



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
CAMPUS CENTRAL DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS
APLICADAS A PRODUTOS PARA SAÚDE (PPG-CAPS)

**DISTRIBUIÇÃO DE FATORES DE VIRULÊNCIA DE ACORDO COM O
PERFIL DE FORMAÇÃO DE BIOFILME EM ISOLADOS CLÍNICOS DE
*Pseudomonas aeruginosa***

Anápolis-Goiás

2022

STEPHANY MARQUES MAUAD

**DISTRIBUIÇÃO DE FATORES DE VIRULÊNCIA DE ACORDO COM O
PERFIL DE FORMAÇÃO DE BIOFILME EM ISOLADOS CLÍNICOS DE
*Pseudomonas aeruginosa***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde da Universidade Estadual de Goiás para obtenção do título de Mestre em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde.

Linha de Pesquisa: Monitoramento de Produtos para Saúde

Orientador: Prof. Dr. Plínio Lázaro Faleiro Naves

Anápolis - Goiás 2022

FOLHA DE APROVAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde da Universidade Estadual de Goiás

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

Aluno: Stéphanhy Marques Mauad

Orientador: Plínio Lázaro Faleiro Naves

Membros:

1. Prof. Dr. Plínio Lázaro Faleiro Naves – CAPS/UEG

2. Profa. Dra. Valdirene Neves Monteiro - CAPS/UEG

3. Profa. Dra. Alliny das Graças Amaral – MPAF/UEG

Ou

4. Profa. Dra. Karina Freire D'Eça Nogueira Santos - UEG

5. Profa. Dra. Marilene Silva Oliveira – IF Goiano – Rio Verde-GO

Data: 20/06/2022

À minha mãe, Sandra Marques, pela inspiração de força e dedicação e ao meu marido, Luiz Felipe, pelo apoio, carinho e incentivo.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus - Conhecedor de todas as coisas, Pai Amado e querido – agradeço ao amor incondicional e cuidado.

Ao Professor Dr. Plínio Lázaro Faleiro Naves, pela orientação sábia e segura, incentivo, encorajamento e por toda paciência deste mundo. Por mil vezes, obrigada!

Aos professores do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde da Universidade Estadual de Goiás, pelos esforços em prol da pesquisa e fortalecimento da Instituição.

À Professora Dra. Lilian Carla Carneiro do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás pela disponibilidade, boa vontade e doação das cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.

Aos companheiros de mestrado e laboratório: Milena Araújo Agra, Reuber Mendes Rocha, Amanda Correia, Osvaldo Gomes Pinto, Igor Romeiro, Tatyana Machado Ramos e Esther Vieira pelo apoio, desenvolvimento da pesquisa e pela leveza e descontração em muitos momentos.

Aos membros da banca de qualificação - Profa. Dra. Lilian Carla Carneiro e Prof^a. Dra. Alliny das Graças Amaral, e aos membros suplentes Profa. Dra. Eliete Souza Santana e Profa. Dra. Valdirene Monteiro, pelas valorosas contribuições.

À minha família - pais, irmão, marido e filhos – pelos dias compartilhados e amor sem fim.

“Estamos aqui para criar vínculos com as pessoas. Fomos concebidos para nos conectar uns com os outros. Esse contato é o que dá propósito e sentido à nossa vida .”

*A coragem de ser imperfeito,
Brené Brown*

SUMÁRIO

RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE TABELAS	xvi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xvii
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	19
2.1 Características gerais da bactéria <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	19
2.2 Fatores de virulência associados à superfície	17
2.2.1 Flagelos e <i>Pili</i> tipo IV	18
2.2.2 Motilidade.....	18
2.2.3 Alginato.....	19
2.2.4 Lipopolissacarídeo (LPS).....	19
2.3 Fatores de virulência extracelulares.....	19
2.3.1 Exotoxina A.....	20
2.3.2 Sistemas de Secreção dos tipos I (T1SS), II (T2SS) e III (T3SS).....	20
2.3.3 Proteases.....	20
2.3.4 Fosfolipase C.....	21
2.3.5 Hemolisinas.....	21
2.3.6 Piocianina e Pioverdina.....	21
2.4 Formação de biofilme microbiano.....	22
3. OBJETIVOS.....	25
3.1 Geral.....	25

3.2 Específicos.....	25
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	26
4.1 Obtenção e manutenção das bactérias.....	26
4.2 Verificação da formação de biofilme por <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	26
4.3 Verificação de motilidade tipo swimming.....	28
4.4 Verificação de motilidade tipo swarming.....	29
4.5 Produção de protease alcalina.....	30
4.6 Produção de hemolisinas.....	30
4.7 Produção de fosfolipase C.....	31
4.8 Produção de lipases.....	32
4.9 Produção de pioverdina.....	32
4.10 Análises estatísticas.....	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
5.1 Formação de biofilme.....	33
5.2 Motilidades swimming e swarming.....	34
5.3 Expressão de outros fatores de virulência.....	35
5.4 Distribuição dos fatores de virulência entre os grupos de formação de biofilme de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	38
6. CONCLUSÕES.....	40
7. REFERÊNCIAS.....	41

RESUMO

Pseudomonas aeruginosa são bactérias Gram-negativas presentes em diferentes nichos, mas que são capazes de colonizar e infectar organismos. São consideradas patógenos oportunistas frequentemente isoladas em ambientes nosocomiais e relatadas em uma variedade de infecções agudas e crônicas, principalmente em pacientes imunocomprometidos. Essa bactéria expressa diversos fatores de virulência que contribuem para a patogênese durante seu processo infeccioso, inclusive a capacidade de formar biofilmes. Nesse contexto, o presente trabalho avaliou a relação entre a expressão de fatores de virulência e a formação de biofilme de isolados clínicos de *P. aeruginosa*. Para isso, foram avaliados o perfil de formação de biofilme, as motilidades *swimming* e *swarming*, protease alcalina, hemolisinas, fosfolipase C, lipases e pioverdina de um total de 32 *P. aeruginosa*, das quais 30 foram isoladas de secreções de crianças traqueostomizadas e de secreções de córnea de pacientes hospitalizados e 2 cepas padrão *American Type Culture Collection* - *P. aeruginosa* ATCC 27853 e ATCC 9027 da coleção do Laboratório de Bioensaios da UEG. Os isolados clínicos foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Biotecnologia de Micro-organismos do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás. Todas as bactérias foram capazes de formar biofilme e 6 (18,75%) foram classificadas como formadoras fortes, 17 como (53,13%) formadoras moderadas e 9 como (28,12%) formadoras fracas. Em relação aos outros fatores de virulência, todas as bactérias produziram pioverdina, 29 (90,62%) lipase em meio B (tributirina), 30 (93,75%) hemolisina, 29 (90,62%) protease alcalina, 24 (75,00%) fosfolipase C, 21 (65,62%) lipase em meio C (rodamina B) e 13 (40,62%) lipase em meio A (*tween* 80). A distribuição dos fatores de virulência nos grupos de formação de biofilme não demonstrou diferenças significativas ($p < 0,05$), mas foi observado um discreto aumento na expressão dos fatores de virulência nos grupos das formadoras fortes e moderadas em relação ao grupo das formadoras fracas, sendo que a produção de hemolisina, protease alcalina, lipase em meio B e pioverdina foi detectada em todas as pseudomonas fortemente formadoras de biofilme. Apesar de não ter sido detectada significância entre a correlação dos fatores de virulência e a formação de biofilme, entendemos que outros estudos com um número maior de cepas podem ser necessários para confirmar esse achado.

Palavras-chave: Bactérias Gram-negativas; Isolados clínicos; Motilidade; Patogenicidade.

ABSTRACT

Pseudomonas aeruginosa are Gram-negative bacteria present in different niches, but capable of colonizing and infecting organisms. They are considered opportunistic pathogens frequently isolated in nosocomial environments and reported in a variety of acute and chronic infections, mainly in immunocompromised patients. This bacterium expresses several virulence factors that contribute to pathogenesis during its infectious process, including the ability to form biofilms. In this context, the present work evaluated the relationship between the expression of virulence factors and biofilm formation of clinical isolates of *P. aeruginosa*. For this, the biofilm formation profile, swimming and swarming motility, alkaline protease, hemolysins, phospholipase C, lipases and pyoverdine were evaluated from a total of 32 *P. aeruginosa*, of which 30 were isolated from secretions of tracheostomized children and from corneal secretions from hospitalized patients and 2 were American Type Culture Collection standard strains – *P. aeruginosa* ATCC 27853 and ATCC 9027 from the Bioassay Laboratory collection. The clinical isolates were kindly provided by the Microorganism Biotechnology Laboratory of the Institute of Tropical Pathology and Public Health at the Federal University of Goiás. All bacteria were able to form biofilms and 6 (18.75%) strains were classified as strong biofilm producers, 17 (53.13%) as moderate and 9 (28.12%) as weak biofilm producers. Regarding the other virulence factors, all 32 strains produced pyoverdine, 29 (90.62%) produced lipase in medium B (tributyryn), 30 (93.75%) produced hemolysin, 29 (90.62%) produced alkaline protease, 24 (75.00%) phospholipase C, 21 (65.62%) lipase in medium C (rhodamine B) and 13 (40.62%) lipase in medium A (tween 80). The distribution of virulence factors in relation to biofilm formation did not show significant differences between the three classified groups ($p < 0.05$), but a slight increase in the expression of virulence factors was observed in the group of strong formers in relation to the others, being that the production of hemolysin, alkaline protease, lipase in medium B and pyoverdine was detected in all the strongly biofilm forming pseudomonas. Although no significance was detected between the correlation of virulence factors and biofilm formation, we believe that further studies with a greater number of strains may be necessary to confirm this finding.

Keywords: Gram-negative Bacteria; Clinical Isolates; Motility; Pathogenicity.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Crescimento típico de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em ágar cetrimida	20
FIGURA 2	Fatores de virulência associados à superfície e extracelulares em <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21
FIGURA 3	Os sistemas QS de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> - Las, Iqs, Rhl e Pqs e suas interações	28
FIGURA 4	Ensaio de formação de biofilme por isolados clínicos e cepas padrão de <i>P. aeruginosa</i>	32
FIGURA 5	Verificação da motilidade tipo <i>swimming</i> de isolados de <i>P. aeruginosa</i> . Em A, B e C resultado <i>swimming</i> positivo e em D resultado <i>swimming</i> negativo	34
FIGURA 6	Verificação da motilidade tipo <i>swarming</i> de isolados de <i>P. aeruginosa</i> . Em A, B e C resultado <i>swarming</i> positivo e em D resultado <i>swarming</i> negativo	35
FIGURA 7	Esquema para determinação de produção de fosfolipase C dos isolados e cepas padrões de <i>P. aeruginosa</i>	
FIGURA 8	Gráfico contendo índice e categoria de formação de biofilme dos isolados clínicos e cepas padrão de <i>P. aeruginosa</i> de acordo com Stepanović et al. (2004).	
FIGURA 9	Aspectos coloniais da motilidade tipo <i>swimming</i> de <i>P. aeruginosa</i> . Resultado negativo: Pa03, resultados positivos: Pa04 e Pa09	39
FIGURA 10	Aspectos coloniais da motilidade tipo <i>swarming</i> de <i>P. aeruginosa</i> . Resultado negativo: Pa13, resultados positivos: Pa05 e Pa14	40
FIGURA 11	Aspectos coloniais de protease alcalina de isolados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> . Resultado negativo: Pa16, resultados positivos: Pa07 e Pa30	41
FIGURA 12	Aspectos coloniais de fosfolipase C de isolados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> . Resultados negativos: Pa01 e Pa03, resultados positivos: Pa06 e Pa15	42

