanomolar concentrations of Sodium Nitroprusside (SNP) as Nitric Oxide donor. Once it worked for wild strains, optimal concentrations of SNP reached by the authors will be used first to mucoid and nonmucoid variants of *P. aeruginosa* from Cystic Fibrosis patients.

Materials and methods

Bacterial strains and growth conditions

P. aeruginosa strains have been gently donated by the laboratory responsible (Marcelo Magalhães) for clinical analysis of samples from CF patients of the Integral Medical Institute Professor Fernando Figueira (IMIP), Recife-PE, Brazil (Table 1). Those were then grown on disposable Petri dishes containing Cetrimid Ágar, selective for *P. aeruginosa* and incubated at 37°C for 24 hours. Isolated colonies were then picked on maintenance media and kept at 5°C as well as on eppendorfs with *Brain Heart Infusion* broth containing 20% of Glycerine at -20°C for further studies.

Minimal Inhibitory Concentration (MIC)

Determined as the minimal antimicrobial drug concentration capable of stop the growth of some microorganism, the MIC procedures used on this study followed rigorously the steps for microdilution test present on the seventh edition of the Approved Standard by the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS 2006). The breakpoints used to determine the antimicrobial susceptibility of the strains were those present on the Seventeenth Informational Supplement (NCCLS 2007). For convenience, the antimicrobial drugs used on this study were: Ceftazidime; Cefotaxime and Aztreonam. *P. aeruginosa* ATCC® 27853 has been used as antimicrobial drugs quality control. The reading of the plates has been done by a Microplate Reader Spectrophotometer.

Biofilm Formation

P. aeruginosa biofilms were grown “in-vitro” on rounded sterile glass slides with 10mm diameter, disposed at the bottom of a 24-well Tissue Culture Plate (*Techno Plastic Products* - TPP®). This technique provides

easily changing conditions where biofilms could be exposed. Each well containing a slide was filled with 0,5ml of sterile BHI broth plus the same volume of a standard prepared inoculum containing approximately 5×10^5 bacteria per milliliter of the same media. Each strain was inoculated on five different wells, where that sterile broth could vary on its composition. One had pure media, used as positive control and the others had [substance (concentration per milliliter of media)]: SNP (1000nM); Ceftazidime (128 μ g); Cefotaxime (128 μ g) and Aztreonam (128 μ g). These wells had twice the final desired concentration, so after inoculation it reached the needed standard. Biofilms are formed preferentially on very shear liquid environment (Characklis and Marshall 1990), thus plates were incubated at 37°C for 48 hours under 120rpm at Bio Shaker BR-300LF (Bionexus®).

Electron Scan Microscopy

After incubation, liquid phase has been discarded on 2% sodium hypochlorite (NaClO) solution. After that, three washes of 10 minutes each have been done using phosphate buffer solution (PBS) 0,1M. Once washed, slides were then fixed on solution of the same buffer containing 2,5% Glutaraldehyde and 4% of Paraformaldehyde for one hour at room temperature and then for overnight at 4°C. Another three washes, identically as before, were consequently executed. Later, osmium postfixation has been established using 0,1% of osmium tetroxide (OsO₄) on PBS 0,1M for 90 minutes. This solution was properly discarded and three more washes have been done. Dehydration was then carried on using an ascendant title of ethanol (C₂H₅OH) of 30%, 50%, 70%, 90% and 100%, for 10 minutes each, being the last step repeated three times. Once fully dehydrated, slides were submitted to a critical point procedure for drying, where the ethanol is completely over placed for carbon dioxide (CO₂). Dried slides containing biofilms were now prepared for metallization and further observation at an Electron Scan Microscope.

Results

Biofilm formation by *P. aeruginosa*

The technique used on this study to build in-vitro biofilms was unique. Those separate small wells have perfect fitted the rounded glass slides, not mentioning the low price and time cost of the process. The results indicate that both phenotypes of *P. aeruginosa* were capable of forming biofilms.

Electron photomicrography of the nonmucoid slides have shown that most of its extension were composed by few isolated groups of bacteria, but alginate production and biofilm formation has been observed for the two nonmucoid strains of *P. aeruginosa* analyze (Picture 1). Alginate structures of these bacteria were though far less complexes if compared to mucoid types. In addition, these nonmucoid buildings were also less populated if compared with the mucoid variant.

Alginate overproduction on the other hand has given birth to complex, thick, bacterial buildings all over the slides (Picture 2). The structures constructed by these sticky bacteria remember a spider's web and microcolonies (Picture 2B) could be compared as the eggs nest. These small aggregates of bacteria start its formation by single cell binding to substrate surface and by spread and alginate hyper production those robust buildings are formed. Glass surface on these strains were covered by a thin slime of alginate that seems to work as a harbor for these bacteria (Picture 3).

Biofilm avoidance by Nitric Oxide

Sodium Nitroprusside has successfully inhibited biofilm formation as for nonmucoid *P. aeruginosa*, as for those expressing the mucoid phenotype. Slides treated with this substance had scarce isolated bacteria laying over the surface, but no biofilm mode of growth has been observed (Picture 4).

Biofilm dispersion by antimicrobial agents

Despite the fact that all strains were resistant to more than 64µg/ml, very often higher than 256µg/ml of the antimicrobial agents tested (Table 1), 64µg/ml was sufficient to eliminate biofilm formation of every bacterial strain analyzed on this study (Picture 5).

Discussion

The present study has shown that even those complex, mucoid biofilms of *P. aeruginosa* could be dispersed by nanomolar concentrations of SNP as nitric oxide donor. This data similar to those findings from Barraud *et al.* (2006), which have successfully used that substance to abolish biofilm formation by standard wild-type strains of *P. aeruginosa*. Although alginate involvement on *P. aeruginosa* attachment has been proposed by Costerton, Brown and Sturgess in 1979, it was in 1987 that Ramphal, Guay and Pier have proved the bidding enhancement promoted by mucoid strains to cilia of respiratory epithelial cells as well as to airways' mucus. Thus, alginate production is straightly linked to bacterial capacity to bind to a substrate and mucoid biofilms

should resist better to NO dispersal, but they were not. Then, biofilm dispersion by the nitric oxide shall not act on alginate binding. Yoon *et al.* (2006) suggested that nitrite sensitivity were caused by *mucA* mutations and not by cellular processes associated with alginate overproduction.

The CF patient's lungs as well as other organs have defects in chloride ion transport, which results on hyposalivation of electrolytes and water in lower airways and hyperabsorption of electrolytes and water in central airways (Govan and Deretic 1996). As a result, glands continue to produce mucus, but dehydration caused by unbalanced ion transportation creates a highly dense sticky secretion that accumulates on the airway's lumen and consequently disrupts mucociliary clearance. This afflicted removal exposes the host to persistent microbial colonization. Then is just a matter of time to opportunist pathogens carrying a lot of virulence factors like *P. aeruginosa* to establish themselves into a chronic infection. That thick mucus produced by CF's airways also creates an anaerobic environment where bacteria grow. This fact has led Yoon *et al.* (2002) to believe that *P. aeruginosa* would give up aerobic respiration for denitrification. Earlier studies have shown that *P. aeruginosa* was capable of robust anaerobic growth by respiration using nitrate (NO₃⁻) or nitrite (NO₂⁻) as terminal electron acceptors (Hassett *et al.* 2002). Yoon *et al.* (2002), have also reported that biofilms grown on anaerobic, static conditions were more robust than aerobic ones. Worlitzsch *et al.* (2002) reported that those dehydrated anaerobic mucus would favor alginate production. In 2006, Barraud *et al.* have added that anaerobic respiratory metabolism would occur inside the microcolonies within biofilms grown on aerobic conditions. Once *P. aeruginosa* preferentially grows on aerobic environment, it sounds a little contradictory that it would abandon oxygen for NO₃⁻ metabolism unless it would take advantage from it. Again in 2006, Yoon *et al.* have shown that mucoid *P. aeruginosa* would die by anaerobic exposure to 15 mM nitrite (NO₂⁻) at pH 6.5. Although mutations on many genes have been reported to turn *P. aeruginosa* into a mucoid phenotype (Goldberg *et al.* 1993; Boucher *et al.* 1996), it seems that only *mucA* mutants are sensitive to acidified nitrite and this fact could be attributed to the low nitrite and nitric oxide reductase activity on these variants (Yoon *et al.* 2006). The authors also concluded that NO would be involved on bactericidal activity of acidified NO₂, but it was premature to say that nitric oxide were the only toxic agent.

The biofilm lifestyle can greatly improve bacterial defenses as to antimicrobial agents (Govan and Fyfe 1978) as against hosts' immune cells (Cabral, Loh and Speert 1987). Even though antimicrobial drugs could not kill the strains tested on this study, they managed to avoid biofilm formation on slides' surface. This observation supports the idea that mobile bacteria could flee from hostile environments and fix elsewhere on places they would be allowed to endure. Hoffman *et al.* (2005) have shown that subinhibitory concentrations of

aminoglycoside antibiotics could induce biofilm formation by *P. aeruginosa* and *Escherichia coli* and suggested that biofilm formation would be a specific, defensive reaction to the presence of antibiotics. Hoyle *et al.* (1992) have shown that free swimming bacteria were up to 15 times more resistant to Tobramycin than those embedded on biofilms. Suci *et al.* (1994) demonstrated that biofilms could delay the action of some antimicrobial drugs like ciprofloxacin. In addition, Anwar *et al.* (1992) have added that older biofilms (10 days growth) of *P. aeruginosa* were significantly more resistant to Tobramycin and Piperacilin than younger ones (two days growth).

Acknowledgements:

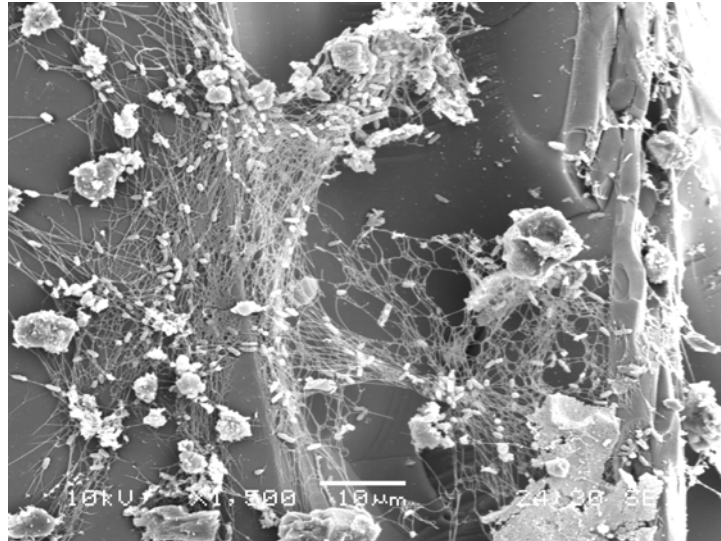
The authors thank to the technicians Dyana and Rafael and the technologist Dr. Luiz Alves of the Electronic Microscopy Laboratory of LIKA/UFPE for all kindness and support given during the experiments. The authors also wish to tank to Dr^a Julia Correa helping on the bacterial samples. The technical assistance rendered by Dr^a Angélica Corrêa is gratefully acknowledged.