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	Índice e categorias de formação de biofilme dos isolados clínicos e cepas padrão de <i>P. aeruginosa</i>	38
TABELA 2 -	Fatores de virulência dos isolados clínicos e cepas padrão de <i>P. aeruginosa</i>	40
TABELA 3 -	Distribuição dos fatores de virulência de acordo com os grupos de formação de biofilme dos isolados clínicos e cepas padrão de <i>P. aeruginosa</i> .	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AprA – *alkaline protease* - protease alcalina
ATCC – *American Type Culture Collection*
ATM – aztreonam
CAZ – ceftazidima
CIP – ciprofloxacina
DNA – ácido desoxirribonucleico
DO – densidade óptica
DPOC – doença pulmonar obstrutiva crônica
EPS – exopolissacarídeos
ExoS – exotoxina S
ExoU – exotoxina U
FB – índice de formação de biofilme
GEN – gentamicina
IFN – interferon gama
IgG – imunoglobulina G
IMP – imipinem
IQS – 2-(2-Hidroxifenil)-tiazol-4-carbaldeído
Kda – quilo Dalton
LasA – *elastase A*
LasB – *elastase B*
LasI – N-Acil-homoserina lactona sintase
LasR – *lasRI transcriptional regulator*
LPS – lipopolissacarídeo
PC – ponto controle
PlcA – fosfolipase A
PlcB – fosfolipase B
PlcH – fosfolipase C hemolítica
PlcN – fosfolipase C não hemolítica
PPT – piperacilina + tazobactam
PQS – *sinal pseudomonas quinolone*
QS – *quorum sensing*
RhII – N-Acil-homoserina lactona sintase
RhIR – *rhlABRI transcriptional regulator*
T1SS – *type 1 secretion system*
T2SS – *type 2 secretion system*
T3SS – *type 3 secretion system*
TNF – interferon
TSA – *agar tryptic soy*
TSB – *trypticase soy broth*
UFC – unidade de formação de colônias
UTI – unidade de terapia intensiva
UV – ultravioleta

1. INTRODUÇÃO

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria ubíqua encontrada em diversos ambientes, sendo um relevante patógeno essencialmente oportunista (WAGNER *et al.*, 2016). Nos seres humanos, o seu desenvolvimento está relacionado, principalmente, com a formação de biofilmes em dispositivos invasivos e colonização de pacientes imunocomprometidos expostos a longos períodos de hospitalização (KIM; LEE, 2016).

Notadamente naqueles acometidos por queimaduras, fibrose cística, câncer e transplantes de órgãos, estabelecendo índice de mortalidade em até 50% nessas situações (CURRAN; BOLIG; TORABI-PARIZI, 2018). Por esta razão, em ambiente hospitalar, é responsável por entre 10% a 20% das infecções, podendo acometer o trato urinário, sistema respiratório, pele, tecidos moles, ossos, articulações, trato gastrointestinal e causar bacteremia (TOYOFUKU; YOON, 2018).

Os diferentes mecanismos de resistência possuem impacto clínico, sobretudo pelo comprometimento da eficácia de quase todos antimicrobianos, devido à capacidade metabólica flexível e seu genoma que codifica genes de resistência (ROCHA *et al.*, 2019). Esses mecanismos podem ser desencadeados por fatores mutacionais, adquiridos e do ambiente, de modo que a habilidade no crescimento em biofilme também contribui para esse processo (MULCAHY; VINCENT; LEWIS, 2014). A emergência de *P. aeruginosa* multirresistentes requer ações efetivas para o controle das infecções nosocomiais (GOODERHAM; HANCOCK, 2009).

A estrutura de biofilme age como uma barreira protetora que permite a sobrevivência em ambientes hostis, ao mesmo tempo em que promove a dispersão de células para colonizar novos nichos em condições apropriadas (CHEGINI *et al.*, 2020). Dessa forma, o biofilme tem um papel central em diversas infecções persistentes e crônicas, além disso, associadas aos biofilmes, as bactérias ficam protegidas das ações do sistema imune do hospedeiro (WEI; MA, 2013; LAAR *et al.*, 2018).

O biofilme pode ser definido como um aglomerado de colônias bacterianas, encapsuladas em uma mistura polar de biomoléculas, exopolissacarídeos, DNA extracelular (eDNA) e polipeptídeos (RASAMIRAVAKA *et al.*, 2015; OLSEN, 2015). Sob essa forma, as bactérias deixam de ser planctônicas, isto é, de vida livre e se fixam em superfícies bióticas ou abióticas. Uma das principais funções dos biofilmes é reduzir a ação de agentes externos atuando com uma barreira física (COLMER-HAMOOD *et al.*, 2016). Os substratos e a célula bacteriana podem influenciar a adesão inicial a superfícies inertes, utilizando propriedades como rugosidade superficial, hidrofobicidade, fímbrias, flagelos e produção de exopolissacarídeos (EPS) (FREITAS *et al.*, 2018).

A formação de biofilme está dividida em cinco etapas distintas, sendo a primeira a adesão reversível das células bacterianas sobre as superfícies, a segunda etapa é caracterizada por um processo de adesão irreversível com a produção de EPS que auxilia no agrupamento das células, nas terceira e quarta etapas ocorre o desenvolvimento e a maturação tridimensional do biofilme, e, por fim, na quinta etapa ocorre a dispersão das células contidas no biofilme (STOODLEY *et al.*, 2002).

A associação de fatores de virulência e resistência a antimicrobianos são mecanismos para sobrevivência das bactérias *P. aeruginosa* em condições adversas (CAIXETA *et al.*, 2019). Devido ao perfil de resistência, há crescente necessidade de elucidação dos mecanismos de resistência intrínseca desse patógeno e a sua correlação com os fatores de virulência, o que poderia embasar medidas de controle visando minimizar a patogenicidade e criar alternativas complementares à terapia antimicrobiana convencional (LAAR *et al.*, 2018). Neste contexto, essa pesquisa observou a habilidade de formação de biofilme e verificou a distribuição de outros fatores de virulência de acordo com a categoria de formação de biofilme por *Pseudomonas aeruginosa* de isolados clínicos.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Características gerais da bactéria *Pseudomonas aeruginosa*

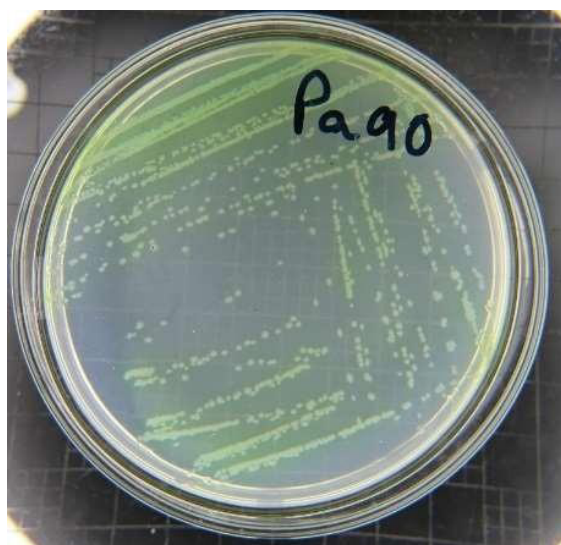
A bactéria *P. aeruginosa* pertence à ordem *Pseudomonadales*, família *Pseudomonadaceae* e ao gênero *Pseudomonas*. Foi descrita em 1882 como *Bacillus pyocyaneus* pelo químico francês Carle Gessard, mas somente em 1961 este micro-organismo foi identificado como capaz de provocar infecções em seres humanos (JENNY; KINGSBURY, 2018). É uma espécie oportunista, devido a versatilidade nutricional e por possuir distribuição cosmopolita. Encontra-se na natureza, habitando em água, solo e plantas; além do ambiente hospitalar, como equipamentos, pias e dispositivos médicos; e em regiões úmidas da pele, como ouvido externo, axilas e região anogenital (BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2013).

Estruturalmente, *P. aeruginosa* é uma bactéria Gram-negativa não fermentadora e sua morfologia microscópica é de bacilo reto ou ligeiramente curvo, com um ou mais flagelos polares monotríquios que conferem motilidade (TRABULSI; ALTERTHUM, 2015). Do ponto de vista metabólico, apresentam metabolismo oxidativo e crescimento ótimo a 37 °C (KONEMAN *et al.*, 2017). A membrana externa é composta por proteínas, lipopolissacarídeos e fosfolipídios, sendo aeróbia estrita, não esporulada, podendo ser visualizada como célula isolada, aos pares ou em cadeias curtas (TOYOFUKU; YOON, 2018).

As formas planctônicas de vida livre são comumente encontradas no solo, água, superfícies de plantas e animais. A distribuição ubíqua é propiciada por uma grande versatilidade metabólica, uma vez que sobrevivem a diferentes condições físico-químicas e disponibilidades nutricionais (ANUJ; WHILEY, 2010). Na natureza, podem ser encontradas tanto na forma planctônica como de biofilmes formados por bactérias que compartilham propriedades fenotípicas comuns (JENNY; KINGSBURY, 2018), como por exemplo, a capacidade de sobreviver em ambientes com concentrações nutricionais mínimas e de tolerar temperaturas de até 50 °C (ALHAZMI, 2015; LAAR *et al.*, 2018).

Em laboratório, *P. aeruginosa* multiplica-se facilmente em diversos meios de cultivo, dos quais mais relatados na literatura, ágar sangue, ágar chocolate, ágar MacConkey e ágar ceftrimida (Figura 1) (WAGNER *et al.*, 2016). Esse micro-organismo desenvolve colônias grandes, redondas, lisas e acinzentadas com odor típico de uva e quando cultivadas em ágar sangue, exibem hemólise parcial e produzem o pigmento piocianina típico desta espécie. *P. aeruginosa* pode produzir outros pigmentos como a pioverdina, que é solúvel em água, com capacidade fluorescente de branco a azul-esverdeado na presença de luz ultravioleta de longo comprimento de onda (400 nm) (KONEMAN *et al.*, 2017).

Figura 1 – Crescimento típico de *Pseudomonas aeruginosa* em ágar cetrimida

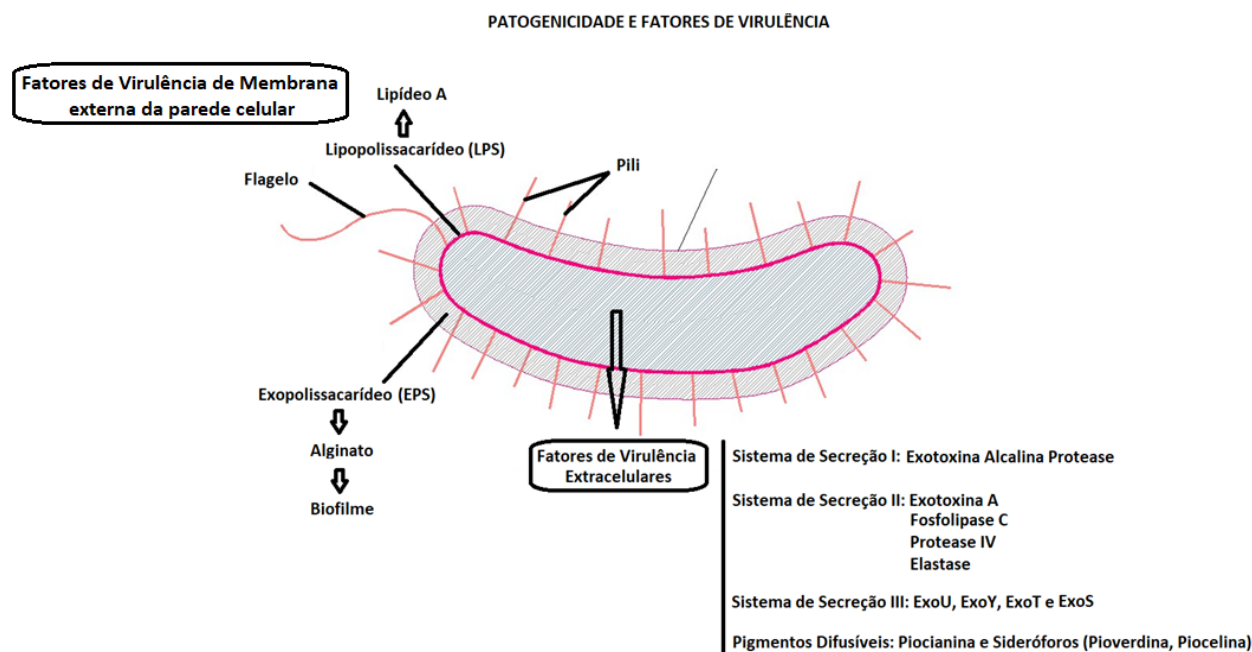


Fonte: Autoria própria

P. aeruginosa são considerados patógenos oportunistas capazes de sintetizar várias substâncias que aumentam sua capacidade de colonização e de infecção no hospedeiro (PEARSON *et al.*, 2000; TRABULSI; ALTERTHUM, 2015). Neste contexto, a bactéria tem a habilidade de persistir sob condições adversas favorecida pela capacidade de formação de biofilme e pela expressão de outros fatores de virulência associados à superfície celular ou fatores extracelulares como síntese de toxinas (STRATEVA; MITOV, 2011).