Figures and Tables

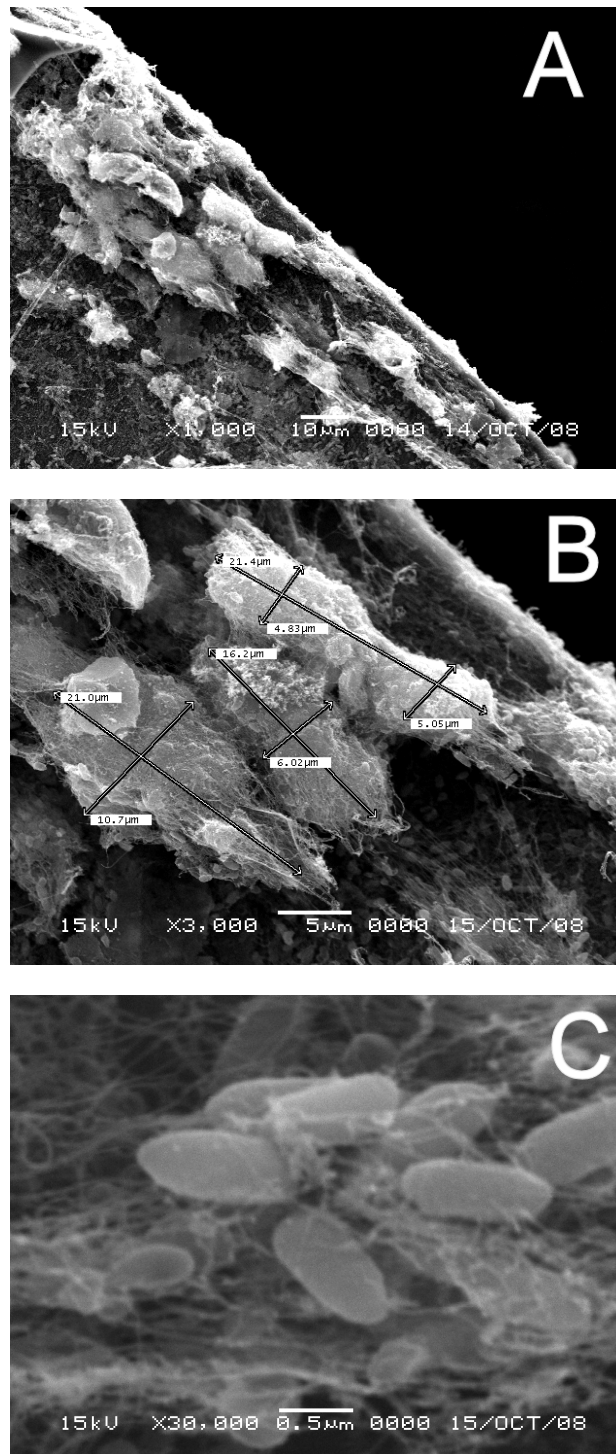
Table 1 – Cystic Fibrosis *P. aeruginosa* strains and their minimal inhibitory concentration

| Patient No. | Isolate name | Phenotype | MIC (µg/ml) | | |
|-------------|--------------|-----------|-------------|-------------|-----------|
| | | | Cefotaxime | Ceftazidime | Aztreonam |
| 1 | CF 126306 | M* | > 256 | > 256 | > 128 |
| 2 | CF 129475 | NM** | > 128 | > 256 | > 256 |
| 3 | CF 126906 | NM | > 64 | > 128 | > 128 |
| 4 | CF 126026 | M | > 64 | > 256 | > 64 |

* alginate overproducing mucoid phenotype
** nonmucoid type

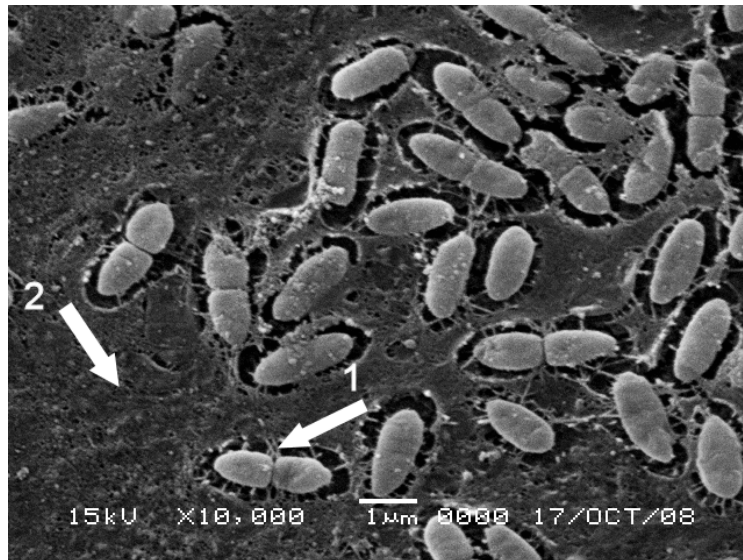


Picture 1 – Biofilm formation by nonmucoid *P. aeruginosa*. Pay attention for the low population of bacilli attached to the web-like structure.

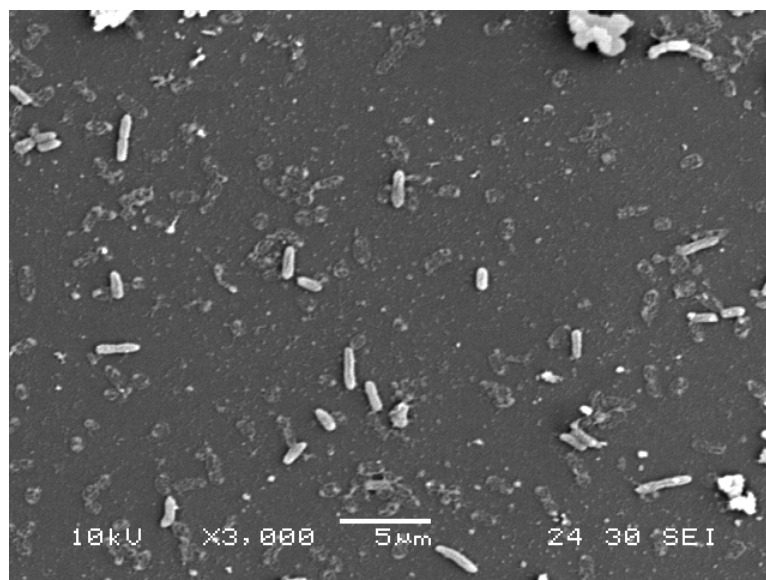


Picture 2 – Alginate overproduction by *P. aeruginosa*. (A) A wide view of glass slide border covered with thick biofilm. (B) The so called microcolonies that looks like with a spider's eggs' nest. (C) A closer view of *P. aeruginosa* cells embedded on the

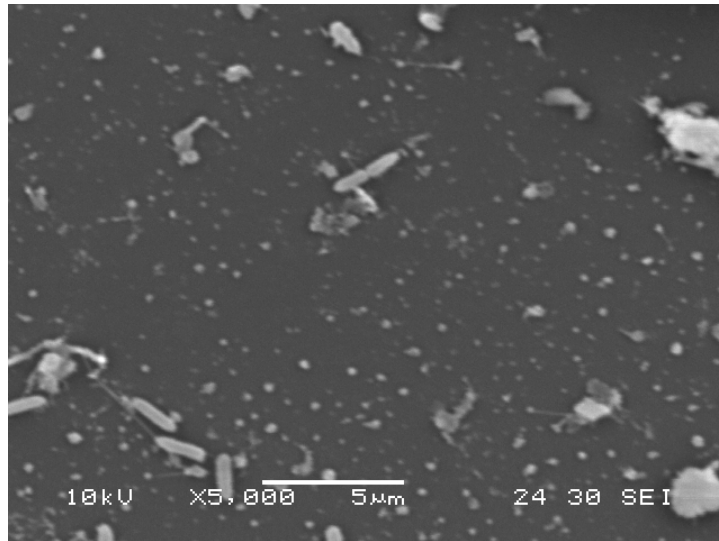
web-like alginate structure.



Picture 3 – The very beginning of mucoid biofilm formation. Isolated *P. aeruginosa* cells start to bind to the glass surface (arrow 1) and produce large amounts of alginate, which covers the slide with a thin slime of this substance (arrow 2).



Picture 4 – Mucooid variant *P. aeruginosa* treated with sodium nitroprusside. Spaced cells lying over the surface.



Picture 5 – Slide of mucoid *P. aeruginosa* grown with 64µg/ml of ceftazidime. No more biofilm structure can be visualized.

References:

- Anwar, H., Strap, J.L., Chen, K. and Costerton, J.W. (1992) Dynamic interactions of biofilms of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* with tobramycin and piperacillin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**, 1208–1214.
- Barraud, N., Hassett, D.J., Hwang, S.H., Rice, S.A., Kjelleberg, S. and Webb, J.S. (2006) Involvement of nitric oxide in biofilm dispersal of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **188**, 7344–7353.
- Boucher, J.C., *et al.* (1996) Two distinct loci affecting conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis encode homologs of the serine protease HtrA. *J. Bacteriol.* **178**, 511–523.
- Broun, A., Liu, S. and Lewis, K. (2000) A dose-response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 640–646.
- Bye, M.R., Ewig, J.M. and Quittell, L.M. (1994) Cystic fibrosis. *Lung* **172**, 251–270.
- Cabral, D.A., Loh, B.A. and Speert, D.P. (1987) Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* resists nonopsonic phagocytosis by human neutrophils and macrophages. *Pediatr. Res.* **22**, 429–431.
- Carpentier, B. and Cerf, O. (1993) Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *Journal of Applied Bacteriology* **75**, 499–511.
- Characklis, W.G. and Marshall, K.C. (1990) Biofilms. John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y.
- Costerton, J.W. (1984) The etiology and persistence of cryptic bacterial infections: a hypothesis. *Reviews of Infectious Diseases* **6(Suppl. 3)**, 608–616.
- Costerton, J.W., Brown, M.R.S. and Sturgess, J.M. (1979) The cell envelope: its role in infection, pp. 41–62. In Doggett, R.G. (ed.), *Pseudomonas aeruginosa: clinical manifestations of infection and current therapy*. Academic Press, Inc., New York.
- Croizé, J., Costaz, J.P. and Bin, D. (1989) Analyse des différents paramètres intervenant dans l'adhésion bactérienne sur cathéters *in vivo*. *Médecine et Maladies Infectieuses* **10**, 499–502.
- Curtin, J., Cormican, M., Fleming, G., Keelehan, J. and Colleran, E. (2003) Linezolid Compared with Erezolid, Vancomycin, and Gentamicin in an In Vitro Model of Antimicrobial Lock Therapy for *Staphylococcus epidermidis* Central Venous Catheter-Related Biofilm Infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **47**, No. 10, 3145–3148
- Evans, L.R. and Linker, A. (1973) Production and characterization of the slime polysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **116**, 915–924.
- Gacesa, P. (1988) Alginates. *Carbohydr. Polym.* **8**, 161–182.
- Goldberg, J.B., Gorman, W.L., Flynn, J.L., and Ohman, D.E. (1993) A mutation in *algN* permits trans activation of alginate production by *algT* in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **175**, 1303–1308.
- Govan, J.R.W. and Deretic, V. (1996) Microbial Pathogenesis in Cystic Fibrosis: Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepaci*. *Microbiological Reviews*, **Sept.**, 539–574.

- Govan, J.R.W. and Fyfe, J.A.M. (1978) Mucoïd *Pseudomonas aeruginosa* and cystic fibrosis: resistance of the mucoïd form to carbenicillin, flucloxacillin and tobramycin and the isolation of mucoïd variants in vitro. *Journal of Antimicrob. Chemother* **4**, 233–240.
- Hassett, D.J., *et al.* (2002). Anaerobic metabolism and quorum sensing by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in chronically infected cystic fibrosis airways: rethinking antibiotic treatment strategies and drug targets. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **54**, 1425–1443.
- Hoffman, L.R., D'Argenio, D.A., MacCoss, M.J., Zhang, Z., Jones, R.A. and Miller, S.I. (2005) Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature* **436**, doi:10.1038/nature03912.
- Hoyle, B.D., Wong, C.K.W. and Costerton, J.W. (1992) Disparate efficacy of tobramycin on Ca₂-, Mg₂-, and HEPES-treated *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Can. J. Microbiol.* **38**, 1214–1218.
- Lyczak, J.B., Cannon, C.L. and Pier, G.B. (2002) Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* **15**, 194–222.
- Moisan, H., Brouillette, E., Jacob, L.C., Langlois-Bégin, P., Michaud, S. and Malouin, F. (2006) Transcription of Virulence Factors in *Staphylococcus aureus* Small-Colony Variants Isolated from Cystic Fibrosis Patients Is Influenced by SigB. *Journal of Bacteriology* **188**, 64–76.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (2006). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 7.ed. Approved Standard, M7-A7 NCCLS, Wayne, PA.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (2007). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement. M100-S17 NCCLS, Vol. 27 N° 1.
- Ory, F.R., Aulagner, G., Isoard, P. and Gauthier, Y. (1987) Revue L e cathitirisme infectieux. *Journal de Phurrnucie Clinique* **6**, 477-500.
- Pirone, L., Bragonzi, A., Farcomeni, A., Paroni, M., Auriche, C., Conese, M., Chiarini, L., Dalmastrì, C., Bevivino, A. and Ascenzioni, F. (2008) *Burkholderia cenocepacia* strains isolated from cystic fibrosis patients are apparently more invasive and more virulent than rhizosphere strains. *Environmental Microbiology*, available at: <http://afarcome.interfree.it/envmicro.pdf>.
- Ramphal, R., Guay, C. and Pier, G.B. (1987) *Pseudomonas aeruginosa* adhesins to tracheobronchial mucin. *Infect. Immun.* **55**, 600–603.
- Sheretz, J., Raad, I.I., Belani, A., Koo, L.C., Rand, K.H., Pickett, D.L., Straub, S.A. and Fauerbach, L.L. (1990) Threeyear experience with sonicated vascular catheter cultures in a clinical microbiology laboratory. *Journal of Clinical Mzcrobiology* **28**, 76-82.
- Suci, P.A., Mittelman, M.W., Yu, F.P. and Geesey G.G. (1994) Investigation of ciprofloxacin penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 2125–2133.
- Worlitzsch, D., *et al.* (2002) Reduced oxygen concentrations in airway mucus contribute to the early and late pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis airway infection. *J. Clin. Invest.* **109**, 317–325.
- Yoon, S.S., *et al.* (2002) *Pseudomonas aeruginosa* anaerobic respiration in biofilms: relationships to cystic fibrosis pathogenesis. *Dev. Cell* **3**, 593–603.
- Yoon, S.S., *et al.* (2006) Anaerobic killing of mucoïd *Pseudomonas aeruginosa* by acidified nitrite derivatives under cystic fibrosis airway conditions. *J. Clin. Invest.* **116**, 436–446.

6. Considerações Finais

Em geral, as amostras de *P. aeruginosa* isoladas de amostras diversas no Hospital das Clínicas apresentam boa sensibilidade aos antimicrobianos utilizados pela rotina do laboratório.

Mesmo que isolada de amostras aleatórias, se comparadas com as de pacientes com fibrose cística do IMIP que eram exclusivas de origem respiratória, a *P. aeruginosa* foi amplamente isolada de amostras de vias aéreas no HC, sugerindo uma possível facilidade deste microrganismo de infectar estas vias.

Embora cepas não-mucóides da *P. aeruginosa* possam formar biofilmes, a mutação para o fenótipo mucóide aumenta consideravelmente a complexidade dessas estruturas sésseis, podendo dificultar sua eliminação.

O Nitroprussiato de Sódio, utilizado como doador de óxido nítrico, foi capaz de impedir a formação do biofilme tanto para cepas não-mucóides, quanto para as variantes mucóides da *P. aeruginosa* oriundas de pacientes com fibrose cística do IMIP.

Assim como o SNP, doses não letais de antimicrobianos às amostras testadas nesse estudo, mostraram-se capazes de impedir a formação de biofilmes, apoiando a idéia que a motilidade permite que microrganismos como a *P. aeruginosa* fujam de ambientes hostis se estabeleçam em lugares que favoreçam seu desenvolvimento.

Ao infectar um paciente susceptível a *P. aeruginosa*, inicialmente selvagem e sensível, adapta-se as condições impostas pelo organismo hospedeiro. A mutação para um fenótipo mucóide confere a este microrganismo maiores possibilidades de sobrevivência e não deve ser considerada como uma mutação aleatória.

7. Referencias

1. Anastassiou, E. D., Mintzas, A. C., C. Kounavis & G. Dimitracopoulos. Alginate Production by Clinical Nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* Strains. *Journal of Clinical Microbiology*, Apr. 1987, p. 656-659
2. Andrade, S. S., R. N. Jones, A. C. Gales, and H. S. Sader. 2003. Increasing prevalence of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Latin American medical centres: 5 year report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997–2001). *J. Antimicrob. Chemother.* 52:140–U7
3. Anwar, H., J. L. Strap, K. Chen, and J. W. Costerton. 1992. Dynamic interactions of biofilms of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* with tobramycin and piperacillin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:1208–1214.
4. Augustin D. K., Y. Song, M. S. Baek, Y. Sawa, G. Singh, B. Taylor, A. Rubio-Mills, J. L. Flanagan, J. P. Wiener-Kronish and S. V. Lynch. Presence or Absence of Lipopolysaccharide O Antigens Affects Type III Secretion by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, Mar. 2007, p. 2203–2209
5. Barraud, N., D. J. Hassett, S.-H. Hwang, S. A. Rice, S. Kjelleberg, and J. S. Webb. 2006. Involvement of nitric oxide in biofilm dispersal of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 188:7344–7353.
6. Bauer, A. W.; Kirby, W. M. M.; Sherris, J. C., Tenckhoff, M. Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*, v. 45, p. 493-496, 1966.
7. Beck-Sagué CM, Banejee SN and Jands WR (1994) Epidemiology and control of *Pseudomonas aeruginosa* in U.S. hospitals. In *Pseudomonas aeruginosa Infections and Treatment*, Baltch AL and Smith RP (eds). Marcel Dekker, New York, pp. 51–71
8. Beveridge, T. J., S. A. Makin, J. L. Kadurugamuwa, and Z. Li. 1997. Interactions between biofilms and the environment. *FEMS Microbiol. Rev.* 20:291–303.
9. Bradley, J.S. *et al.* Carbapenems in clinical practice: a guide to their use in serious infection. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 11: 93-100, 1999
10. Breno Leite, Sérgio Florentino Pascholati, Elliot Watanabe Kitajima, Maria Lucia Ishida. Mecanismos de adesão de bactérias e fungos às plantas hospedeiras. *Volume 9, 2001.*
11. Brooun, A., S. Liu, and K. Lewis. 2000. A dose-response study of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:640–646
12. Brown MRW, Foster JHS and Clamp JR (1969) Composition of *Pseudomonas aeruginosa* slime. *The Biochemical Journal*, 112, 521–525.
13. Bye, M. R., J. M. Ewig, and L. M. Quittell. 1994. Cystic fibrosis. *Lung* 172:251–270.
14. Ceri, H., Olson, M. E., Stremick, C., Read, R. R., Morck, D., AND Buret, A. (1999) The Calgary Biofilm Device: New Technology for Rapid Determination of Antibiotic Susceptibilities of Bacterial Biofilms *Journal of Clinical Microbiology*, p. 1771–1776

15. Characklis, W. G., and K. C. Marshall (ed.). 1990. Biofilms. John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y.
16. Chuanchen, R., Beilinch K., Hoang TT, Becher A. Cros- resistance triclosan and antibiotics in *P. aeruginosa* is mediated by multidrug efflux pumps *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2001. 45:428-432.
17. Costerton, J. W. 1984. The etiology and persistence of cryptic bacterial infections: a hypothesis. *Rev. Infect. Dis.* 6(Suppl. 3):608–616
18. Costerton, J. W., G. G. Geesey, and G. K. Cheng. 1978. How bacteria stick. *Sci. Am.* 238:86–95.
19. Costerton, J. W., K. J. Cheng, G. G. Geesey, T. I. Ladd, J. C. Nickel, M. Dasgupta, and T. J. Marrie. 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.* 41:325–464.
20. Coulton, S. & Hunt, E. Recent advances in the chemistry and biology of carbapenems antibiotics. *In: Ellis, G.P. & Lumskobe, D.K. (eds.) Progress in medicinal chemistry.* Amsterdam: Elsevier Science BV, 1996, p. 99-145
21. Dequeker, E., Accurso, F., Cabeza, S., Cassiman, J.-J., Corey, M., Davidson, A., Döring, G., Heidet, L., Heijerman, H., Kotsimbos, T., Mastella, G., Morrison, C., Pignatti, P.F., Strandvik, B., Tsui, L.-C. and Dodge, J. (2002) Classification of cystic fibrosis and related disorders. *J Cystic Fibrosis* 1, 5-8.
22. Doggett, R. G., G. M. Harrison, and E. S. Wallis. 1964. Comparison of some properties of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from infections in persons with and without cystic fibrosis. *J. Bacteriol.* 87:427–431.
23. Donlan, Rodney M. and J. William Costerton. 2002. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*, Apr. 2002, p. 167–193
24. Edwards, J.R. & Betts, M.J. Carbapenems: the pinnacle of the β -lactam antibiotics or room for improvement. *J. Antimicrob. Chemother.*, 45: 1-4, 2000.
25. Emori, T. G., and R. P. Gaynes. 1993. An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. *Clin. Microbiol. Rev.* 6:428–442.
26. Evans, L. R., and A. Linker. 1973. Production and characterization of the slime polysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 116:915-924.
27. Favero M. S., L. A. Carson, W. W. Bond, and N. J. Petersen. 1971. *Pseudomonas aeruginosa*: Growth in Distilled Water from Hospital. Vol. 173. no. 3999, pp. 836 – 838
28. Feltman H, Schulert G, Khan S *et al.* (2001) Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 147, 2659–2669.
29. Foca, M., M.D., Kathleen Jakob, R.N., B.S.N., Susan Whittier, Ph.D., Phyllis Della Latta, Ph.D., Stephanie Factor, M.D., M.P.H., David Rubenstein, M.D., and Lisa Saiman, M.D., M.P.H. Endemic *Pseudomonas aeruginosa* Infection in a Neonatal Intensive Care Unit. *The new England Journal of Medicine*, 2007. 343:695-700
30. Frithz-Lindsten, E., Holmstrom, A., Jacobsson, L., Soltani, M., Olsson, J., Rosqvist, R. & Forsberg, A. (1998). Functional conservation of the effector protein translocators PopB/YopB and

- PopD;YopD of *Pseudomonas aeruginosa* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *Mol Microbiol* 29, 1155-1165
31. Gacesa, P. 1988. Alginates. *Carbohydr. Polym.* 8:161-182.
 32. Garner JS. 1996. The hospital infection control practices advisory committee. Guidelines for isolation precautions in hospitals. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* 17:54-80.
 33. Gerald B. Pier, Debra Boyer, Michael Preston, Fadie T. Coleman, Nicolas Llosa, Simone Mueschenborn-Koglin, Christian Theilacker, Hannah Goldenberg, Jeffrey Uchin, Gregory P. Priebe, Martha Grout, Marshall Posner e Lisa Cavacini. Human Monoclonal Antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* Alginate That Protect against Infection by Both Mucoid and Nonmucoid Strains. *The Journal of Immunology*, 2004, 173: 5671-5678.
 34. Giamarellou H, Zissis NP, TÁgari G, Bouzos J. In vitro synergistic activities of aminoglycosides and new beta-lactams against multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1984;25:534-6.
 35. Giamarellou H. Aminoglycosides plus beta-lactams against gram-negative organisms. Evaluation of in vitro synergy and chemical interactions. *Am J Med* 1986;80:126-37
 36. Gibbons, R. J. 1977. Adherence of bacteria to host tissue, p. 395-406. In D. Schlesinger (ed.), *Microbiology-1977*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
 37. Goehring, U.-M., Schmidt, G., Pederson, K. J., Aktories, K. & Barbieri, J. T. (1999). The N-terminal domain of *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S is a GTPase-activating protein for Rho GTPases. *J Biol Chem* 274, 36369-36372.
 38. Goldberg, J. (1995) Rapid Method for Preparation of Genomic DNA from *P. aeruginosa*. Disponível em: <http://wheat.pw.usda.gov/~lazo/methods/goldberg/genomic.html>
 39. Goldberg, J. B., Gorman, W. L., Flynn, J. L. & Ohman, D. E. (1993). A mutation in algN permits trans activation of alginate production by algT in *Pseudomonas* species. *J Bacteriol* 175, 1303–1308.
 40. Govan, J. R. W., and J. A. M. Fyfe. 1978. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and cystic fibrosis: resistance of the mucoid form to carbenicillin, flucloxacillin and tobramycin and the isolation of mucoid variants in vitro. *J. Antimicrob. Chemother.* 4:233–240.
 41. Govan, J. R. W., and V. Deretic. 1996. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol. Rev.* 60:539–574.
 42. Govan, J. R. W., and V. Deretic. 1996. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol. Rev.* 60:539–574.
 43. Guimaraes, Márcio Martins de Queiroz and ROCCO, José Rodolfo. Prevalência e prognóstico dos pacientes com pneumonia associada à ventilação mecânica em um hospital universitário. *J. bras. pneumol.*, July/Aug. 2006, vol.32, no.4, p.339-346. ISSN 1806-3713
 44. H Morimoto and B Bonavida. Diphtheria toxin- and *Pseudomonas A* toxin-mediated apoptosis. ADP ribosylation of elongation factor-2 is required for DNA fragmentation and cell lysis and synergy with tumor necrosis factor-alpha. *The Journal of Immunology*, Vol 149, Issue 6 2089-2094