Os principais fatores de virulência de *P. aeruginosa* associados à membrana são flagelos, *pili* tipo IV, alginato e lipopolissacarídeos (LPS). Os fatores de virulência extracelular são a exotoxina A, o sistema de secreção do tipo III, proteases, elastases, fosfolipase C, hemolisinas, piocianina, pioverdina, dentre outros (Figura 2) (KARATUNA; YAGCI, 2010). Tais fatores podem atuar sozinhos ou em sinergismo, causando danos teciduais, morte celular e necrose no hospedeiro (ROCHA *et al.*, 2019).

Figura 2 - Fatores de virulência associados à superfície e extracelulares em *P. aeruginosa*



Fonte: Adaptado de KARATUNA; YAGCI, 2010

A patogenia de infecção por *P. aeruginosa* compreende o início do processo infeccioso, bem como o aparecimento de sinais e sintomas da patologia, o que compreende as defesas imunológicas do indivíduo (CAIXETA *et al.*, 2019). Trata-se de um micro-organismo invasivo e citotóxico que pode causar dano tecidual, disseminação sistêmica e morte. Esse micro-organismo é conhecido por causar infecções agudas devido à produção de toxinas e infecções crônicas pela capacidade em formar biofilme, acometendo principalmente internados em unidades de terapia intensiva (UTI) (PAZ-ZARZA *et al.*, 2019).

2.2 Fatores de virulência associados à superfície

A expressão de fatores de virulência é uma importante estratégia para a sobrevivência bacteriana. Um grande número de compostos secretados ou associados a células foram descritos como importantes na colonização e estabelecimento de infecções causadas pela *P. aeruginosa* e podem ocasionar lesões teciduais ou prejudicar a resposta imune (SALCEDO; SALVATIERRA, 2014; MORADALI *et al.*, 2017).

Alguns estudos já demonstraram alto percentual de fatores de virulência em *P. aeruginosa*. Na China cerca de 80% dos isolados estudados apresentaram produção de protease alcalina, piocianina e elastase (WANG *et al.*, 2013). No Brasil os resultados são semelhantes,

com 34,4% colônias mucosas, 70,5% com produção de piocianina, 93,4% com produção de gelatinase e 72,1% com produção de hemolisina (JÁCOME *et al.*, 2012).

2.2.1 Flagelos e *Pili* tipo IV

Estas estruturas atuam na motilidade bacteriana e estão envolvidos diretamente na detecção do contato superficial e modulam a patogenicidade (KILMURY; BURROWS, 2018). Os flagelos são estruturas responsáveis pela motilidade da célula em meio líquido de baixa viscosidade, podem ser considerados como fator de colonização em estágio inicial, uma vez que permite a busca e exploração de ambientes mais favoráveis e possuem um papel importante na patogênese através do deslocamento e da fixação das bactérias às células hospedeiras (SHAJIEI *et al.*, 2013).

O filamento do flagelo é uma estrutura longa e espiral composta por proteínas de flagelina polimerizadas, os monômeros de flagelina diferenciam-se em dois sorotipos, tipo A e tipo B, e são facilmente detectados pelo sistema imunológico desencadeando resposta inflamatória do hospedeiro (ROSSEZ *et al.*, 2015; COLMER-HAMOOD *et al.*, 2016).

Os *pili* tipo IV estão associados à aderência a superfícies abióticas e bióticas apresentando um papel determinante no tropismo tecidual e conferindo adesão bacteriana a tecidos específicos. Cepas mutantes defectivas de *pili* tipo IV são menos infecciosas e mais susceptíveis a sofrer ação do sistema imune do hospedeiro (ROCHA *et al.*, 2019).

Estas estruturas têm forma de apêndices capilares longos e finos na superfície da célula bacteriana e são divididos em duas subfamílias: *pili* tipo IVa e *pili* tipo IVb que apresentam diferenças nas subunidades principais e secundárias que compõem o filamento pilina maior e menor. Os *pili* tipo IVa conferem às bactérias diferentes tipos de motilidade como *twitching* através de sucessivos movimentos de extensão e contração e *swarming* agrupando-se (LEIGHTON *et al.*, 2015). As principais vantagens dos *pili* tipo IV são a locomoção, adesão inicial a superfícies ou células hospedeiras e participação na formação do biofilme (GILTNER *et al.*, 2012; JAIN *et al.*, 2012; LEIGHTON *et al.*, 2015).

2.2.2 Motilidade

As bactérias costumam movimentar-se em busca de nutrientes ao longo das superfícies, criando como estratégias, novos nichos de colonização, fuga de toxinas e formação de estruturas complexas de biofilme. Essa motilidade vai depender dos flagelos e da Força Prótica Motriz – PMF (*swimming e swarming*), do *pili* tipo IV (*twitching*), complexos focais de adesão ao decorrer do eixo celular (*gliding*) e do crescimento bacteriano fazendo utilização de um surfactante como facilitador (*sliding*) (MURRAY; KAZMIERCZAK, 2006).

O *swimming* é guiado pela quimiotaxia em busca de nutrientes ou locais de

colonização. Já o *swarming* tem a capacidade de repressão dos 28 genes de quimiotaxia, utilizando a dinâmica do movimento em grupos, com o propósito de adquirir novos territórios. O *swarming* ocorre pela presença de um ou mais flagelos, movimentação agrupada e síntese de compostos surfactantes. É natural que as bactérias que possuem um ou mais flagelos polares apresentem montagem de flagelos laterais durante o processo de diferenciação para o *swarming* (RASHID; KORNBERG, 2000).

2.2.3 Alginato

O alginato é um exopolissacarídeo (EPS) responsável pela formação da camada viscosa que envolve a célula bacteriana, protegendo-a de antimicrobianos, desinfetantes e outros fatores (KIPNIS *et al.*, 2006; RASAMIRAVAKA *et al.*, 2015). Os EPS são produzidos por isolados clínicos de *P. aeruginosa* em infecções pulmonares e apresenta grande importância na proteção estrutural e na estabilidade do biofilme, desta forma contribui para a redução da susceptibilidade de biofilmes à terapia antimicrobiana e ação do sistema imunológico (GHOLAMI *et al.*, 2017).

O alginato pode ser produzido pela *P. aeruginosa* durante a infecção do trato respiratório de pacientes com fibrose cística e doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), resultando em um fenótipo denominado de “mucóide” (JOO; OTTO, 2012; GHOLAMI *et al.*, 2017). Além disso, o alginato demonstra capacidade inibitória da fagocitose e eliminação dos radicais livres, e tende a conferir tolerância aos anticorpos e impede a difusão dos antibióticos (TRABULSI; ALTERTHUM, 2015; STREETER; KATOULI, 2016).

2.2.4 Lipopolissacarídeo (LPS)

Lipopolissacarídeos são glicolípídeos encontrados na membrana externa da parede celular de bactérias Gram-negativas como *P. aeruginosa* e formam uma camada estável (KING *et al.*, 2009). A molécula de LPS é composta por um domínio hidrofóbico chamado lipídeo A ou endotoxina, por um oligossacarídeo central que não possui repetições (porção hidrofílica) e por um polissacarídeo distal ou antígeno O, ligados covalentemente. O lipídeo A é composto por cadeias acila ligadas a um dímero da estrutura da glucosamina por meio de ligações éster e/ou amida (MALDONADO *et al.*, 2016; ROCHA *et al.*, 2019).

Estas estruturas típicas de bactérias Gram-negativas conseguem mascarar a superfície bacteriana de forma a evitar a opsonização e apresentam atividade endotóxica, o polissacarídeo possui estrutura altamente diversificada entre espécies e é quem determina sua especificidade sorológica e antigênica, assim como protege a bactéria de ambientes desfavoráveis, age como barreira estéril e de difusão a determinados agentes, como os antimicrobianos que apresenta como alvo o núcleo interior e a região lipídeo A do LPS (KUTSCHERA *et al.*, 2019). Além disso, o LPS atua como endotoxina quando a bactéria é lisada causando a síndrome da seps

com febre, choque séptico, oligúria, leucopenia ou leucocitose, coagulação intravascular disseminada, anormalidades metabólicas (KONEMAN *et al.*, 2017).

2.3 Fatores de virulência extracelulares

2.3.1 Exotoxina A

A exotoxina A é secretada pelo sistema de secreção do tipo II, com auxílio de *pili* para secretar lipases, fosfolipases, fosfatase alcalina e proteases para o meio extracelular. Esta exotoxina desempenha um papel significativo nas lesões e invasões locais no tecido, na inibição da síntese de proteínas e atua na interrupção da atividade celular e da resposta de macrófagos (KONEMAN *et al.*, 2017; ROCHA *et al.*, 2019).

2.3.2 Sistemas de Secreção dos tipos I (T1SS), II (T2SS) e III (T3SS)

A virulência de uma bactéria Gram-negativa está diretamente relacionada ao sistema de secreção bacteriano e cada tipo desses sistemas tem papel fundamental na interação entre hospedeiro e patógeno (PRESTON *et al.*, 2005). Dentre os componentes do sistema de secreção tipo I (T1SS), a exotoxina alcalina protease é a de maior relevância, pois é responsável pela inibição da fibrina e disseminação do micro-organismo. O sistema de secreção tipo II (T2SS) compreende a exotoxina A, fosfolipase C, protease IV e elastase que atuam na citotoxicidade, inflamação e colonização das células hospedeiras. Juntas, a elastase e a protease alcalina degradam estruturas de suporte compostas de fibrina e elastina, causam inativação do interferon gama (IFN) e do fator de necrose tumoral (TNF) (D'AGATA, 2016; ROLSMA *et al.*, 2015).

O sistema de secreção tipo III (T3SS) apresenta-se como um aparelho supramolecular em forma de agulha, que é usado para o transporte de efetores T3SS para as células do hospedeiro (HUANG *et al.*, 2019). Essa via secreta uma proteína efetora a ExoU, enzima fosfolipase A2, considerada a principal citotoxina secretada pela *P. aeruginosa* que apresenta capacidade de quebrar lipídeos nas membranas celulares dos hospedeiros eucarióticos. Outros isolados de *P. aeruginosa* também secretam o ExoS uma enzima bifuncional que causa arredondamento e apoptose nas células eucarióticas. A distinção dessas proteínas é de grande importância clínica, pois esses isolados estão associados a infecções mais graves e de maior mortalidade (OZER *et al.*, 2019).

2.3.3 Proteases

As diferentes linhagens de *P. aeruginosa* secretam enzimas proteolíticas extracelulares como: protease IV, protease alcalina e duas elastase: elastase A (LasA) e elastase B (LasB) (ANDREJKO *et al.*, 2013). A protease IV cliva substratos no lado carboxil de resíduos de lisina e é capaz de degradar diversas proteínas de grande importância para o

sistema imunológico do hospedeiro (imunoglobulinas, sistema complemento, fibrinogênio e plasminogênio) (ANDREJKO *et al.*, 2013).

A protease, como a metaloprotease do tipo elastase B (LasB) causam danos ao tecido do hospedeiro, desempenhando ações relevantes em infecções agudas dos pulmões e em queimaduras (ROCHA *et al.*, 2019). A LasB degrada elastina e é inibida por agentes quelantes, também consegue clivar e ativar protoformas de metaloproteinase da matriz hospedeira, inativar a ação das citocinas inflamatórias, destrói componentes do complemento, dentre outras atividades (MARQUART *et al.*, 2005; ANDREJKO *et al.*, 2013).