45. Hamood A.N., Griswold J.A., Duhan C.M. Production of Extracellular Virulence Factors by *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Obtained from Tracheal, Urinary Tract, and Wound Infections. *Journal of Surgical Research*, 1996. 61(2), pp. 425-432(8)
46. Hatch, R. A., and N. L. Schiller. 1998. Alginate lyase promotes diffusion of aminoglycosides through the extracellular polysaccharide of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:974–977.
47. Haynes, W. C. 1951. *Pseudomonas aeruginosa*-its characterization and identification. *J. Gen. Microbiol.* 5:939-950.
48. Hirakata, Y., N Furuya, K Tateda, M Kaku, and K Yamaguchi. In vivo production of exotoxin A and its role in endogenous *Pseudomonas aeruginosa* septicemia in mice. *Infection and Immunity*, 1993; 61(6): 2468–2473.
49. Høiby, N., and B. Frederiksen. 2000. Microbiology of cystic fibrosis, p. 83–107. *In* M. E. Hodson and D. M. Geddes (ed.), *Cystic fibrosis*, 2nd ed . Arnold, London, United Kingdom.
50. Høiby, N., Krogh Johansen, H., Moser, C., Song, Z., Ciofu, O., and Kharazmi, A. *Pseudomonas aeruginosa* and the *in vitro* and *in vivo* biofilm mode of growth. *Microbes Infect.* 3, 23–35, 2001.
51. Hollander, Den JG, Horrevorts AM, van Goor ML, Verbrugh HA, Mouton JW. Synergism between tobramycin and ceftazidime against a resistant *Pseudomonas aeruginosa* strain, tested in an *in vitro* pharmacokinetic model. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:95-100.
52. Hoyle, B. D., C. K. W. Wong, and J. W. Costerton. 1992. Disparate efficacy of tobramycin on Ca₂-, Mg₂-, and HEPES-treated *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Can. J. Microbiol.* 38:1214–1218.
53. Iacocca, V. F., M. S. Sibinga, and G. J. Barbero. 1963. Respiratory tract bacteriology in cystic fibrosis. *Am. J. Dis. Child.* 106:316–324.
54. Jacoby, G. A.; Medeiros, A. A. More extended-spectrum b-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 35, p. 1697-1704, 1991.
55. John S. Mattick. Type IV pili and twitching motility. *Annu. Rev. Microbiol.* 2002. 56:289–314
56. Kahan, F. M., H. Kropp, J. G. Sundelof, and J. Birnbaum. 1983. Thienamycin: development of imipenem-cilastatin. *Antimicrob. Agents Chemother.* 12(Suppl. D):S1-S35
57. Kang, P. J., Hauser, A. R., Apodaca, G., Fleiszig, S., Wiener-Kronish, J., Mostov, K. & Engel, J. N. (1997). Identification of *Pseudomonas aeruginosa* genes required for epithelial cell injury. *Mol Microbiol* 24, 1249-1262.
58. King EO, Ward MK and Raney DA (1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 44, 301–307.
59. Klustersky J, Meunier-Carpentier F, Prevost JM. Significance of antimicrobial synergism for the outcome of gram negative sepsis. *Am J Med Sci* 1977;273:157-67
60. Klustersky J, Zinner SH. Synergistic combinations of antibiotics in gram-negative bacillary infections. *Rev Infect Dis* 1982;4:294-301

61. Klausen M, Heydorn A, Ragas P *et al.* (2003) Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Molecular Microbiology*, 48, 1511–1524
62. Koch, C & N. Hoiby. 1993. Pathogenesis of cystic fibrosis. *Lancet* 341:1065–1069.
63. Koneman E.W., Allen S.D., Janda W.M., Schreckenberger P.C. & Winn Jr W.C. Diagnóstico Microbiológico Texto e Atlas colorido. Editora Médica e Científica. 2001.
64. Kounnas MZ, RE Morris, MR Thompson, DJ FitzGerald, DK Strickland and CB Saelinger. The alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor- related protein binds and internalizes *Pseudomonas* exotoxin A. *J. Biol. Chem.*, 1992 267(18), 12420-12423.
65. Kunin CM (1994). Infections of the urinary tract due to *Pseudomonas aeruginosa*. In *Pseudomonas aeruginosa Infections and Treatment*. Balth AL and Smith RP (eds). Marcel Dekker, New York, pp. 237–256.
66. Lanotte P, Watt S, Mereghetti L *et al.* (2004) Genetic features of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients compared with those of isolates from other origins. *Journal of Medical Microbiology*, 53, 73–81
67. Lars Jelsbak, Helle Krogh Johansen, Anne-Louise Frost, Regitze Thøgersen, Line E. Thomsen, Oana Ciofu, Lei Yang, Janus A. J. Haagensen, Niels Høiby e Søren Molin. Molecular Epidemiology and Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* Populations in Lungs of Cystic Fibrosis Patients. *Infection and Immunity*, Maio de 2007, p. 2214–2224
68. Lawrence, J. R., D. R. Korber, B. D. Hoyle, and J. W. Costerton. 1991. Optical sectioning of microbial biofilms. *J. Bacteriol.* 173:6558–6567.
69. Lin, Y.-T., and W. Z. Hassid. 1966. Pathway of alginic acid synthesis in the marine brown alga, *Fucus gardneri* Silva. *J. Biol. Chem.* 241:5284-5297.
70. Linker, A., and R. S. Jones. 1964. A polysaccharide resembling alginic acid from a *Pseudomonas* micro-organism. *Nature (London)* 204:187-188.
71. Lisboa, Thiago, FÁRIA, Mario, Hoher, Jorge A. *et al.* Prevalência de infecção nosocomial em Unidades de Terapia Intensiva do Rio Grande do Sul. *Rev. bras. ter. intensiva*, Oct./Dec. 2007, vol.19, no.4, p.414-420. ISSN 0103-507X
72. Livermore, D. M. (1995). β -Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 8, 557–84.
73. Livermore, DM (2002). Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clinical Infectious Diseases*, 34, 634–640
74. Livermore, M. D. Carbapenemases. *J Antimicrob Chemother*, v. 29, p. 609-613, 1992.
75. Lopez-Lopez, G., Pascual, A., and Perea, J. (1991) Effect of plastic catheter material on bacterial adherence and viability. *J Med Microbiol* 34: 349-353
76. MACEDO, Jefferson Lessa S. de, ROSA, Simone Corrêa, MACEDO, Kátia Cilene Soares de *et al.* Fatores de risco da sepse em pacientes queimados. *Rev. Col. Bras. Cir.*, July/Aug. 2005, vol.32, no.4, p.173-177. ISSN 0100-6991.

77. Mader JT, Vibhagool A, Mader J and Calhoun JH (1994) *Pseudomonas aeruginosa* bone and joint infections. In *Pseudomonas aeruginosa Infections and Treatment*. Baltch AL and Smith RP (eds). Marcel Dekker, New York, pp. 293–326
78. Martin, D. W., Schurr, M. J., Mudd, M. H. & Deretic, V. (1993). Differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* into the alginate-producing form: inactivation of mucB causes conversion to mucoidy. *Mol Microbiol* 9, 497–506.
79. Mathee, K., McPherson, C. J. & Ohman, D. E. (1997). Posttranslational control of the algT (algU)-encoded s22 for expression of the alginate regulon in *Pseudomonas aeruginosa* and localization of its antagonist proteins MucA and MucB (AlgN). *J Bacteriol* 179, 3711–3720.
80. May, T. B., D. Shinabarger, R. Maharaj, J. Kato, L. Chu, J. D. DeVault, S. Roychoudhury, N. A. Zielinski, A. Berry, R. K. Rothmel, T. K. Misra, and A. M. Chakrabarty. 1991. Alginate synthesis by *Pseudomonas aeruginosa*: a key pathogenic factor in chronic pulmonary infections of cystic fibrosis patients. *Clin. Microbiol. Rev.* 4:191–206.
81. Melo M. A. C.; Monteiro R. C. S.; Vieira A. B. R.; Brazão M. A. B. & Vieira J. M. S. Bactérias Isoladas de Ponta de Cateter Venoso Central e Suscetibilidade Antimicrobiana em um Hospital Público de Belém-PA; RBAC, vol. 39(2): 115-118, 2007
82. Menezes, Everardo Albuquerque, SA, Kélvia Miranda, CUNHA, Francisco Afrânio *et al.* Frequência e percentual de suscetibilidade de bactérias isoladas em pacientes atendidos na unidade de terapia intensiva do Hospital Geral de Fortaleza. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, May/June 2007, vol.43, no.3, p.149-155. ISSN 1676-2444.
83. Mouton JW. Combination therapy as a tool to prevent emergence of bacterial resistance. *Infection* 1999;27:S24-8
84. National Committee for Clinical Laboratory Standards (2006). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 7.ed. Approved Standard, M7-A7 NCCLS, Wayne, PA.
85. National Committee for Clinical Laboratory Standards (2007). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement. M100-S17 NCCLS, Vol. 27 N° 1.
86. O'Toole, G. A., and R. Kolter. 1998. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol. Microbiol.* 28:449–461
87. O'Toole, G.A., and Kolter, R. (1998a) Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* 30: 295–304.
88. Ohmori T, S Hagiwara, A Ueda, Y Minoda, K Yamada. Production of pyoluteorin and its derivatives from n-paraffin by *Pseudomonas aeruginosa* S10B2. *Agric. Biol. Chem.* 1978.
89. Paul M, Benuri-Silbiger I, Soares-Weiser K and Leibovici L (2004) Beta lactam monotherapy versus beta lactam-aminoglycoside combination therapy for sepsis in immunocompetent patients: systematic review and meta-analysis of randomised trials. *British Medical Journal*, 328, 668
90. Pederson, K. J., Vallis, A. J., Aktories, K., Frank, D. W. & Barbieri, J. T. (1999). The amino-terminal domain of *Pseudomonas aeruginosa* ExoS disrupts actin filaments via small-molecular-weight GTP-binding proteins. *Mol Microbiol* 32, 393-401.

91. Perentesis, J. P., Miller, S. P., and Bodley, J. W. Protein toxin inhibitors of protein synthesis. *Biofactors*. 1992. 3(3):173-84.
92. Pitt, T. L. e Simpson A. J. H. (2006), *Pseudomonas and Burkholderia spp.*, Principles and Practice of Clinical Bacteriology / autores Stephen H. Gillespie e Peter M. Hawkey. — 2nd ed, pp. 427-443
93. Pseudomonas Genome Project (2004) , Improving disease treatment through genome research: Disponível em: <http://www.pseudomonas.com>.
94. Rahme, L. G., E. J. Stevens, S. F. Wolfort, J. Shao, R. G. Tompkins, and F. M. Ausubel. 1995. Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science* 268:1850.
95. Ramphal, R., Peter M. Small, Joseph W. Shands, JR., Werner Fischlschweiger AND Parker A. Small JR. Adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to Tracheal Cells Injured by Influenza Infection or by Endotracheal Intubation Infection and Immunity, Feb. 1980, p. 614-619
96. Reynolds, H. Y., P. A. Di Sant'Agnes, and H. Zierdt. 1976. Muroid *Pseudomonas aeruginosa*: a sign of cystic fibrosis in young adults with chronic pulmonary disease. *JAMA* 236:2190–2192.
97. Rivera, M., and M. B. Nicotra. 1982. *Pseudomonas aeruginosa* mucoid strain. Its significance in adult chest diseases. *Am. Rev. Respir. Dis.* 126:833-836.
98. Rocchetta, H. L., L. L. Burrows, and J. S. Lam. 1999. Genetics of O-antigen biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63:523–553
99. Sader H, Gales AC, Pfaller MA *et al*, Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals:summary of results from three years SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, *J. Infect. Dis*, 5:200-14, 2001.
100. Sader HS, Mendes RE, Gales AC, Jones RN, Pfaller MA, Zoccoli C, et al. Perfil de sensibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas do trato respiratório baixo de pacientes com pneumonia internados em hospitais brasileiros: resultados do Programa SENTRY, 1997 e 1998. *J Pneumol*. 2001;27:59-67
101. Salyers, A. A. & Whitt, D. D. (1994). *Bacterial Pathogenesis: a Molecular Approach*. Washington, DC: American Society for Microbiology.
102. Schümann, J., Angermüller, S., Bang, R., Lohoff, M., and Tiegs, G. Acute Hepatotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A in Mice Depends on T Cells and TNF. *The Journal of Immunology*, 1998, 161: 5745-5754.
103. Schümann, J., Bluethmann, H., and Tiegs, G. Synergism of *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A with endotoxin, superantigen, or TNF results in TNFR1- and TNFR2-dependent liver toxicity in mice. *Immunology Letters*, 2000. 74(2):165-72.
104. Semmler, A.B., Whitchurch, C.B., and Mattick, J.S. (1999) A re-examination of twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 145: 2863–2873.
105. Severino P, Darini AL, Magalhães VD (1999). The discriminatory power of ribo-PCR compared to ribotyping for epidemiological purposes *APMIS*, 107: 107910-84
106. Sigeas A.D., I. Alarcon, M. N. & S.M. J. Fleiszig. Relative Roles of Flagellin and Swimming Motility in Corneal Infection by *Pseudomonas aeruginosa*. *Invest Ophthalmol*, 2005;46