A enzima elastase cliva proteínas do hospedeiro como o colágeno, IgG e proteínas do complemento, a enzima protease alcalina (AprA) é uma metaloprotease de zinco que consegue degradar componentes do sistema imunológico do hospedeiro, tais como complemento e citocinas. A AprA é secretada pelo sistema de secreção tipo I e impacta negativamente no prognóstico de pacientes com fibrose cística infectados por *P. aeruginosa* (LAARMAN *et al.*, 2012).

2.3.4 Fosfolipase C

As fosfolipases se caracterizam por compor um grupo heterogêneo de enzimas que conseguem hidrolisar uma ou mais ligações de ésteres em glicerofosfolipídeos, dentre as quais a fosfolipase C que apresenta peso molecular de 50 a 80 kDa e hidrolisa a ligação fosfodiéster, resultando na hidrólise de fosfolipídeos. A fosfolipase C desempenha papel significativo na patogênese por destruir a membrana citoplasmática (ELLEBOUDY; ABOULWafa; HASSOUNA, 2014) e degradar os fosfolipídeos que são responsáveis pela composição do surfactante pulmonar, por estes motivos é tida como um importante fator de virulência principalmente em pacientes acometidos pela ação da *P. Aeruginosa* (KONG, 2006).

A *P. aeruginosa* é responsável por produzir quatro diferentes tipos de fosfolipases sendo elas: PlcA e PlcB não hemolíticas e zinco dependentes, ainda sem esclarecimento fundamentado em relação às funções biológicas (TRUAN *et al.*, 2013). Anteriormente, foram identificadas dois Plc extracelular para *P. aeruginosa*, são elas PlcH (fosfolipase C hemolítica) que é hemolítica e PlcN (fosfolipase C não hemolítica) que não é hemolítica, com aproximadamente o dobro de tamanho das PlcA e PlcB e não apresenta nenhuma estrutura química significativa em relação as Plc dependente de zinco (VASIL, 2006).

2.3.5 Hemolisinas

Alguns isolados de *P. aeruginosa* são capazes de sintetizar hemolisinas (FAZLUL *et al.*, 2018). As hemolisinas desempenham atividade hemolítica, inflamação, danos às células hospedeiras e inibição da defesa mediada por neutrófilos (SALEH; ABBAS; ASKOURA, 2019). A *P. aeruginosa* é capaz de produzir duas hemolisinas importantes, sendo essas a

fosfolipase C e lectinase (SADIKOT *et al.*, 2005).

2.3.6 Piocianina e Pioverdina

P. aeruginosa é capaz de produzir alguns pigmentos e esses podem agir como fatores de virulência e pela secreção desses pigmentos estes podem atrapalhar ou atrasar o crescimento de outras bactérias, além de contribuírem para formação de outros fatores de virulência como a de biofilme (JIMENEZ *et al.*, 2012).

O pigmento mais importante produzido por *P. aeruginosa* é a piocianina (1-hidroxi-5-metil-fenazina) que é um pigmento de coloração azul, pertencente ao grupo de tricíclicos e possuem ampla variedade bactericida (D'AGATA, 2016). A piocianina produzida pela *P. aeruginosa* é capaz de catalisar a produção de formas tóxicas de oxigênio, como o superóxido e peróxido de hidrogênio, causando danos aos tecidos do hospedeiro, este pigmento pode também, estimular a liberação de interleucina-8 e atrair neutrófilos, inibir a proliferação de linfócitos e afetar a função ciliar da célula (D'AGATA, 2016). A piocianina ainda é capaz de promover apoptose em neutrófilos e em pacientes com fibrose cística a atividade das células respiratórias tem sua ação proteolítica desequilibrada (STRATEVA; MITOV, 2011).

A pioverdina é o outro pigmento produzido por *P. aeruginosa* que age como um sideróforo que compete com proteínas dos hospedeiros pela quelação de ferro para uso no metabolismo, esta atividade pode ser observada quando há deficiência de ferro, pela produção de fluorescência de cor verde amarelada, essa coloração contribui para a identificação de cepas de *P. aeruginosa* com atividade de quelação de ferro (KIPNIS *et al.*, 2006). Além de participar da quelação de ferro, a pioverdina está ligada à formação de biofilme dental em pacientes com fibrose cística (SAHA *et al.*, 2013).

2.4 Formação de biofilme microbiano

O biofilme é considerado uma comunidade microbiana estruturada, cuja formação é bastante complexa e que pode ser formado em superfícies abióticas ou bióticas (BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2013). O processo de formação se inicia com a aderência irreversível ou ligação inicial das células bacterianas a uma determinada superfície, posterior ao início de proliferação celular, pela formação de monocamadas bacterianas que à medida que sofre o processo de maturação, são capazes de formar uma estrutura mais organizada como microcolônias, após o desenvolvimento e maturação da estrutura tridimensional do biofilme, células bacterianas podem se desprender e dispersar para estabelecer novas colônias em outras superfícies (TAYLOR *et al.*, 2014).

A estrutura do biofilme é definida por fatores intrínsecos como os tipos de micro-organismos envolvidos na formação e maturação, mas também por fatores extrínsecos como características do meio onde se desenvolve, rugosidade da superfície de adesão, a presença ou não de nutrientes no processo, dentre outros (BOLAND *et al.*, 2000).

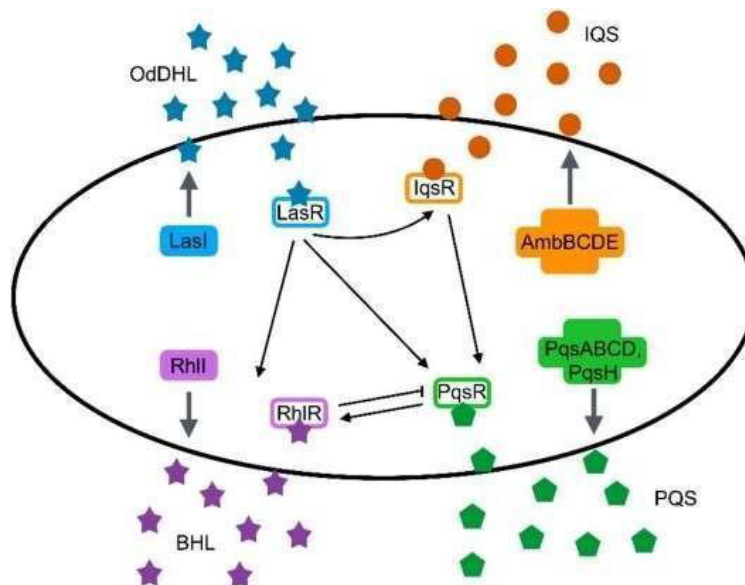
O sistema de modulação gênica e de algumas proteínas em *P. aeruginosa* permite que as células do biofilme consigam se adaptar rapidamente a condições ambientais adversas. Isto pode envolver uma expressão aumentada de bombas de efluxo a múltiplas drogas, redução da permeabilidade celular e a função de enzimas modificadoras de antibióticos (WANG *et al.*, 2018).

O sistema de *quorum sensing* (QS) é um mecanismo de reconhecimento celular e funciona como um regulador da expressão gênica por sinais autoindutores (AI) em diversas bactérias (HARMSSEN *et al.*, 2010). O sistema QS é responsável por coordenar e regular a expressão de genes que permite a formação, o estabelecimento e a manutenção do biofilme. Permite o reconhecimento das condições do meio em que as células se organizam, a densidade da população bacteriana e é capaz de promover, caso seja necessário, uma nova organização para garantir a sobrevivência do biofilme (CHUN *et al.*, 2004).

O sistema QS é considerado o fator de virulência que permite que comunidades bacterianas consigam regular uma variedade de processos biológicos para adaptação e sobrevivência a diversas condições ambientais. Aproximadamente 10% dos genes da *P. aeruginosa* são regulados pelo sistema QS, sendo que as maiores partes desses genes está envolvida na produção de fatores de virulência, motilidade bacteriana, motilidade interrompida ou incapacidade e desenvolvimento do biofilme (MORADALI *et al.*, 2017).

Na *P. aeruginosa* este sistema é formado por quatro sistemas: LasI, LasR, RhII, RhIR, Pqs e Iqs, (Figura 3) cuja ação é facilitar a comunicação entre as células por meio da produção de moléculas sinalizadoras ou autoindutores que direcionam receptores específicos para ativação. Quando ocorre a ativação máxima do receptor, a expressão gênica de fatores de virulência e de formação de biofilme é induzida e essa comunicação, permite que a bactéria modifique coletivamente o padrão de expressão gênica em meio às mudanças na densidade celular e na composição de espécies que compõe a comunidade microbiana (STREETER; KATOULI, 2016; SCOFFONE *et al.*, 2019).

Figura 3 - Os sistemas QS de *Pseudomonas aeruginosa* - Las, Iqs, Rhl e Pqs e suas interações



Fonte: SCOFFONE *et al.*, 2019

A principal vantagem da presença dos biofilmes para as bactérias é a capacidade de sobrevivência aos tratamentos com antimicrobianos. No entanto, a resistência e a tolerância diferem-se entre si, tanto os termos como os mecanismos (CIOFU; TOLKER-NIELSEN, 2019). A resistência pode ser definida como a capacidade de sobrevivência da bactéria na presença de um antibiótico ou antisséptico. Em geral, os mecanismos envolvidos na resistência impedem a interação entre o fármaco e o alvo, permitindo a multiplicação da bactéria. A resistência pode ser conferida por mutações adquiridas e repassadas da célula-mãe à filha, permeabilidade reduzida do fármaco, ação de enzimas moduladoras a antibióticos e bombas de efluxo (TRABULSI; ALTERTHUM, 2015). Em contrapartida, a tolerância está associada, especificamente, à presença de antibióticos e em sua capacidade de sobrevivência na presença do mesmo (WEI; MA, 2013).

No caso específico da *P. aeruginosa* e sua capacidade de formação do biofilme, é possível verificar a existência das duas atividades, como resistência e tolerância, e a essa combinação complexa dá-se o nome de recalcitrância do biofilme. O fenômeno do biofilme é composto por múltiplos fatores, complexo e subordinado ao fármaco utilizado (LEBEAUX *et al.*, 2014; CIOFU; TOLKER-NIELSEN, 2019).

A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* configura um sério problema de Saúde Pública e foi classificada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) com nível crítico (1) em uma lista global de bactérias resistentes a antibióticos com necessidade prioritária de pesquisa e desenvolvimento de tratamentos antibióticos modernos e eficazes (WHO, 2017). Frente a isto, a compreensão dos aspectos patogênicos da *P. aeruginosa* e das relações existentes entre os fatores de virulência e a formação do biofilme é essencial para a elaboração de uma terapia eficaz.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Determinar o perfil de formação de biofilme por *Pseudomonas aeruginosa* e verificar a distribuição de outros fatores de virulência de acordo com a categoria de formação de biofilme.

3.2 Específicos

- Determinar o índice de formação de biofilme e classificar as cepas estudadas pelo grau de formação de biofilme;
- Detectar fenotipicamente os fatores de virulência: motilidade *swimming*, motilidade *swarming*, protease alcalina, hemolisina, fosfolipase C, lipases e pioverdina;
- Estudar a distribuição dos fatores de virulência nas cepas de acordo com as categorias de formação de biofilme.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção e manutenção das bactérias

Um total de 32 cepas de *P. aeruginosa* foram avaliadas, sendo 30 isolados clínicos, gentilmente cedidas pela Profa. Lilian Carla Carneiro do Laboratório de Biotecnologia de Micro-organismos do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás e duas cepas padrão *American Type Culture Collection* (ATCC) - *P. aeruginosa* ATCC 27853 e ATCC 9027 da coleção do Laboratório de Bioensaios da Universidade Estadual de Goiás.