107. Smith, R.S., and Iglewski, B.H. (2003) *P. aeruginosa* quorum sensing systems and virulence. *Curr Opin Microbiol* 6: 56–60.
108. Sonnenschein, C. 1927. Die Mucosus-form des Pyocyaneus-Bakteriums, *Bacterium pyocyaneum mucosum*. Zentralbl. Bakteriologie. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. I Orig. 104:365–373.
109. Soto, G.E. & Hultgren, S.J. 1999. Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly. *J. Bacteriol.* 181:1059-71.
110. Souza, M. C. M., Rodrigues, T. H. S., Rocha, M. V. P. e Gonçalves L. R. B. Avaliação de suco de caju como substrato para o cultivo submerso de *Pseudomonas aeruginosa*. Anais do VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, 2005.
111. Suci, P. A., M. W. Mittelman, F. P. Yu, and G. G. Geesey. 1994. Investigation of ciprofloxacin penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38:2125–2133.
112. Todar, K.(2004); University of Wisconsin- Madison, Department of Bacteriology.
113. Toufen Junior, Carlos, Hovnanian, André Luiz Dresler, FRANCA, Suelene Aires *et al.* Prevalence rates of infection in intensive care units of a tertiary teaching hospital. *Rev. Hosp. Clin.*, 2003, vol.58, no.5, p.254-259. ISSN 0041-8781.
114. Vallis, A. J., Finck-Barbancon, V., Yahr, T. L. & Frank, D. W. (1999). Biological effects of *Pseudomonas aeruginosa* type III-secreted proteins on CHO cells. *Infect Immun* 67, 2040-2044.
115. Van Delden, C., and B. H. Iglewski. 1998. Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg. Infect. Dis.* 4:551–560.
116. Villas Boas, Paulo José Fortes and RUIZ, Tânia. Occurrence of hospital infection among interned elderly in a university hospital. *Rev. Saúde Pública*, June 2004, vol.38, no.3, p.372-378. ISSN 0034-8910.
117. WHO, World Health Organization (2004). The molecular genetic epidemiology of cystic fibrosis. Disponível em: http://www.who.int/genomics/publications/en/HGN_WB_04.02_report.pdf
118. WHO, World Health Organization (2008). Second Meeting of the Subcommittee of the Expert Committee on the Selection and Use of Essential Medicines. Disponível em: http://www.who.int/selection_medicines/committees/subcommittee/2/Ceftazidime.pdf
119. Wick MJ, Frank DW, Storey DJ and Iglewski BH (1990) Identification of *regB*, a gene required for optimal exotoxin A yields in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*, 4, 489–497.
120. Wood, L. F. & Ohman, D. E. (2006). Independent regulation of MucD, an HtrA-like protease in *Pseudomonas aeruginosa*, and the role of its proteolytic motif in alginate gene regulation. *J Bacteriol* 188, 3134–3137.
121. Woods DE and Vasil ML (1994) Pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections. In *Pseudomonas aeruginosa Infections and Treatment*. Baltch AL and Smith RP (eds). Marcel Dekker, New York, pp. 21–50.
122. Wu YL, Scott EM, Po AL, Tariq VN. Ability of azlocillin and tobramycin in combination to delay or prevent resistance development in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 1999;44:389-92

123. Yahr, T. L., Goranson, J. & Frank, D. W. (1996). Exoenzyme S of *Pseudomonas aeruginosa* is secreted by a type III secretion pathway. *Mol Microbiol* 22, 991-1003.
124. Yoon, S. S., Ray Coakley, Gee W. Lau, Sergei V. Lymer, Benjamin Gaston, Ahmet C. Karabulut, Robert F. Hennigan, Sung-Hei Hwang, Garry Buettner, Michael J. Schurr, Joel E. Mortensen, Jane L. Burns, David Speert, Richard C. Boucher e Daniel J. Hassett. Anaerobic killing of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* by acidified nitrite derivatives under cystic fibrosis airway conditions. *Journal of Clinical Investigation.*, 2006. 116:436-446.

8.1 Normas da Revista Brasileira de Terapia Intensiva

Disponível em: <http://www.scielo.br/revistas/rbti/pinstruc.htm>

Forma e preparação de manuscritos

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Artigos de Pesquisa e Ensaio Clínicos

A submissão de artigo de pesquisa relatando pesquisa experimental em humanos ou animais implica que os autores obtiveram aprovação do Comitê de Ética apropriado, e estão em concordância com a Declaração de Helsinque. Uma declaração deste efeito precisa estar incluída no capítulo "Método".

Para todos os artigos que incluem informação ou fotografias clínicas relacionadas a pacientes individuais, um consentimento escrito e assinado de cada paciente ou familiar precisa ser enviado por correio ou fax ao escritório da revista.

Nomes genéricos dos fármacos devem ser usados. Quando nomes comerciais são usados na pesquisa, estes nomes devem ser incluídos entre parênteses no capítulo "Método".

Como eu organizo meu artigo de pesquisa?

Todos os artigos de pesquisa devem incluir as seguintes sessões:

Página título:

O título completo do artigo

Os nomes completos de todos os contribuintes

Todos os títulos/posições dos contribuintes (assistente, diretor, residente, etc.)

O endereço completo (incluindo telefone, fax e e-mail) do autor para correspondência.

Resumo:

Não deve conter mais que 250 palavras

Ser estruturado com os mesmos capítulos usados no texto principal.

Refletir acuradamente todos os capítulos do texto principal

Mencionar todos os unitermos em ordem alfabética.

Summary:

Todos os trabalhos deverão ser acompanhados de resumo traduzido (*Summary*), necessariamente em inglês, seguido da tradução dos unitermos (*Key Words*).

Introdução - esta sessão deve ser escrita do ponto de vista dos pesquisadores sem conhecimento de especialista na área e deve claramente oferecer - e, se possível, ilustrar - a base para a pesquisa e seus objetivos. Relatos de pesquisa clínica devem, sempre que apropriado, incluir um resumo da pesquisa da literatura para indicar porque o estudo foi necessário e o que o estudo visa contribuir para o campo. Esta sessão deve terminar com uma breve declaração do que está sendo relatado no artigo.

Método - deve incluir o desenho do estudo, o cenário, o tipo de participantes ou materiais envolvidos, a clara descrição das intervenções e comparações, e o tipo de análise usada, incluindo o poder de cálculo, se apropriados.

Resultados - Os resultados da análise estatística devem incluir, quando apropriado, riscos relativo e absoluto ou reduções de risco, e intervalos de confiança

Discussão: Essa seção pode ser dividida em subtítulos com leituras curtas e informativas.

Conclusão - Deve discorrer claramente as conclusões principais da pesquisa e fornecer uma clara explicação da sua importância e relevância.

Referências - Prefere-se que não exceda a 30.

Figuras e Tabelas: devem ser enviadas separadas do texto principal do artigo.

Como EU formato as referências?

Use as abreviações de revistas encontradas no Index Medicus/MedLine. As utilizadas na **Revista Brasileira de Terapia Intensiva** obedecem as Normas de Vancouver. As citações no texto devem ser feitas de forma sobrescritas e sem parênteses, correspondendo às respectivas referências listadas por ordem cronológica, não-alfabética. Estas devem ser listadas ao final na ordem que aparecem no texto. Cada referência deve ter um número individual de referência (não parte 'a' e parte 'b', por exemplo). Por favor, evite excesso de referências. O conselho editorial pode solicitar a redução do seu número antes do aceite.

Os livros devem ser referidos pelo autor, título, cidade-sede da editora, nome editora, número da edição (a partir da 2ª), volume, ano da impressão, e páginas inicial e final citadas. Se tratar de capítulo de livro, fazer constar: autor do capítulo, título do capítulo, a palavra, em: (dois pontos), nome dos editores, título do livro, cidade da editora, editora, nº da edição (a partir da 2ª), volume, ano da publicação e páginas. Quando o artigo tiver mais de três autores deverão ser citados os três primeiros seguidos de et al.

Apenas artigos que foram publicados ou que estão em impressão podem ser citados; material não publicado, não deve ser incluído na lista de referências, mas pode ser incluído no texto. A obtenção de permissão para citar dados na forma de comunicações pessoais é de responsabilidade do(s) autor(es), que deve incluir uma confirmação escrita, que a permissão foi obtida com o manuscrito submetido.

EXEMPLO DE REFERÊNCIAS

Artigo de jornal

Baumann WR, Jung RC, Koss M et al - Incidence and mortality of adult respiratory distress syndrome: a prospective analysis from a large metropolitan hospital. *Crit Care Med*, 1986;14:1-4.

Artigo de suplemento

Walker LK - Use of extracorporeal membrane oxygenation for preoperative stabilization of congenital diaphragmatic hernia. *Crit Care Med*, 1993;21:(Suppl):S379-S380.

Livro

Doyle AC - *Biological Mysteries Solved*, 2nd Ed, London: Science Press, 1991.

Capítulo de livro

Lachmann B, van Daal GJ - Adult Respiratory Distress Syndrome: Animal Models, em: Robertson B, van Golde LMG - *Pulmonary Surfactant*. Amsterdam, 2nd Ed, Batenburg JJ, Elsevier, 1992;635-663

Resumo publicado

Varvinski AM, Findlay GP - Immediate complications of central venous cannulation in ICU. *Crit Care*, 2000;4:(Suppl1):P6.

Artigo *In press*

Kharitonov SA, Barnes PJ - Clinical aspects of exhaled nitric oxide. *Eur Respir J*, in press.

Figuras, Ilustrações, Fotografias e Tabelas

Figuras e tabelas devem iniciar com o título que descreve a figura total. Tabelas não devem incluir linhas verticais. Elas não devem tomar mais espaço que duas páginas na revista impressa, incluindo seus títulos e legendas. Elas devem ser mantidas separadas do texto principal do artigo, contendo suas respectivas legendas e assinalando sua exata localização no texto. Somente serão aceitas as ilustrações que permitirem boa reprodução.

Se as fotografias forem enviadas diretamente ao escritório, essas não devem ser identificadas diretamente nelas; não escreva no verso das cópias em papel, mas anexe a identificação com os nomes dos autores e o número da figura.

A resolução mínima para as figuras é 300 DPI. Lembre-se que na editoração pode reduzir a sua qualidade.

Formatos eletrônicos:

Para fotos e figuras utilizar a extensão: JPEG (300 DPI) e para gráficos de barras ou linhas XLS.

Unitermos

Não mais que cinco palavras chave devem ser listadas em ordem alfabética. Por favor, garanta que as palavras chave são achadas na lista do *Medical Subject Headings* (MeSH) do *Index Medicus*. Estas palavras podem ser procuradas no browser da National Library of Medicine (MeSH).

Políticas de publicação da RBTI

Publicação

Submissão de um artigo ao **RBTI** implica que todos contribuintes leram e concordaram com seu conteúdo. O artigo não foi ainda publicado em outro periódico e não deve estar em avaliação por nenhum outro.

Direitos autorais

Para artigos de pesquisa (incluindo qualquer material suplementar) e revisão, o direito autoral é dos autores.

Envio de manuscritos

Os artigos devem ser enviados por e-mail ao escritório da **RBTI**, digitados em espaço duplo, tanto para o título, como resumos, textos, legendas de gráficos, figuras ou tabelas e referências. Nunca usar espaço simples. As margens devem estar no mínimo a 2,5 cm de cada borda da página. Cada página ou lauda deve conter no máximo 30 (trinta) linhas.

Carta de encaminhamento do material, que deverá apontar o nome e endereço para correspondência; e estabelecer a exclusividade de publicação na **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, caso o artigo venha a ser publicado.

Folha-Título: o título do artigo deve ser curto, claro e conciso para facilitar sua classificação. Quando necessário, pode ser usado um subtítulo. Incluir nesta folha o(s) nome(s) completo(s) do(s) autor(es) e seus títulos e filiações à Sociedade ou Instituições. Nomes de outros colaboradores podem ser citados no final, em agradecimentos. Em outro parágrafo indicar o local onde se realizou o estudo.

Resumo Estruturado. Para artigos científicos ou originais destacar: Justificativa e Objetivos, Método, Resultados e Conclusões. Para informações clínicas destacar: Justificativa e Objetivos, Relato do Caso e Conclusões. Para artigos de revisão destacar: Justificativa e Objetivos, Conteúdo e Conclusões.

Para todos os artigos, indicar os Unitermos,

Title, Summary e Key Words: Título e resumo vertidos para o inglês, assim como os Unitermos.

O texto na íntegra deve seguir os tópicos de acordo com o resumo e o summary.

8.2 Normas da Revista “Letters on Applied Microbiology”

Disponível em: <http://www.wiley.com/bw/submit.asp?ref=0266-8254&site=1>

The preparation and presentation of manuscripts

Manuscripts should be drafted as concisely as possible. As space in Letters is at a premium, individual papers have a limit of approximately 4000 words, including figures and tables (N.B. a half page figure is equivalent to 450 words). The Editors reserve the right to require authors to reduce the length of their manuscript. Manuscripts will not be reviewed unless the English is of a publishable standard. By submission of a manuscript to the journal, all authors warrant that they have the authority to publish the material and that the paper, or one substantially the same, has neither been published previously, nor is being considered for publication elsewhere. Submissions may be subject to testing for textual similarity via plagiarism detection software or related applications.

Format of papers

Manuscripts should be prepared using a word-processor. Text must be double-spaced, and the right hand margin justification should be switched off. Similarly, artificial word breaks at the end of lines must be avoided. A margin of at least 2.5 cm should be left around the text. The pages of the manuscript must be numbered consecutively. Do not use the carriage return (enter) at the end of lines within a paragraph. Turn the hyphenation option off. The first page should show: (a) the title; (b) name(s) of author(s) and place(s) where the work was done; (c) an abbreviated running headline not exceeding 35 letters and spaces; (d) the name, complete mailing address, email address, telephone and fax numbers of the author to whom all correspondence should be addressed and who will check the proofs.

Submissions

Authors are invited to suggest at least three reviewers. It is not appropriate for reviewers to be members or former members of the authors' organization(s), or to have been associated with them. Conversely, authors may identify, with appropriate justification, reviewers or institutions that they would prefer were not approached. Authors are advised that Editors reserve the right to select reviewers of their choice.

Authors are advised to submit their manuscripts online at <http://mc.manuscriptcentral.com/appliedmicrobiology>. If you experience difficulties submitting your manuscript online you should first contact the Editorial Assistant lam@oxon.blackwellpublishing.com. A helpline for technical support is accessible on the online submission site. Save your complete manuscript as a Word document (.doc) or Rich Text Format (.rtf) file. The file will be converted to a PDF when uploaded. All original files that you upload will be available and can be accessed by the Editorial Office if necessary.

1. Full-length papers

The paper should have as its aim the development of concepts as well as the recording of facts. The manuscript should be prepared for a wide readership. As far as possible the paper should present the results of a substantial programme of research. Sequential publication of numbered papers will not be permitted.

The paper will have the following sections:

- (a) **ABSTRACT**: A brief summary of about 150-200 words, should give the major findings of the investigation under the following headings: Aims; Methods and Results; Conclusions; Significance and Impact of Study. A list of between five and eight keywords should be added;
- (b) **INTRODUCTION**: A balance must be struck between the pure and applied aspects of the subject;
- (c) **MATERIALS AND METHODS**: Ensure that the work can be repeated according to the details provided. By submission of a manuscript, the authors consent that biological material, including plasmids, viruses and microbial strains, unobtainable from national collections will be made available to members of the scientific community for non-commercial purposes subject to national and international regulations governing the supply of biological material. In the case of a new diagnostic PCR, you should consider the need for an internal amplification control (JAM 2004 **96**(2):221; available at <http://www.blackwell-synergy.com/links/doi/10.1046/j.1365-2672.2003.02188.x/full>);
- (d) **RESULTS**: Well-prepared tables and figures must be a cardinal feature of the 'Results' section because they convey the major observations to readers who scan a paper. Information provided in tables and figures should not be repeated in the text, but focus attention on the importance of the principal findings of the study;
- (e) **DISCUSSION**: This must not recapitulate the results and authors must avoid the temptation of preparing a combined 'Results and Discussion' section;
- (f) **ACKNOWLEDGEMENTS**; and
- (g) **REFERENCES**: Citation of references having three or more names should be cited in the text as Jones et al. (1992) at the first and subsequent times of quoting the reference unless this causes confusion, e.g. Jones, Brown and Green (1992) and Jones, Green and Smith (1992) would have to be quoted in full. A series of references should be given in ascending date order (Green and Smith 1946; Jones et al. 1956). Different publications having the same author(s) and year will be distinguished by, for example, 1992a, 1992b. This also applies to the Bibliography. Papers or other publications having no obvious author(s) should usually be cited as 'Anon.' with the year in the text and bibliography. References to papers not freely available to the public without charge are not acceptable. Web sites should be quoted in the text with an access date.

Layout of references

The Harvard system should be used. Names with the prefixes de, do van, von, etc. will be placed in alphabetical order of the first letter of the prefix, e.g. von Braun would appear under 'V'. Where italics are intended, words must either be typed in roman and underlined or printed in italics from a word processor. Abbreviate journal titles according to Index Medicus (http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/terms_cond.html). The following is an example of order and style to be used in the manuscript:

Laverick, M.A., Wyn-Jones, A.P. and Carter, M.J. (2004) Quantitative RT-PCR for the enumeration of noroviruses (Norwalk-like viruses) in water and sewage. *Lett Appl Microbiol* **39**, 127-135.

Garner, J.S. and Favero, M.S. (1985) *Guidelines for Handwashing and Hospital Environment Control*. US Public Health Service, Centers for Disease Control HHS No. 99-117. Washington DC: Government Printing Office.

Fricker, C.R. (1995) Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in water. In *Protozoan*

Parasites in Water ed. Betts, W.B., Casemore, D., Fricker, C.R., Smith, H.V. and Watkins, J. pp.91-96. London: The Royal Society of Chemistry.

Personal communications should be cited in the text with initials and family name of all individuals.

English usage

Numbers in text: one to nine in full; 10 and above as numerals. Use 'z' spelling where possible, except analyse, dialyse, hydrolyse, etc.; sulfur, sulfate, etc.

Headings

The hierarchy of the headings used is:

First Order

MATERIALS AND METHODS

Second Order

Sample preparation

Third Order

The media. First paragraph runs on; second and subsequent paragraphs indented.

Abbreviations and units

The Journal uses SI units: g l⁻¹ not g/l; d, h, min, s (time units) but week and year in full; mol l⁻¹ (not M or N); probability is P; centrifugation conditions relative to gravity (g).

Please refer to the Biochemical Journal 'Instructions to Authors'

www.biochemj.org/bj/bji2a.htm.

Microbial nomenclature

The Latin binomial name of micro-organisms, plants and animals (other than farm animals) must be given at first mention in the text; thereafter the generic name will be abbreviated in such a way that confusion is avoided when dealing with several genera all beginning with the same letter, viz. *Pseudomonas*, *Proteus*, *Pediococcus*, etc. (see list of abbreviations below). Subspecies are italicized (*Corynebacterium diphtheriae* subsp. *mitis*; groups and types are printed in Roman and designated by capital letters or Arabic figures (e.g. *Staphylococcus aureus* group A).

Common names will not have an initial capital letter nor will they be underlined in the manuscript, viz. pseudomonad, salmonellas. The specific name will be given in full in the captions to tables and figures. Major ranks are written in Roman with an initial capital (e.g. Enterobacteriaceae).

The nomenclature used when describing the species of *Salmonella* should accord with the system proposed by Le Minor and Popoff (<http://www.bacterio.cict.fr/>). Specifically, at the first citation of a serotype the genus name is given followed by the word 'serotype' and then the serotype name. Names of serotypes should be in Roman type with the first letter capitalized (for example *Salmonella* serotype Typhimurium). Subsequently the name should be written with the genus (abbreviated) followed directly by the serotype name (for example *Salm.* Typhimurium).

Here is a list of abbreviations currently in use for common generic names:

Acet., *Acetobacter*; *Ac.*, *Acinetobacter*; *Act.*, *Actinomyces*; *Aer.*, *Aeromonas*; *Ag.*, *Agrobacterium*; *Alc.*, *Alcaligenes*; *Alt.*, *Alteromonas*;

B., *Bacillus*; *Bact.*, *Bacteroides*; *Bord.*, *Bordetella*; *Bran.*, *Branhamella*; *Br.*, *Brucella*; *Camp.*, *Campylobacter*; *Cit.*, *Citrobacter*; *Cl.*, *Clostridium*; *Coryne.*, *Corynebacterium*; *Cyt.*, *Cytophaga*;
Des., *Desulfomonas* or *Desulfovibrio* (spell out if both appear in same paper);
Edw., *Edwardsiella*; *Ent.*, *Enterobacter* or *Enterococcus* (spell out if both appear in same paper); *Erw.*, *Erwinia*; *E.*, *Escherichia*; *Eu.*, *Eubacterium*;
Fl., *Flavobacterium*; *Fus.*, *Fusobacterium*;
G., *Gemella*;
H., *Haemophilus*;
Kl., *Klebsiella*; *Lact.*, *Lactobacillus*;
L., *Lactococcus*; *Leg.*, *Legionella*; *Leuc.*, *Leuconostoc*; *L.*, *Listeria*;
Meth., *Methanobacterium* or *Methanococcus* (spell out if both appear in same paper); *Mic.*, *Microbacterium*; *M.*, *Micrococcus*; *Mor.*, *Moraxella*; *Myco.*, *Mycobacterium*; *Myc.*, *Mycoplasma*;
N., *Neisseria*; *Nit.*, *Nitrobacter* or *Nitrosomonas* (spell out if both appear in same paper);
Noc., *Nocardia*;
Past., *Pasteurella*; *Ped.*, *Pediococcus*; *Ple.*, *Plesiomonas*; *Pr.*, *Proteus*; *Ps.*, *Pseudomonas*;
Rh., *Rhizobium*; *R.*, *Ruminococcus*;
Salm., *Salmonella*; *Ser.*, *Serratia*; *Sh.*, *Shigella*; *Staph.*, *Staphylococcus*; *Strep.*, *Streptococcus*; *S.*, *Streptomyces*;
T., *Thiobacillus*;
V., *Vibrio*;
X., *Xanthomonas*;
Y., *Yersinia*.

For plant pathogenic bacteria, authors may need to refer to the list of pathovars compiled by the International Society for Plant Pathology: Young, J.M., Bull, C.T., De Boer, S.H., Firrao, G., Gardan, L., Saddler, G.E., Stead, D.E. and Takikawa, Y. Names of Plant Pathogenic Bacteria Published Since 1995. Report of the Taxonomy of Bacterial Plant Pathogens Committee of the International Society of Plant Pathology. Available at http://www.isppweb.org/names_bacterial_new2004.asp

In this, many species names not included in the Approved Lists (www-sv.cict.fr/bacterio) are reduced to the rank of pathovar so that the original names are retained in a trinomial form. Where the pathovar name is cited it may subsequently be abbreviated as follows: *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* becomes *P. s. phaseolicola*. Reference to the two lists avoids the need for citing past authors who named or renamed pathogens but, for completeness or clarity, synonyms suggested by more recent work may have to be considered.

Nucleotide sequences

- (1) Nucleotide sequence data should be deposited in the EMBL/GenBank/DDBJ Nucleotide Sequence Data Libraries and the accession number referenced in the manuscript;
- (2) Sequence data should only be included if they are new (unpublished), complete (no unidentified nucleotides included) and if the sequence information itself provides important new biological insights of direct relevance to the question addressed in the manuscript. Generally sequences should not be submitted if the same gene has been reported in another species unless a comparison with related sequences contributes important new information;

(3) Presentation of nucleotide sequences should include clear indications of nucleotide numbers and points of interest, e.g. promoter sequences, ribosome binding sites, mutations, insertions, probe sequences, etc. In the case of comparisons, nucleotides which differ between the sequences should be readily visible to the reader, e.g. by the use of bold face, shading, boxing or by the use of a dash to represent identical nucleotides. The font size used in the manuscript should facilitate appropriate reduction of the figure.

Statistics

Tests must be presented clearly to allow a reader with access to the data to repeat them. It is not necessary to describe every statistical test fully, as long as it is clear from the context what was done. In particular, null hypotheses should be clearly stated.

Authors are urged to give consideration to the assumptions underlying any statistical tests used and to assure the reader that the assumptions are at least plausible. Authors should be prepared to use nonparametric tests if the assumptions do not seem to hold.

Tables

Tables must be prepared using the same word processing package as the manuscript text. They should not be embedded but be placed immediately following the main text. Do not submit tables separately. Tables must not include ruled vertical or horizontal lines with the exception of headers and a footer (see example). The use of explanatory footnotes is permissible and they should be marked by the following (shown in order of preference): *, †, ‡, §, ¶, **, †† etc. For an example of LAM table style.

Figures

Figures may be line drawings or photographs. They may be uploaded to the online submission site as separate files or included within the manuscript following the text and any tables. Do not embed figures in the text. All graphs, charts and diagrams must be submitted in a finished form and at their intended publication size. Authors are advised that poor quality figures may delay the publication of their paper. Symbols or keys representing data series in graphs and charts must not be shown on the figure itself but be included in the legend typed on a separate sheet. For an example of LAM figure style.

Photographs. These must be of good quality and high contrast. The magnification must be indicated by adding a bar representing a stated length. Composite photographs can reduce the numbers that require publication. The Journal will not accept figures illustrating SDS-PAGE and Ágarose gels, with multiple lanes, where lane order has been rearranged using digital imaging software. The figure should also show sufficient of the gel to reveal reference markers (e.g. the sample origin and a tracker dye, or a lane of molecular mass markers). Captions should be set out in the same manner as that used for figures.

Electronic submission. We would like to receive your artwork in electronic form. Please save line art (vector graphics) in encapsulated PostScript (EPS) format. Photographic images should be saved as Tagged Image Format Files (TIFF). Please indicate any form of file compression used (e.g. Zip). Detailed information on the submission of electronic artwork can be found at: <http://www.blackwellpublishing.com/bauthor/illustration.asp>

Colour figures. It is the policy of the Journal for authors to pay the full cost for the reproduction of their colour artwork. Please note that if there is colour artwork in your manuscript when it is accepted for publication, Blackwell Publishing require you to complete and return a colour work agreement form before your paper can be published. This form can be downloaded as a PDF from http://www.blackwellpublishing.com/pdf/SN_Sub2000_F_CoW.pdf. If you are unable to download the form please contact the Editorial Office.

Footnotes

Not permitted other than on the first page of a manuscript where they are used to show the author's change of address and the address for correspondence.

Experimental hazards

Chemical or microbiological hazards that may be involved in the experiments must be explained. Authors should provide a description of the relevant safety precautions adopted or cite an accepted 'Code of Practice'.