Inicialmente, as alíquotas dos micro-organismos foram repicadas em ágar cetrimida utilizando a técnica de esgotamento por estrias e as placas incubadas em estufa a 35,5 °C por 24 h. Após a incubação, foram transferidas de 3 a 5 colônias isoladas e típicas para um tubo com 15 mL de caldo Soja Tripticaseína (TSB) suplementado com 20% de glicerol, que após homogeneização em vórtex por 15 segundos foram incubados em estufa por 12 horas a 35,5 °C. Em seguida, alíquotas de 0,5 mL do caldo crescido foram transferidas para microtubos tipo *Eppendorf* previamente esterilizados e devidamente identificados. Posteriormente, os microtubos foram armazenados em refrigerador a 8 °C por 7 dias e, após esse período foram congelados em *freezer* a - 80 °C para a realização dos ensaios (SILVA *et al.*, 2008).

4.2 Verificação da formação de biofilme por *P. aeruginosa*

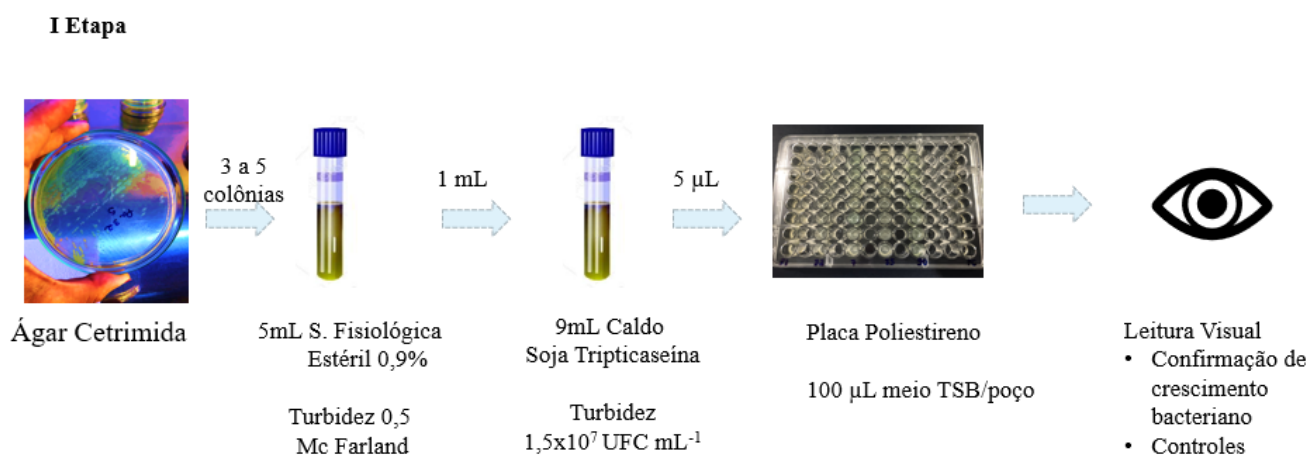
Os testes de formação de biofilme foram realizados seguindo a metodologia descrita por Stepanović *et al.* (2007) com modificações. 3 a 5 colônias isoladas e típicas de *P. aeruginosa* crescidas em ágar cetrimida foram dissolvidas em 5 mL de solução fisiológica estéril 0,9 % e o inóculo foi ajustado a $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹ de acordo com a turbidez da suspensão na escala 0,5 de McFarland.

Em seguida, 1 mL de cada suspensão foi transferida para tubo contendo 9 mL de TSB, ajustando o inóculo para $1,5 \times 10^7$ UFC mL⁻¹. Posteriormente, foram colocados 5 µL da suspensão bacteriana em poços de uma microplaca de poliestireno contendo 100 µL do meio de cultura TSB, perfazendo um inóculo inicial de 1×10^5 UFC mL⁻¹. Foram incluídos controle de esterilidade com poços não inoculados e as microplacas foram incubadas em estufa a 35,5 °C por 24 h.

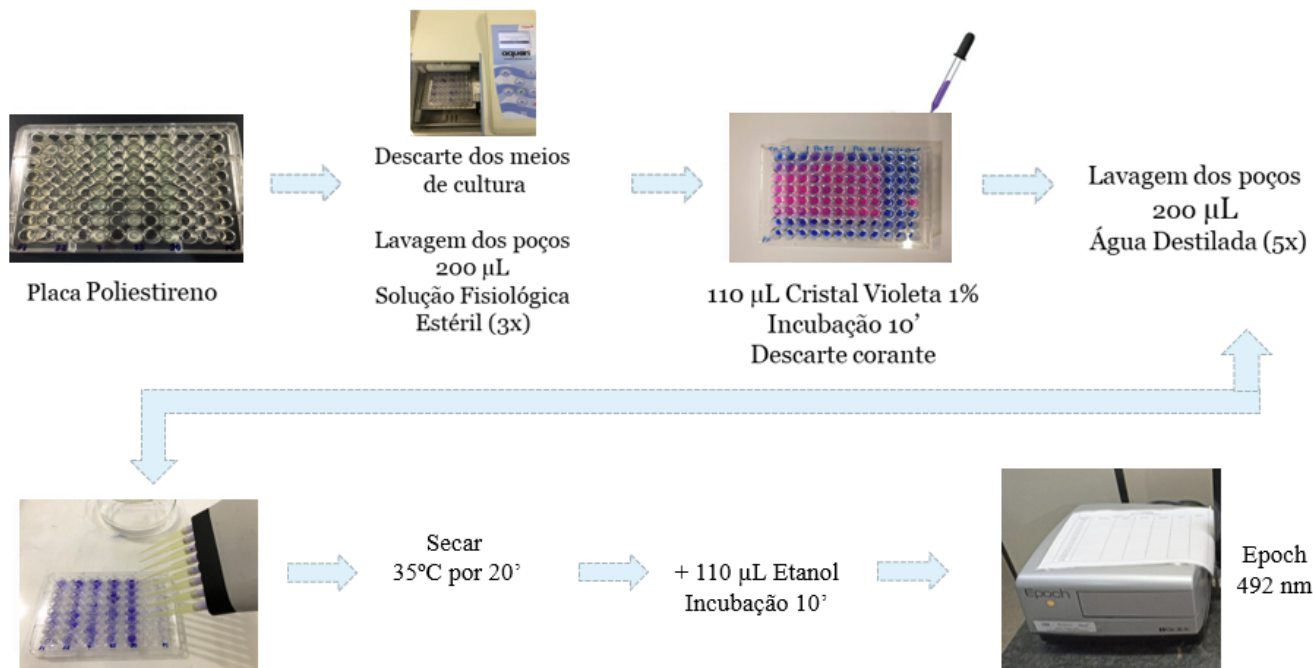
Após este período, foi realizada a leitura visual confirmando o crescimento bacteriano e a não contaminação dos controles (Etapa I). Seguidamente, os meios de cultura foram retirados dos poços e estes lavados três vezes com 200 µL de solução fisiológica estéril para a remoção das células não aderidas. As placas foram tratadas de acordo com a metodologia proposta por Naves *et al.* (2008) com a adição de 110 µL de cristal violeta 1% e incubação à temperatura ambiente por 10 minutos, em seguida, o corante foi desprezado e os poços lavados cinco vezes com 200 µL de água destilada.

As placas foram secas em estufa a 35,5°C por 20 minutos e após esse período foram adicionados 110 µL de etanol absoluto em cada poço para solubilização da coloração das bactérias aderidas e a placa incubada durante 10 minutos. Posteriormente, as leituras das densidades ópticas (DO) de cada poço foram realizadas por um espectrofotômetro de microplacas BioTek Epoch™ a 492 nm (Etapa II). Pode ser observado na figura 4 esquema das etapas I e II do ensaio de verificação de biofilme em *P. aeruginosa*.

Figura 4 – Ensaio de formação de biofilme por isolados clínicos e cepas padrão de *P. aeruginosa*.



II Etapa



Fonte: Autoria própria

O índice de formação de biofilme foi calculado pelos valores das densidades ópticas obtidas dos poços por meio da seguinte fórmula: $FB = BA - PC$ segundo Naves (2008), sendo:

FB - formação do biofilme

BA - densidade óptica das bactérias aderidas aos poços e

PC - densidade óptica dos poços não inoculados

Para a classificação da formação de biofilme foi realizada metodologia de Stepanović *et al.* (2007) seguindo os seguintes parâmetros:

Não formadora = $BA \leq PC$

Fracamente formadora = $PC \leq BA \leq 2.PC$

Moderadamente formadora = $2.PC < BA \leq 3.PC$ e

Fortemente formadora = $3.PC < BA$

4.3 Verificação de motilidade tipo “swimming”

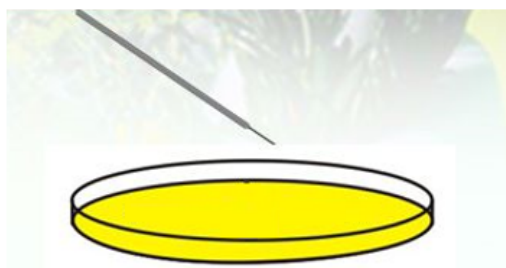
Para verificação da motilidade tipo “swimming” foi utilizada metodologia proposta por Ha *et al.* (2014a). Para tal, foram inoculadas amostras da bactéria utilizando palito estéril em placas de Petri contendo ágar acrescido de solução 5xM8; glicose 0,2%; 0,5% de casamino ácido e 1mL de 1M MgSO₄. Em seguida, as placas foram incubadas a 35,5 °C por 16 a 24 h e observados os fenótipos apresentados. Este ensaio aferiu o grau da motilidade dependente de flagelo de *P. aeruginosa*.

A extensão da motilidade é baseada em sua migração radial através do ágar, sendo possível medir a área coberta pela zona de motilidade de cada cepa (como representado por um

crescimento radial), fazendo comparação com outras cepas em questão através de distribuição em quartis. A figura 5 apresenta exemplo de motilidade tipo “swimming”.

Figura 5 – Verificação da motilidade tipo *swimming* de isolados de *P. aeruginosa*. Em A, B e C resultado *swimming* positivo e em D resultado *swimming* negativo