Ethics of experimentation

The Journal will only accept manuscripts in which there is evidence of the ethical use of animals or harmful substances. The care and use of experimental animals must comply with all relevant local animal welfare laws, guidelines and policies, and a statement of such compliance should be provided to the Journal Editor. Where possible, alternative procedures that replace the use of animals, either partially or completely, for example in vitro biological systems, should be used. Where this is not possible, the minimum number of animals should be used and pain and suffering reduced, consistent with attaining the scientific objectives of the study. All reasonable steps must be taken to ensure the humane treatment of animals, so as to minimize discomfort, distress and pain. Animals in pain or moribund should be painlessly killed according to local euthanasia regulations.

Gnotobiotic animals

The terminology for describing the environmental status of animals in gnotobiotic experiments has established itself by usage. *Germ-free* implies freedom from any detectable microorganisms or viruses and it is limited by the tests used to detect contaminants. *Conventional animals* have a full complement of associated microbes. *Open conventional animals* are housed in a standard animal house. *Isolator conventional animals* are maintained in isolators and associated with full flora. *Ex-germ-free animals* are those with an associated flora which have become conventional.

Supplementary material

Authors wishing to submit supplementary material (such as multimedia adjuncts, large data sets, extra colour illustrations, bibliographies or any other material for which there is insufficient space in the print edition of the Journal) must do so at the time of first submission. This supplementary material is an integral part of the article and will be reviewed accordingly. The availability of supplementary material should be indicated in the main manuscript by a paragraph, to appear after the References, headed 'Supplementary material' and providing titles of figures and tables.

2. Review Articles

Preparation of manuscript

These will present a substantial survey with an adequate historical perspective of the literature on some facet of applied microbiology. Your manuscript should not be simply a review of past work or be concentrated largely on unpublished results from your or colleagues' laboratory. We would prefer to see a distillation of early and present work within the field to show progress and explain the present interest and relevance. It is essential at the planning stage to realize that there is a limit to the number of pages available.

The final manuscript must not exceed 4000 words with double-spaced typing, including references. The Tables and Figures must be considered as part of the text and the pages available for text reduced accordingly. References can make a heavy demand on the pages available to you, and it is suggested that you select key references only.

Manuscript presentation

The headings in these review articles are of the author's choice. The first page of the manuscript must give only (a) the title; (b) name(s) of author(s) and address; (c) an abbreviated title to be used for the running title not exceeding 35 letters and spaces; (d) the name, postal and e-mail address of the author to whom all correspondence should be addressed and who will check the proofs.

A short SUMMARY of 150-200 words must be included, as well as an INTRODUCTION, DISCUSSION, CONCLUSION (possibly referring to future prospects) sections.

References must be chosen carefully as their number is limited by the size limitation of the review article.

3. Letters to the Editor

The Chief Editor will consider letters which will provide further debate on a particular topic arising from the publication of a paper. Author(s) of the paper will be sent an edited copy of the letter and they will have the right of reply. Both letters will be published in the Journal.

4. Notes to the editor

The Chief Editor will consider notes which will provide further confirmatory information on a particular topic, or a novel aspect of a methodology (e.g. detection) or a micro-organism (e.g. virulence factor) for which results are preliminary but the impact for Applied Microbiology deemed to be important and requires rapid publishing. Notes should be concise (2000 words; including references), with no headings and present results in 1 table or 1 figure only.

Proofs

The corresponding author will receive an email alert containing a link to a web site. A working email address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from this site. Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software may be downloaded (free of charge) from the following web site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html> This

will enable the file to be opened, read on screen and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proofs. Hard copy proofs will be posted if no email address is available. Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetter errors, will be charged separately.

Offprints

A PDF offprint of the online published article will be provided free of charge to the corresponding author, and may be distributed subject to the Publisher's terms and conditions. Paper offprints of the printed published article may be purchased if ordered via the method stipulated on the instructions that will accompany the proofs. Printed offprints are posted to the correspondence address given for the paper unless a different address is specified when ordered. Note that it is not uncommon for printed offprints to take up to eight weeks to arrive after publication of the journal.

Exclusive licence

Papers are accepted on the understanding that Letters is granted exclusive licence to publish them.

OnlineOpen

OnlineOpen is a pay-to-publish service from Blackwell that offers authors whose papers are accepted for publication the opportunity to pay up-front for their manuscript to become open access (i.e. free for all to view and download) via Blackwell Synergy. Each OnlineOpen article will be subject to a one-off fee of \$3000, excluding colour charges, to be met by or on behalf of the Author in advance of publication. Upon online publication, the article (both full-text and PDF versions) will be available to all for viewing and download free of charge. The print version of the article will also be branded as OnlineOpen and will draw attention to the fact that the paper can be downloaded for free via Blackwell Synergy.

Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the combined payment and licence form available from our website at:

http://www.blackwellpublishing.com/pdf/LAM_OOF.pdf

(Please note this form is for use with OnlineOpen material ONLY.)

Once complete this form should be sent to the Editorial Office along with the rest of the manuscript materials at the time of acceptance or as soon as possible after that (preferably within 24 hours to avoid any delays in processing). Please do not inform the Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen before that paper has been accepted for publication.

The copyright statement for OnlineOpen authors will read:

(c) [date] The Author(s)
Journal compilation (c) [date] The Society for Applied Microbiology

Author material archive policy

Please note that unless specifically requested, Blackwell Publishing will dispose of all hardcopy or electronic material submitted 2 months after publication. If you require the return of any material submitted, please inform the Editorial Office or Production Editor.

Abbreviations

These are some examples of common abbreviations used in *Letters in Applied*

Microbiology:

A, Absorbance

approx. or c., approximately

at. wt., atomic weight

bp, base pairs

by vol, by volume (for greater than two component liquids)

cm², per square centimetre

cpDNA, chloroplast DNA

D, attenuation (see <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/newsletter/1996/news3.html>)

Da (kDa), daltons (kilodaltons)

edn, edition

ed., editor(s)

ergs. sq. mm⁻¹, ergs per square millimetre

IU, International unit

kbp, kilobase pair

Mabs, monoclonal antibodies

MIC, minimal inhibitory concentration

mol l⁻¹, moles per litre

Mr, molecular mass

nm, nanometre

OD, optical density

OFAGE, orthogonal field alteration gel electrophoresis

ORF or orf, open reading frame

P, probability

PFG, pulsed field gradient

ppm, parts per million

recDNA, recombinant DNA

rev min⁻¹, revolution per minute

SD, standard deviation

SE, standard error

subsp., subspecies

U, enzyme unit

UV, ultraviolet

vs, versus

v/v, volume per volume

w/v, weight per volume

w/w, weight per weight

There is no need to define common acronyms such as ATP, EDTA, ELISA, GLC, HPLC, RNA or SDS-PAGE.

OnlineEarly

Letters in Applied Microbiology is covered by Blackwell Publishing's OnlineEarly service. OnlineEarly articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Articles are therefore available as soon as they are ready, rather than having to wait for the next scheduled print issue. OnlineEarly articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of OnlineEarly articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so OnlineEarly articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article. More information about DOIs can be found at: <http://www.doi.org/faq.html>.

Disclaimer

Whilst every effort is made by the Publishers and Editorial Board to see that no inaccurate or misleading data, opinion or statement appears in this Journal, they wish to make it clear that the data and opinions appearing in the articles and advertisements herein are the sole responsibility of the contributor or advertiser concerned. Accordingly, the Publishers and Editors and their respective employees, officers and agents accept no responsibility or liability whatsoever for the consequences of any such inaccurate or misleading data, opinion or statement.

Exclusive Licence form: http://www.blackwellpublishing.com/pdf/lam_caf.pdf

Colourwork Agreement form:

http://www.blackwellpublishing.com/pdf/SN_Sub2000_F_CoW.pdf

Note to NIH Grantees

Pursuant to NIH mandate, Wiley-Blackwell will post the accepted version of contributions authored by NIH grant-holders to PubMed Central upon acceptance. This accepted version will be made publicly available 12 months after publication. For further information, see www.wiley.com/go/nihmandate.

8.3 Tradução do Artigo estrangeiro para língua vernácula

Estilo de vida dos biofilmes: dispersão de biofilmes mucóides de *Pseudomonas aeruginosa* de pacientes com fibrose cística

Resumo

Objetivo: O principal objetivo do corrente estudo foi avaliar se 500nM de nitroprussiato de sódio (SNP) como doador de óxido nítrico, assim como concentrações iguais ou menores que a MIC de antimicrobianos poderiam impedir a formação de biofilmes por cepas mucóides de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes com fibrose cística.

Métodos e Resultados: Biofilmes foram formados em laminas de vidro, dentro de placas de 24 poços para cultura de células, utilizando o caldo de infusão de coração e cérebro (BHI) como meio de cultivo. Em seguida, juntamente com os controles positivo e negativo, cada cepa foi imposta a 500nM de SNP, assim como 64µg/ml de Cefotaxima, Cefotaxima e Aztreonam e incubados sob rotação de 120rpm a 37°C. As lâminas foram então processadas para análise em microscopia eletrônica de varredura. Biofilmes foram formados com sucesso e os mucóides se mostraram muito mais complexos que os não-mucóides. Para ambos os fenótipos de *P. aeruginosa*, nenhuma formação de biofilme foi observada nas lamínulas tratadas com o SNP ou ainda naqueles com agentes antimicrobianos.

Conclusões: O SNP provou ser eficiente na inibição da formação de biofilmes, tanto para amostras não-mucóides, quanto para aquelas densas mucóides. Assim, a ação do óxido nítrico não deve ser sobre as propriedades de ligação do alginato. Ainda, embora altos títulos de antimicrobianos não fossem capaz de matar as cepas analisadas, concentrações menores foram capazes de eliminar a formação dos biofilmes.

Significância e Impacto do Estudo: Uma vez que variantes mucóides da *P. aeruginosa* formam biofilmes mais densos que as não-mucóides, a eliminação desta formação forneceria novas esperanças para pacientes com fibrose cística.

Introdução

Biofilmes bacterianos têm sido reportados por todo o mundo como um enorme problema para indústrias, uma vez que estes aderem fortemente aos ductos de água e se tornam extremamente difíceis de serem erradicados (Carpentier and Cerf 1993). Da mesma forma, este comportamento bacteriano levou a terapia antimicrobiana moderna a uma nova realidade, visto que biofilmes podem aumentar bastante a resistência a agentes antimicrobianos. Ainda, esta forma de crescimento bacteriano tem sido reportada a aderir a vários tipos de equipamentos médicos como cateteres e implantes (Ory *et al.* 1987; Croizé *et al.* 1989; Sheretz *et al.* 1990; Curtin *et al.* 2003). O termo biofilme pode ser definido como um grupo sésil de microrganismos que crescem ágarados a superfície de um substrato ou entre si para vantagens mútuas, aumentando suas defesas contra agentes externos. Brooun, Liu e Lewis (2000) demonstraram que bactérias incrustadas a biofilmes poderiam ser até mil vezes mais resistentes a agentes antimicrobianos que células bacterianas dispersas.

A *P. aeruginosa* é um patógeno oportunista que cresce preferencialmente formando biofilmes (Costerton 1984). Embora a *P. aeruginosa* inflija diferentes tipos de pacientes imunocomprometidos, são em casos de fibrose cística (CF) que esta bactéria pode tornar a vida desses pacientes em um pesadelo (Lyczak, Cannon and Pier 2002). Muito comum na população caucasiana (Bye, Ewig and Quittell 1994), a CF é uma desordem recessiva, hereditária que comumente afeta os pulmões, tornando-os mais propensos a infecções bacterianas. Apesar dos pulmões de um paciente com fibrose cística poder ser infectado por vários tipos diferentes de microrganismo como o *Staphylococcus aureus* (Moisan *et al.* 2006) e *Burkholderia cenocepacia* (Pirone *et al.* 2008), a *P. aeruginosa* é de longe a bactéria mais prevalente entre pacientes com CF. As primos-infecção são normalmente causadas por cepas selvagens da *P. aeruginosa* e são normalmente fáceis de serem eliminadas do organismo por terapia antimicrobiana adequada. A falha desta terapia pode levar a cronificação da infecção que normalmente coincide com a mutação das cepas selvagens para as variantes mucóides. Todas as cepas não-mucóides de *P. aeruginosa* parecem ter o potencial de se transformarem em mucóides (Govan and Fyfe 1978), que é caracterizada pela elevada produção de alginato. Esta substância pegajosa pode ser produzida por todas as cepas de *P. aeruginosa* (Evans and Linker 1973; Gacesa 1988) e normalmente por mutação de um fator sigma (Govan and Deretic 1996), que regula sua síntese, o alginato é livremente produzido. Não se sabe ao certo quando ocorre esta mutação ou o que precisamente acarreta ela,

mas uma vez estabelecida, infecções causadas por esses mutantes são virtualmente impossíveis de serem eliminadas do organismo, geralmente levando o paciente a óbito.