○ **Ensaio**



Meio ágar 5xM8; glicose 0,2%; 0,5% de casamino ácido e 1mM MgSO₄

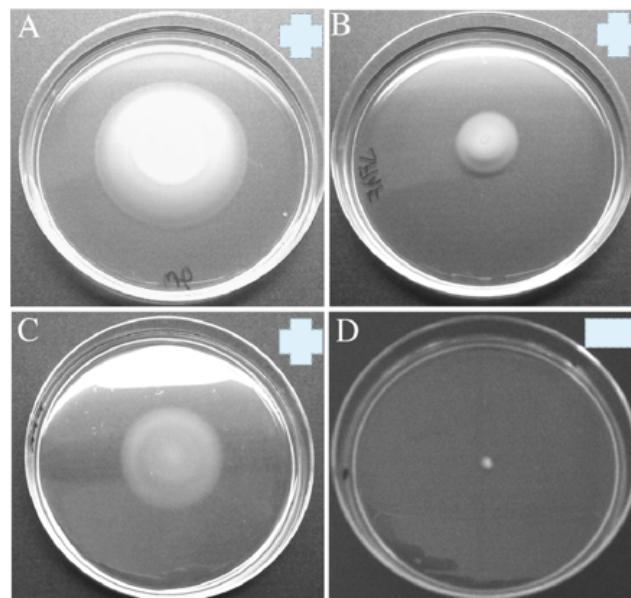


Inoculação com palito estéril



Incubação a 35,5 ° C por 16-24 h

○ **Leitura**

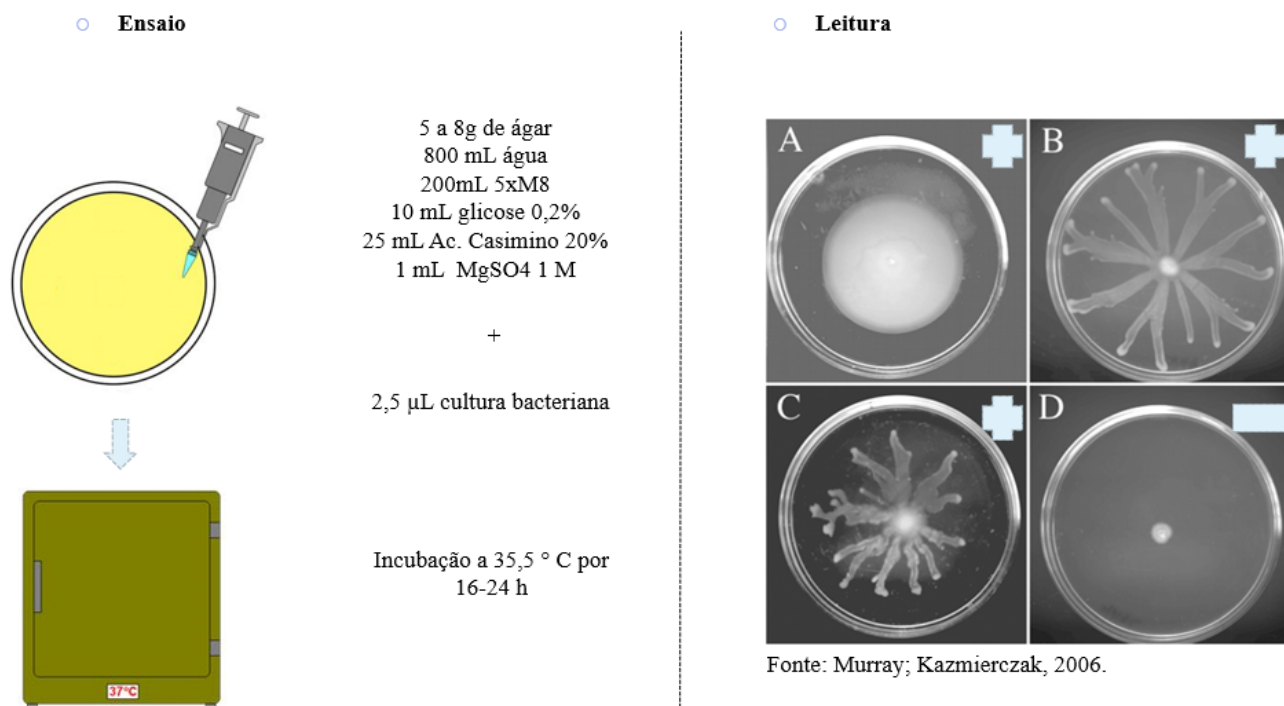


Fonte: Murray; Kazmierczak, 2006.

4.4 Verificação de motilidade tipo “swarming”

Para verificação da motilidade tipo “swarming” foi utilizada metodologia proposta por *Ha et al.* (2014b). Para o preparo do ágar adicionou-se entre 5 a 8 g de ágar acrescido de 200 mL de solução 5xM8; 10 mL de glicose 0,2%; 25 mL de solução de ácido casamino a 20% e 1 mL de 1M MgSO₄. Em seguida, preparou-se as placas de Petri com 25 mL da mistura. As placas foram inoculadas no centro com 2,5 µL de cultura bacteriana em período noturno e incubadas na posição vertical a 35,5 °C por 16 a 24 h e observados os fenótipos apresentados. Este ensaio aferiu o grau da motilidade dependente-flagelar de *P. aeruginosa* em meios gelatinosos ou viscosos. É importante ressaltar que não existe ensaio padronizado para visualizar e estudar a motilidade “swarming”, no entanto, a reprodução deste ensaio permitirá comparações futuras. Pode ser observado na figura 6 exemplo de motilidade tipo “swarming”.

Figura 6 – Verificação da motilidade tipo *swarming* de isolados de *P. aeruginosa*.. Em A, B e C resultado *swarming* positivo e em D resultado *swarming* negativo



4.5 Produção de protease alcalina

A pesquisa de produção de protease alcalina foi realizada de acordo com o método de Jagger *et al.* (1983). Os isolados foram inoculados em *spots* em placas de ágar *skim milk* (2%) e incubados a 35,5°C por 24 h. A presença de halo translúcido ao redor das colônias é indicativo de produção de protease alcalina e a ausência de halo indicativo de resultado negativo. As cepas de referência *P. aeruginosa* ATCC 27853 e ATCC 9027 foram utilizadas como controle da técnica.

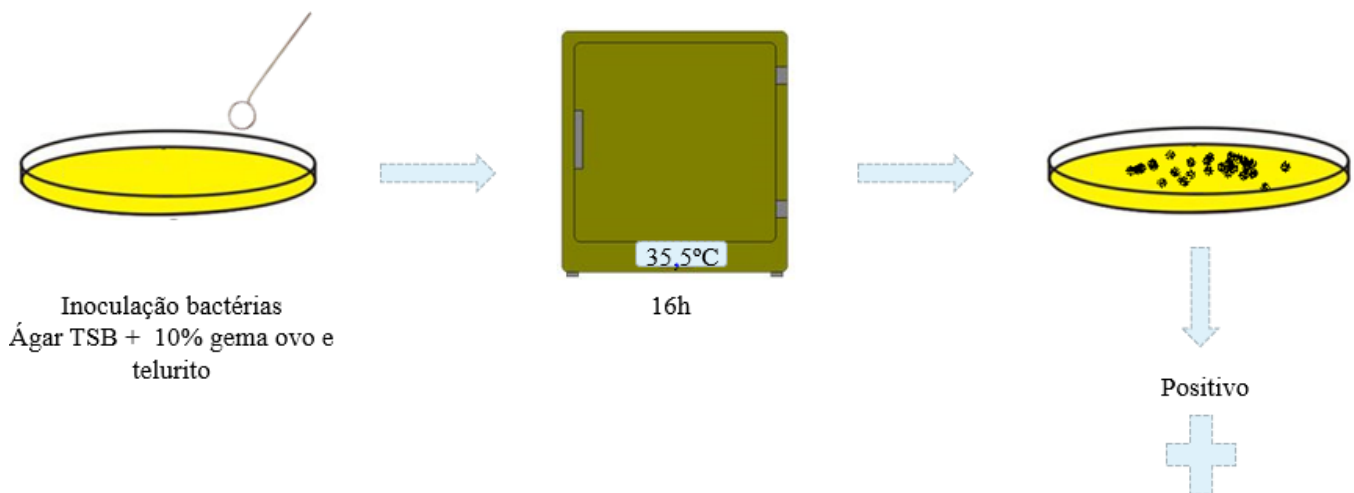
4.6 Produção de hemolisinas

Para a verificação da produção de hemolisinas, as bactérias foram semeadas em ágar sangue de carneiro e incubadas a 35,5°C por 24 h. Foram considerados produtores de hemolisinas, os isolados que apresentaram halo translúcido ao redor das colônias, indicando hemólise (WINN JR *et al.*, 2008). As cepas de referência *P. aeruginosa* ATCC 27853 e ATCC 9027 foram utilizadas como controle de técnica.

4.7 Produção de fosfolipase C

Para determinação da produção de fosfolipase C, foi utilizado o método descrito por Habermann; Hardt (1972) com modificações. Os micro-organismos foram inoculados em *spots* em placas de Petri contendo meio de cultivo TSA enriquecido com 10% (vol/vol) de solução de gema de ovo com telurito. As placas foram incubadas a 35,5°C por 24 h. Para a análise dos resultados, a produção de um precipitado negro sobre a zona de crescimento é considerado como produtores de fosfolipase C (Figura 7) e os que não apresentaram o precipitado como não produtores de fosfolipase C.

Figura 7 – Esquema para determinação de produção de fosfolipase C dos isolados e cepas padrões de *P. aeruginosa*



4.8 Produção de lipases

A atividade lipolítica de *P. aeruginosa* foi detectada através da formação de halos ao redor das colônias em três tipos de meios, sendo A (*tween* 80), B (tributirina) e C (rodamina B) de acordo com Choo *et al.* (1998). Dessa forma, o meio de cultura base formado por 1% tripton, 0,5% extrato de levedura, 0,5% NaCl e pH 7,2 foi enriquecido com os seguintes componentes:

- Meio A: meio base com adição de 0,01% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 1% *tween* 80
- Meio B: meio base com adição de 0,01% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 1% de tributirina
- Meio C: meio base com adição de 2,5% de azeite de oliva comercial e 0,001% de rodamina B.

Foi considerado como resultado positivo, o surgimento de zonas claras ao redor das colônias bacterianas dos meios A e B indicam a produção de enzima ativa catalítica. A visualização de halos de cor laranja fluorescente ao redor das colônias sob luz UV a 350 nm

indicam atividade catalítica no meio C (HASAN *et al.*, 2009). As cepas de referência foram utilizadas como controle da técnica.

4.9 Produção de pioverdina

Para a verificação de pioverdina foi utilizada metodologia de Winn Jr *et al.* (2008). A avaliação da produção de pigmento se deu pelo cultivo das colônias em ágar cetrimida a incubação a 35,5°C por 24 h, em que foi confirmada ao submeter às culturas à luz ultravioleta e estas emitirem fluorescência. As cepas de referência foram utilizadas como controle da técnica.

4.10 Análises estatísticas

Todos os ensaios foram realizados em triplicatas independentes. As variáveis quantitativas foram ordenadas em médias e desvios padrão e as variáveis qualitativas apresentadas em forma nominal (positivo/negativo). O teste de Fisher (QuickCales, GraphPad Software, LLC 2022) foi utilizado para avaliar se as diferenças entre a distribuição dos fatores de virulência entre os grupos de formação de biofilme foi significativa ($p < 0,05$)

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Formação de biofilme

Todas as 32 *P. aeruginosa* foram capazes de formar biofilmes, sendo que 15 (46,9%) foram classificadas como formadoras fortes, 8 (25%) como formadoras moderadas e 9 (28,12%) formadoras fracas de biofilme, conforme pode ser verificado na figura 8 e tabela 1.

Figura 8 – Distribuição das cepas de acordo com o índice de formação de biofilme.

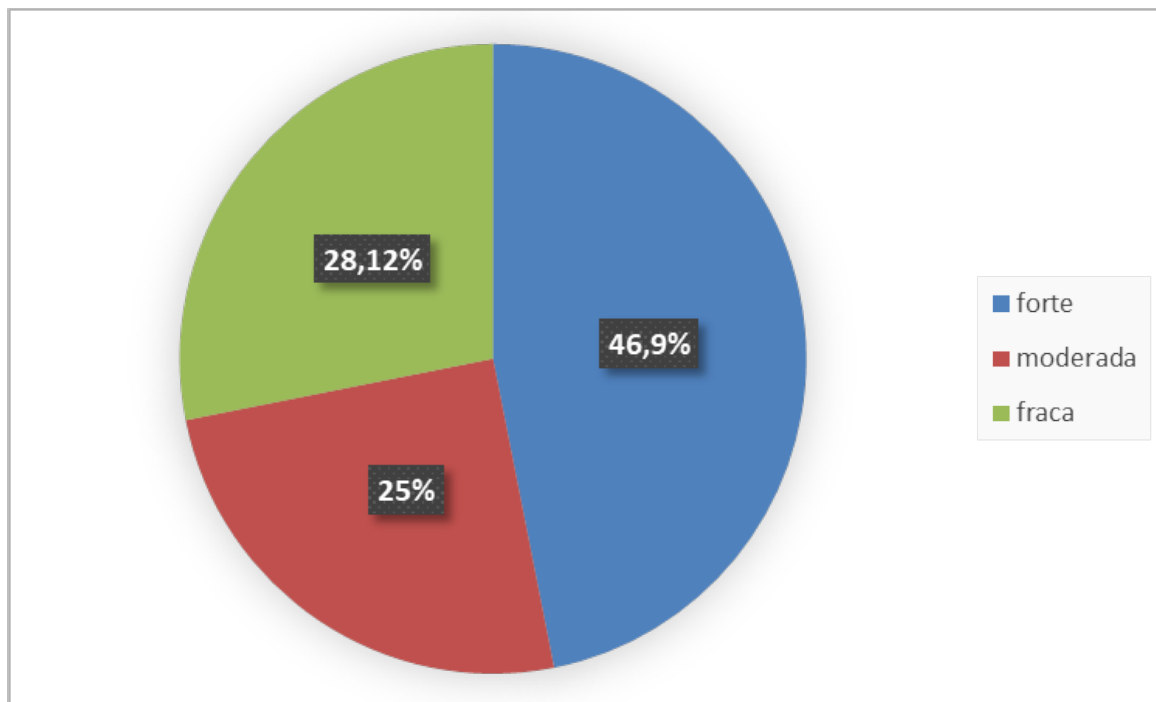


Tabela 1 - Índice e categoria de formação de biofilme dos isolados clínicos e cepas padrão de *P. aeruginosa*.

<i>P. aeruginosa</i>	Formação de biofilme (MED±DP)	Categoria de formação de biofilme
Pa01	0,098±0,079	moderada
Pa02	0,109±0,013	moderada
Pa03	0,278±0,075	forte
Pa04	0,134±0,034	forte
Pa05	0,175±0,081	forte
Pa06	0,184±0,067	forte
Pa07	0,087±0,016	fraca
Pa08	0,128±0,061	moderada
Pa10	0,079±0,049	fraca
Pa11	0,278±0,092	forte
Pa12	0,138±0,047	forte
Pa13	0,063±0,013	fraca
Pa14	0,064±0,027	fraca
Pa15	0,155±0,080	forte
Pa16	0,118±0,054	moderada
Pa17	0,097±0,042	moderada
Pa18	0,073±0,024	fraca
Pa19	0,064±0,018	fraca
Pa20	0,178±0,046	forte
Pa21	0,174±0,074	forte
Pa22	0,190±0,073	forte
Pa23	0,168±0,084	forte
Pa24	0,126±0,055	moderada
Pa26	0,101±0,054	moderada
Pa27	0,118±0,061	moderada
Pa28	0,197±0,141	forte
Pa29	0,148±0,052	forte
Pa30	0,149±0,052	forte
Pa31	0,069±0,014	fraca
Pa32	0,074±0,013	fraca
Pa ATCC27853	0,079±0,019	fraca
Pa ATCC 9027	0,149±0,052	forte

Legendas: MED = média, DP = desvio padrão, Pa = *P. aeruginosa*, CNI = caldo não inoculado.

As maiores formadoras de biofilme foram as *P. aeruginosa* Pa03, Pa11, Pa28, Pa22, Pa20, Pa05 e Pa21. Destas, a Pa03 e Pa11 apresentaram os maiores índices de formação de biofilme, com valores de 0,278±0,075 e 0,278±0,092, respectivamente. Em estudo realizado por ABDI-ALI *et al.* (2006), foi verificado a formação de biofilme de 41 cepas de *P. aeruginosa*, sendo que todas apresentaram formação de biofilme, com a maior formadora apresentando um resultado de densidade óptica de 2,89.

Os estudos da capacidade das bactérias em formar biofilmes são justificados pela

dificuldade que esta modalidade de crescimento microbiano causa na terapia antimicrobiana, visto que, crescendo na forma sésil, os micro-organismos tendem a ser mais resistentes ao tratamento antimicrobiano que as formas planctônicas (PLYUTA *et al.*, 2013).

A formação de biofilme microbiano nas superfícies de tubos endotraqueais favorece a disseminação de infecções bacterianas nas vias aéreas inferiores e dificulta o controle químico dos micro-organismos no ambiente hospitalar e o tratamento dos pacientes com processos infecciosos causados por *P. aeruginosa* (VANDECANDELAERE *et al.*, 2012).

5.2 Motilidade “swimming” e “swarming”

Estes ensaios aferiram o grau da motilidade dependente de flagelos nas bactérias e a extensão da motilidade foi baseada em sua migração radial sobre ágar, isto é, adaptabilidade e translocação bacteriana em superfícies. Foi constatado que 26 (81,25%) *P. aeruginosa* expressaram resultados positivos para motilidade do tipo *swimming* e 6 (18,75%) apresentaram resultados negativos, ou seja, baixa translocação em superfícies. Os resultados da motilidade tipo *swimming* estão na Tabela 2 e os aspectos coloniais de alguns isolados podem ser observados na Figura 8.

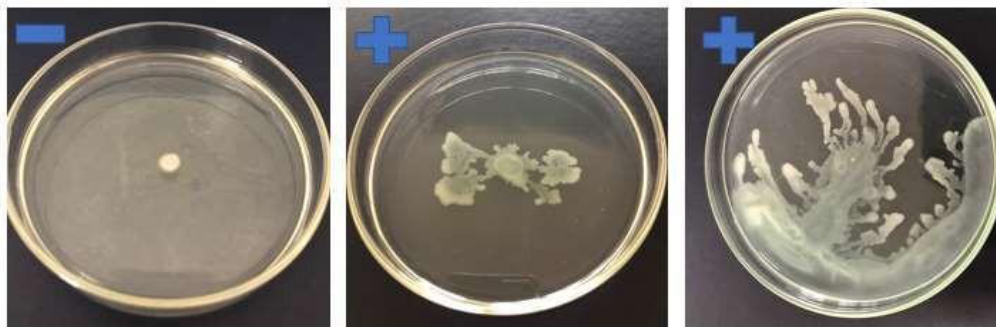
Figura 9 – Aspectos coloniais da motilidade tipo *swimming* de *P. aeruginosa*. Resultado negativo: Pa03, resultados positivos: Pa04 e Pa09



Fonte: Autoria própria

Foi constatado que 23 (71,87%) *P. aeruginosa* foram positivas para motilidade do tipo *swarming* e 9 (28,13%) negativas. Os resultados da motilidade tipo *swarming* são mostrados na Tabela 2 e os aspectos coloniais de alguns isolados podem ser observados na Figura 9.

Figura 10 – Aspectos coloniais da motilidade tipo *swarming* de *P. aeruginosa*. Resultado negativo: Pa13, resultados positivos: Pa05 e Pa14



Autoria própria.

A motilidade de superfície é uma adaptação complexa que leva à resistência a antibióticos e vários medicamentos e à produção de fatores de virulência em *P. aeruginosa*. Esse fenômeno está recebendo cada vez mais atenção pelos pesquisadores (TREMBLAY; DÉZIEL, 2008; BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2013), pois está relacionada com o desenvolvimento de *P. aeruginosa*.

5.3 Expressão dos outros fatores de virulência

A tabela 2 mostra os outros fatores de virulência estudados. A pioverdina foi o fator de virulência mais frequente, detectado em 100% dos isolados. A produção de hemolisina foi detectada em 30 cepas (93,7%), seguida de protease e lipases meio B, detectados em 29 das *P. aeruginosa* (90,6%). Os fatores de virulência de menor incidência foram lipase meio A encontradas em 13 (40,6%) e lipase C em 21 (65,6%) dos isolados.

Tabela 2 - Fatores de virulência dos isolados clínicos e cepas padrão de *P. aeruginosa*

Fatores de virulência

Isolados	Swi	Swa	PA	Hemol	Fosfo C	Lip A	Lip B	Lip C	Piov
Pa01	+	+	+	+	-	-	+	-	+
Pa02	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Pa03	-	+	+	+	-	-	+	+	+
Pa04	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Pa05	-	+	+	+	+	+	+	-	+
Pa06	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Pa07	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Pa08	+	+	+	+	-	-	+	+	+
Pa10	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pa11	+	+	+	+	-	-	+	+	+
Pa12	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pa13	+	-	-	+	+	-	+	+	+
Pa14	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pa15	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Pa16	+	+	-	+	+	+	+	-	+
Pa17	-	-	-	+	-	-	+	-	+
Pa18	-	+	+	+	-	-	-	-	+
Pa19	-	-	+	+	+	-	+	-	+
Pa20	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pa21	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Pa22	+	-	+	+	+	-	+	-	+
Pa23	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Pa24	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Pa26	-	+	+	+	+	-	+	-	+
Pa27	+	-	+	-	+	-	+	+	+
Pa28	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Pa29	+	+	+	-	+	-	+	+	+
Pa30	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pa31	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Pa32	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Pa ATCC 27853	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pa ATCC 9027	+	+	+	+	-	+	+	+	+

Legendas: Pa = *P. aeruginosa*, Swi = *swimming*, Swa = *swarming*, PA = Protease alcalina, Hem = hemolisina, Fosfo C = fosfolipase C, Lip A = lipase em meio A, Lip B = lipase em meio B, Lip C = lipase em meio C, Piov = pioverdina, ATCC = American Type Culture Collection

As proteases extracelulares, principalmente a protease alcalina, contribuem para a aderência das bactérias. A produção de hemolisinas determina a patogenicidade, pois degrada os tecidos do hospedeiro e permite a invasão e disseminação, além de invasão na resposta imune. Já a fosfolipase C hidrolisa preferencialmente lipídios que contenham grupos de amônio quaternário, encontrados nas membranas eucarióticas e inativando o surfactante pulmonar, que pode ser responsável pelas atelectasias associadas às infecções pulmonares crônicas e agudas por *P. aeruginosa* (KIPNIS; SAWA; WIENER-KRONISH, 2006).

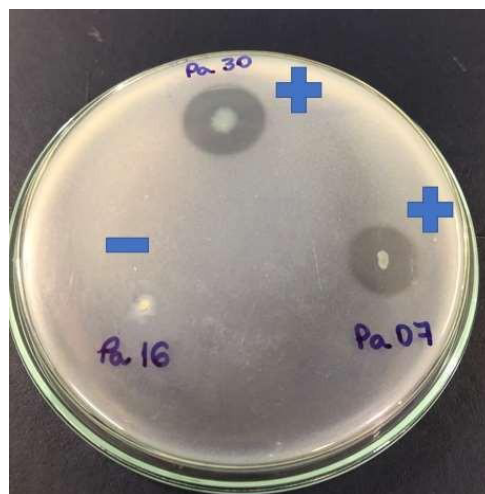
As lipases estão envolvidas na sinalização lipídica, provocando influência nos fenótipos virulentos de *P. aeruginosa*, principalmente LipA e LipC. LipA está associada à diminuição da produção de pioverdina em meios com privação de ferro e LipC afeta a mobilidade, bem como a produção de ramnolipídeos e formação de biofilme (FUNKEN *et al.*, 2011). Assim, a pioverdina é o principal sideróforo produzido por *P. aeruginosa*, estando evidente em colônias em

condições de deficiência de ferro. Além da obtenção de ferro, por excreção, seguido de incorporação após quelar o ferro férrico, estando associado na formação de biofilmes recorrentes nos pulmões (SAHA *et al.*, 2013).

A pioverdina está associada também na sua própria regulação e na regulação de outros fatores de virulência, por meio do reconhecimento do complexo pioverdina-ferro ao nível da membrana externa da célula, promovendo uma cascata de sinais citoplasmáticos, os quais irão regular os genes envolvidos na síntese da pioverdina, endoprotease e ToxA (KIPNIS; SAWA; WIENER-KRONISH, 2006).

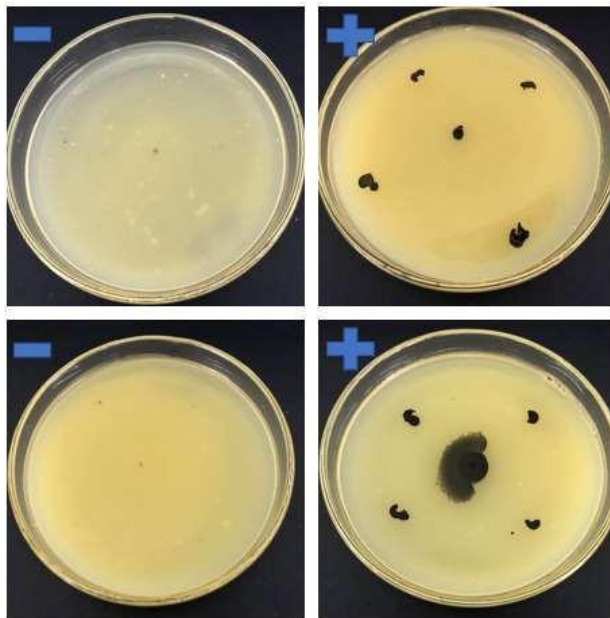
Na Figura 10 é possível verificar presença e ausência de halo no ensaio de protease alcalina. Na Figura 11 é possível verificar presença e ausência de produção de fosfolipase C. Em estudos de Silva *et al.* (2016) também foi verificado produção de protease alcalina acima de 80,00% e hemolisina entre 86,67% e 93,34%. Além disso, todos os grupos apresentaram produção de pioverdina, semelhante aos dados aqui mostrados.