Assim, a dispersão dos biofilmes seria de grande importância, principalmente a daqueles formados por patógenos tão perigosos quanto a variante mucóide da *P. aeruginosa*. Barraud *et al.* (2006), obtiveram a dispersão de biofilmes de cepas selvagens padrões desta bactéria utilizando para isso concentrações nanomolares de Nitroprussiato de Sódio (SNP) como doador de óxido nítrico. Uma vez que tenha funcionado para cepas selvagens, concentrações ótimas de SNP alcançadas por aquele autor será testada frente a cepas mucóides e não-mucóides de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes com fibrose cística.

Materiais e Métodos

Cepas bacterianas e condições de crescimento

As cepas de *P. aeruginosa* analisadas neste estudo foram gentilmente doadas pelo laboratório (Marcelo Magalhães) responsável pela análise clínica das amostras de pacientes com fibrose cística do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP), Recife-PE, Brasil (Tabela 1). Estas cepas foram então semeadas em placas de Petri descartáveis contendo o meio de cultivo, seletivo para *P. aeruginosa*, Ágar Cetrimide e incubadas a 37°C por 24 horas. Colônias isoladas foram então repicadas em meios de manutenção a 5°C, assim como em eppendorfs contendo caldo de Infusão de Cérebro e Coração (BHI) contendo 20% de glicerol para estudos posteriores.

Concentração Mínima Inibitória (MIC)

Determinada como a concentração mínima necessária de um determinado antimicrobiano capaz de inibir o crescimento de um dado microrganismo, os procedimentos para execução do MIC neste estudo seguiram rigorosamente as etapas propostas pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS 2006). O ponto de corte utilizado para susceptibilidade aos antimicrobianos será aquele proposto no décimo sétimo suplemento informacional do NCCLS (2007). Por conveniência, os antimicrobianos utilizados neste estudo foram: Ceftazidima; Cefotaxima e Aztreonam. A cepa padrão *P. aeruginosa* ATCC® 27853 foi utilizada como controle de qualidade dos antibióticos. A leitura das placas foi feita por um Espectrofotômetro de microplacas.

Formação dos Biofilmes

Os biofilmes da *P. aeruginosa* foram formados “in-vitro” em lamínulas de vidro circulares estéreis de 10mm de diâmetro, dispostas no fundo dos poços de uma placa de 24 poços para cultivo de células (24-well Tissue Culture Plate by TPP). Sendo a capacidade volumétrica de cada poço de 3ml, estes foram preenchidos com 0,5ml de caldo BHI estéril e outros 0,5ml de um inoculo padrão contendo aproximadamente 10^5 bactérias por ml do mesmo meio de cultivo. Neste processo, foram utilizadas quatro amostras de pacientes com fibrose cística do IMIP, sendo duas delas mucóides e duas não-mucóides. Para a observação da ação do óxido nítrico, cada uma das amostras teve um poço repetido onde os 0,5ml meio estéril continham 1000nM de SNP, de forma que ao se adicionar outros 0,5ml de inoculo mantivesse uma solução final de 1ml de SNP 500nM. Da mesma maneira, poços contendo antimicrobianos (Tabela 1) foram feitos de maneira tal que ficassem em uma concentração final de 64 μ g/ml de meio. Os biofilmes são formados preferencialmente em ambientes de grande turbulência líquida (CHARACKLIS & MARSHALL, 1990), portanto as placas foram incubadas a 37°C por 48 horas sob rotação de 120 rpm na incubadora “Bio Shaker” BR-300LF (Bionexus®) do LIKA/UFPE. Para a análise da formação desses biofilmes será utilizada a microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Microscopia Eletrônica de Varredura

Após o período de incubação no “shaker”, a fase líquida (cultura bacteriana em meio líquido) foi desprezada em solução de hipoclorito de sódio 2%. Três lavagens sucessivas, de 10 minutos cada, foram realizadas utilizando-se tampão fosfato 0,1M em cada poço da placa de 24 poços que continham as lamínulas. Uma vez lavadas, as lâminas de vidro contendo os biofilmes foram fixadas em solução de Tampão fosfato 0,1M, contendo 2,5% de Glutaraldeído (G.A) e 4% de Para-formaldeído (PFA). Após outras três lavagens, iguais as anteriores, as laminas foram então pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 0,1% em tampão fosfato 0,1M por 90 minutos. Decorrido este tempo, mais três lavagens idênticas foram realizadas preparando a amostra para posterior desidratação, utilizando-se uma série crescente de etanol a 30%, 50%, 70%, 90% e 100%. Para cada uma dessas etapas de desidratação foi utilizado um intervalo de 10 minutos para cada título, sendo a de etanol a 100% repetida três vezes. Desidratadas, as laminas passaram por um processo chamado ponto crítico para a substituição do etanol por dióxido de carbono e assim poder se obter a secagem completa do material para a metalização, realizada pela cobertura do material por uma fina camada de ouro que

possibilita a visualização da superfície dos biofilmes bacterianos. Todas as lâminas foram analisadas em todas suas extensões a procura de biofilmes no Microscópio Eletrônico de Varredura do LIKA/UFPE.

Resultados

Formação dos Biofilmes pela *P. aeruginosa*

A técnica utilizada neste estudo para construir os biofilmes foi única. Aqueles pequenos poços separados comportaram perfeitamente as lâminas de vidro redondas, sem mencionar os baixos custos de preço e tempo do processo. Os resultados indicam que ambos os fenótipos de *P. aeruginosa* foram capazes de formar biofilmes. A fotomicrografia eletrônica das lamínulas de amostras não-mucóides mostrou que suas superfícies eram compostas de poucos grupos isolados de bactérias, porém a produção de alginato e formação de biofilmes foi observada para ambas as amostras não-mucóides analisadas (Foto 1). As estruturas de alginato nessas amostras, porém, eram muito menos complexas e menos povoadas se comparadas com as variantes mucóides.

A produção exacerbada de alginato por outro lado, deu vida a complexas e espessas edificações bacterianas sobre toda superfície das lamínulas (Foto 2). As estruturas construídas por essas bactérias pegajosas lembram a teia de uma aranha e as microcolônias poderiam ser comparadas aos ninhos de ovos. Estes pequenos agregados de bactérias iniciam sua formação pela fixação de uma única célula, que por multiplicação e hiperprodução de alginato, formam aquelas edificações robustas. Toda superfície das lamínulas de vidro nessas variantes mucóides eram cobertas por uma fina camada de alginato que parece funcionar como porto de fixação para essas bactérias (Foto 3).

Impedimento da formação dos biofilmes por ação do óxido nítrico

O SNP impediu com sucesso a formação de biofilmes, tanto para as variantes não-mucóides, quanto para aquelas expressando o fenótipo mucóide. As lamínulas tratadas com esta substância tinham escassas e isoladas bactérias dispostas sobre sua superfície, mas nenhuma formação de biofilmes pode ser observada (Foto 4).

Inibição da formação de biofilmes pelos antimicrobianos

Apesar do fato de todas as cepas serem resistentes a mais de 64µg/ml e muitas vezes a títulos maiores que 256µg/ml dos antimicrobianos testados (Tabela 1), 64µg/ml foi o suficiente para eliminar a formação de biofilmes por todas as cepas analisadas neste estudo (Foto 5).

Discussão

O presente estudo demonstrou que até mesmo aqueles biofilmes mucóides e complexos poderiam ser dispersos por concentrações nanomolares de SNP como doados de óxido nítrico. Estes achados são semelhantes aos de Barraud *et al.* (2006), que utilizou com sucesso essa substância para abolir a formação de biofilmes por cepas selvagens padrões da *P. aeruginosa*. Embora o envolvimento da ligação do alginato tenha sido proposto por Costerton, Brown e Sturgess em 1979, Guay e Pier provaram o aumento da adesão promovido por cepas mucóides aos cílios das células do epitélio respiratório assim como ao muco produzido por pelas células desse epitélio. Assim, a produção do alginato está diretamente relacionada a capacidade de adesão ao substrato e biofilmes mucóides de *P. aeruginosa* deveriam resistir melhor a ação do óxido nítrico, mas não foram. Logo, a dispersão pelo óxido nítrico não deve agir sobre a adesão pelo alginato. Yoon *et al.* (2006) sugeriram que a sensibilidade ao nitrito (NO₂⁻) era causada por mutações em *mucA* e não ao processo associado a hiper-produção do alginato.

Os pulmões de pacientes com fibrose cística assim como outros órgãos possuem um mau funcionamento no transporte de íons de cloro, resultando em hiposecreção de água e eletrólitos nas vias aéreas baixas e hiperabsorção dos mesmo elementos nas vias aéreas centrais (Govan and Deretic 1996). Como resultado, as glândulas continuam a produzir muco, mas a desidratação causada pelo transporte iônico desbalanceado, cria uma secreção densa que se acumula no lúmen das vias aéreas e atrapalha conseqüentemente os batimentos ciliares. Esse distúrbio expõe o hospedeiro a colonização persistente por microrganismos. Então, é só questão de tempo para que patógenos oportunistas com um largo espectro de fatores de virulência se estabilizem em uma infecção crônica. Aquele espesso muco produzido nas vias aéreas de pacientes com CF também cria um ambiente anaeróbio onde as bactérias crescem. Este fato levou Yoon *et al.* (2002) a acreditar que a *P. aeruginosa* abreria mão da respiração aeróbia pela desnitrificação. Estudos passados demonstraram que a *P. aeruginosa* era capaz de um crescimento robusto sobre anaerobiose, utilizando nitrato (NO₃⁻) ou nitrito (NO₂⁻) como acceptor final de elétrons (Hassett *et al.* 2002). Yoon *et al.* (2002) também reportaram que biofilmes crescidos em condições estáticas e de anaerobiose eram mais robustos que os aeróbios. Worlitzsch *et al.* (2002) reportaram que aquele muco desidratado e

anaeróbico favoreceria a produção do alginato. Em 2006, Barraud *et al.* adicionaram o metabolismo dentro das microcolônias era anaeróbico mesmo que a cultura estivesse crescendo em ambiente aeróbico. Uma vez que a *P. aeruginosa* cresce preferencialmente na presença de oxigênio, soa um pouco contraditório que esta abandonaria a aerobiose pela desnitrificação, a menos que tirasse alguma vantagem disso. Novamente em 2006, Yoon *et al.* demonstraram que a *P. aeruginosa* mucóide morreria por exposição, em anaerobiose, a 15mM de nitrito (NO₂⁻) em pH ligeiramente ácido (6,5). Embora muitos genes já tenham sido reportados como causadores da mutação para o fenótipo mucóide da *P. aeruginosa* (Goldberg *et al.* 1993; Boucher *et al.* 1996), parece que só os variantes mucA são sensíveis a ação ácida do nitrito e este fato poderia ser atribuído a baixa atividade da enzima redutora de nitrito e óxido nítrico nessas variantes (Yoon *et al.* 2006). Os autores também concluíram que o óxido nítrico estaria envolvido na ação bactericida do nitrito acidificado, mas era prematuro afirmar que o NO seria o único agente tóxico envolvido.

A forma de crescimento em biofilmes pode aumentar significativamente as defesas bacterianas, tanto para agentes antimicrobianos (Govan and Fyfe 1978), quanto para as células de defesa do hospedeiro (Cabral, Loh and Speert 1987). Embora os antimicrobianos não foram capazes de matar as cepas analisadas neste estudo, essas drogas foram eficazes na eliminação da formação dos biofilmes nas superfícies das lamínulas. Esta observação suporta a idéia que bactérias móveis como a *P. aeruginosa*, poderiam fugir de ambientes hostis e se fixarem em algum outro lugar que favorecesse seu crescimento. Hoffman *et al.* (2005) demonstraram que concentrações sub-inibitórias de aminoglicosídeos poderiam induzir a formação de biofilmes pela *P. aeruginosa* e pela *Escherichia coli* e sugeriram que esta formação seria uma defesa específica contra a presença de antibióticos. Hoyle *et al.* (1992) mostraram que bactérias nadantes eram 15 vezes mais susceptíveis a tobramicina que aquelas incrustadas em biofilmes. Suci *et al.* (1994) demonstraram que biofilmes poderiam atrasar a ação de antibióticos como a ciprofloxacina. Ainda, Anwar *et al.* (1992) adicionaram que biofilmes mais velhos (10 dias de crescimento) seriam significativamente mais resistentes a tobramicina que os mais novos (2 dias de crescimento)

Agradecimentos: Os autores agradecem aos Técnicos Dyana e Rafael e ao Tecnologista Dr. Luiz Alves do Laboratório de Microscopia Eletrônica do LIKA/UFPE por toda gentileza e suporte cedido durante os experimentos. Os autores também gostariam de agradecer a Dra. Júlia Correa pela ajuda na aquisição das amostras. A assistência técnica prestada pela Dra. Angélica Corrêa é aqui amplamente agradecida.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)