Figura 11 – Aspectos coloniais de protease alcalina de isolados clínicos de *P. aeruginosa*. Resultado negativo: Pa16, resultados positivos: Pa07 e Pa30



Fonte: A autoria própria.

Figura 12 – Aspectos coloniais de fosfolipase C de isolados clínicos de *P. aeruginosa*. Resultados negativos: Pa01 e Pa03, resultados positivos: Pa06 e Pa15



Fonte: Autoria própria.

5.4 Distribuição dos fatores de virulência entre os grupos de formação de biofilme de *P. aeruginosa*

A prevalência de fatores de virulência nas categorias de formação de biofilme foi avaliada entre as categorias forte, moderada e fraca. A significância das diferenças foi verificada pelo teste bicaudal pareado de Fisher ($p < 0,05$) (Tabela 3).

Pioverdina, protease e lipase B foram detectadas em todos as formadoras fortes de biofilme de *P. aeruginosa*, hemolisina em 93,3%, motilidade swarming em 86,7% e fosfolipase C e lipase C em 80% das bactérias desta categoria. O grupo de formadoras moderadas de biofilme apresentou predomínio da produção de pioverdina e lipase média B em todos os isolados e detecção de hemolisina em 87,5%. Os fatores de virulência mais prevalentes na categoria de formadoras fracas de biofilme foram pioverdina e hemolisina em 100% dos isolados e protease e lipase B em 88,9%. A lipase A foi a característica fenotípica menos detectada em todos os grupos. Estudos com 19 isolados de *P. aeruginosa* corroboram a grande capacidade de produção de motilidade do tipo swimming e protease por este gênero (SAEKI *et al.*, 2020).

Semelhante ao nosso trabalho, em outro estudo verificou-se que 92% de *P. aeruginosa* expressaram hemolisina, 86% lipases, 86% protease e 84% formaram biofilme. No entanto, diferentemente deste estudo, os autores encontraram uma relação entre a produção de biofilme e a presença de genes de virulência e resistência antimicrobiana (EL-HALIM; NORA, 2021).

GAJDÁCS *et al.* (2021) verificaram os fatores de virulência de 302 isolados de *P. aeruginosa* e também não encontraram correlações relevantes entre a taxa de formação de biofilme e fatores de virulência. Entretanto, os dados sobre a interação entre a presença e os mecanismos de formação de biofilme e virulência são fundamentais para abordar infecções

bacterianas crônicas e fornecer estratégias para seu manejo diário (KIPNIS *et al.*, 2006).

Embora a incidência de motilidades do tipo swimming e swarming não tenha sido significativa nos formadores fortes em comparação com os demais grupos, foi possível observar que a maioria das cepas desse grupo (86,70%) apresentou motilidade swimming positiva, enquanto a motilidade swarming foi ligeiramente menor no grupo que formou menos biofilme. O resultado encontrado é semelhante a um estudo anterior (BEHZADI *et al.*, 2022), no qual também não foi observada associação significativa entre os tipos de motilidade e a capacidade de formação de biofilme ($p > 0,05$) em cepas de *P. aeruginosa* de fontes ambientais.

Motilidade está relacionada com o tipo de motilidade, adesão e colonização que são consideradas etapas iniciais de formação de biofilme (MATTINGLY *et al.*, 2018). Além disso, as *P. aeruginosa* possuem maior capacidade de motilidade associada a forte formação de biofilme quando comparadas a outras espécies do gênero (OTHON *et al.*, 2017).

Tabela 3 - Distribuição dos fatores de virulência de acordo com os grupos de formação de biofilme dos isolados clínicos e cepas padrão de *P. aeruginosa*.

VF	Categorias de formação de biofilme				p		
	Total n=32	Forte n=15	Moderada n=8	Fraca n=9	SF vs WF	MF vs WF	SF vs MF
Swi	26 (81.2%)	13 (86.7%)	6 (75%)	7 (77.8%)	0.6146	1.0000	0.5889
Swa	23 (71.9%)	13 (86.7%)	5 (62.5%)	5 (55.5%)	0.1501	0.2969	0.1501
AP	29 (90.6%)	15 (100%)	6 (75%)	8 (88.9%)	0.3750	5.765	0.1107
Hemo	30 (93.7%)	14 (93.3%)	7 (87.5%)	9 (100%)	1.0000	0.4706	1.0000
FosC	24 (75%)	12 (80%)	5 (62.5%)	7 (77.8%)	1.0000	0.6199	0.6214
LipA	13 (40.6%)	7 (46.7%)	1 (12.5%)	5 (55.5%)	1.0000	0.1312	0.1763
LipB	31 (96.9%)	15 (100%)	8 (100%)	8 (88.9%)	0.3750	1.0000	1.0000
LipC	23 (71.9%)	12 (80%)	4 (50%)	7 (77.8%)	1.0000	0.3348	0.1819
Piov	32 (100%)	15 (100%)	8 (100%)	9 (100%)	1.0000	1.0000	1.0000

Legendas: p = nível de significância ($p < 0.05$), FV = fatores de virulência, Swi = *swimming*, Swa = *swarming*, AP = protease alcalina, Hemo = hemolisina, FosC = fosfolipase C, LipA = lipase A, LipB = lipase B, LipC = lipase C, Piov = pioverdina, FF = fortes formadoras de biofilme, MF = Moderadas formadoras de biofilme, vs = versus, Ff = Formadoras fracas de biofilme.

A produção de diferentes fatores de virulência é preocupante e proporciona melhor invasão ao hospedeiro, adesão às superfícies e sobrevivência ao ambiente, inclusive o hospitalar (ZINEBA *et al.*, 2015). Os dados apresentados neste estudo corroboram com a conclusão de Wolfgang *et al.* (2003), que sustentam que o genoma de *P. aeruginosa* é altamente conservado, independente da fonte de isolamento. Entretanto, não se exclui a virulência das cepas neste estudo e a sua importância em pacientes hospitalizados.

6. CONCLUSÕES

Neste estudo, identificamos que todas as cepas de *P. aeruginosa* foram capazes de formar biofilme, que a maioria dos isolados expressou os fatores de virulência investigados e que não houve correlação entre a formação do biofilme e as motilidades *swimming* e *swarming*, protease alcalina, hemolisina, fosfolipase C, lipases em A, B e C e pioverdina.

Embora não tenha sido detectada correlação entre a formação de biofilme dos isolados clínicos de *P. aeruginosa* e os fatores de virulência estudados, observamos que no grupo das formadoras fortes foi detectada expressão de protease alcalina e lipase B em todas as cepas, no nas formadoras moderadas a lipase B foi encontrada em 100% dos isolados e que todos os isolados do grupo das formadoras fracas produziram hemolisina.

Em outro estudo, os fatores de virulência de 302 isolados de *P. aeruginosa* foram analisados e também não foram encontradas correlações relevantes entre a taxa de formação de biofilme e os fatores de virulência (GAJDÁCS *et al.*, 2021). No entanto, dados sobre a interação entre a presença e os mecanismos de formação e virulência do biofilme são fundamentais para o enfrentamento das infecções bacterianas crônicas e fornecimento de estratégias para o seu manejo diário (OTTON *et al.*, 2017).

Nossos resultados sugerem que a patogenicidade de *P. aeruginosa* é um fenômeno multifatorial e que os fatores de virulência, embora presentes na maioria dos isolados, ocorrem independentemente da categoria de formação de biofilme da *P. aeruginosa* estudada.

7. REFERÊNCIAS

ABDI-ALI, A., MOHAMMADI-MEHR, M., & ALAEI, Y. A. Bactericidal activity of various antibiotics against biofilm-producing *Pseudomonas aeruginosa*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 27, n. 3, p. 196-200, 2006.

ALHAZMI, A. *Pseudomonas aeruginosa* – Pathogenesis and Pathogenic Mechanisms. **International Journal of Biology**. v. 7, n. 2. 2015.

ANDREJKO, M., ZDYBICKA-BARABAS, A., JANCZAREK, M., CYTRYŃSKA, M. Three *Pseudomonas aeruginosa* strains with different protease profiles. **Acta Biochimica Polonica**, v. 60, n. 1, p. 83-90, 2013.

ANUJ, S., & WHILEY, D. M. *Pseudomonas aeruginosa*. In **PCR for Clinical Microbiology: An Australian and International Perspective**. 2010.

BALASUBRAMANIAN, D., SCHNEPER, L., KUMARI, H., MATHEE, K. A dynamic and intricate regulatory network determines *Pseudomonas aeruginosa* virulence. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 1, p. 1-20, 2013.

BEHZADI, P., GAJDÁCS, M., PALLÓS, P., ÓNODI, B., STÁJER, A., MATUSOVITS, D., DONADU, M. G. Relationship between Biofilm-Formation, Phenotypic Virulence Factors and Antibiotic Resistance in Environmental *Pseudomonas aeruginosa*. *Pathogens*. 2022; 11(9):1-14.

BOLAND, T., LATOUR R. A., STUTZENBERGER, F. J. Molecular Basis of Bacterial Adhesion. In: AN, Y. H., FRIEDMAN, R. J. eds. **Handbook of Bacterial Adhesion: Principles, Methods and Applications**. Totowa, NJ, Humana Press Inc., v. 2, p. 29-41, 2000.

CAIXETA, M. A. B., BRAGA, A. S., ALMEIDA, D. G. S., PINTO, O. G., SANTANA, E. S., & NAVES, P. Z. F. Estudo da formação de biofilmes por *Pseudomonas aeruginosa*. *Enciclopédia Biosfera*, v. 16, n. 29, 2019.

CHEGINI, Z., KHOSH BAYAN, A., MOGHADAM, M. T., FARAHANI, I., JAZIREIAN, P., & SHARIATI, A. Bacteriophage therapy against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: A review. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 19, n. 1, p. 1-17, 2020.

CHOO, D. W., KURIHARA, T., SUZUKI, T., SODA, K., ESAKI, N. A cold-adapted lipase of an Alaskan psychrotroph, *Pseudomonas* sp. strain B11-1: gene cloning and enzyme purification and characterization. **Microbiology Applied and Environmental**, v. 64, n. 2, p. 486-491, 1998.

CHUN, C. K., OZER, E. A., WELSH, M. J., ZABNER, J., & GREENBERG, E. P. Inactivation of a *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal by human airway epithelia. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 10, p. 3587-3590, 2004.

CIOFU, O., TOLKER-NIELSEN, T. Tolerance and Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms to Antimicrobial Agents-How *P. aeruginosa* Can Escape Antibiotics. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 913, 2019.

COLMER-HAMOOD, J. A., DZVOVA, N., KRUCZEK, C., & HAMOOD, A. N. In Vitro Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Virulence Using Conditions That Mimic the Environment at Specific Infection Sites. In **Progress in Molecular Biology and Translational Science** (Vol. 142). 2016.

CURRAN, C. S., BOLIG, T., TORABI-PARIZI, P. Mechanisms and targeted therapies for

Pseudomonas aeruginosa lung infection. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 197, n. 6, p. 708-727, 2018.

D'AGATA, E. *Pseudomonas aeruginosa* and Other Pseudomonas Species. In **Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases** (Eighth Edi, Vol. 2). 2014. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-4801-3.00221-6>

DE FREITAS, M. B., MOREIRA, E. A. M., TOMIO, C., MORENO, Y. M. F., DALTOE, F. P., BARBOSA, E., & GUARINO, A. Altered intestinal microbiota composition, antibiotic therapy and intestinal inflammation in children and adolescents with cystic fibrosis. **PLOS ONE**, v. 13, n. 6, p. e0198457, 2018.

DA COSTA LIMA, J. L., ALVES, L. R., DA PAZ, J. N. P., RABELO, M. A., MACIEL, M. A. V., & DE MORAIS, M. M. C. Analysis of biofilm production by clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with ventilator-Associated pneumonia. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 29, n. 3, p. 310-316, 2017.

EL-HALIM, A., NORA, Z. Phenotypic and molecular characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn unit. **Egypt. J. Med. Microbiol.** 2021; 30(1):19-28.

ELLEBOUDY, N. S.; ABOULWafa, M. M.; HASSOUNA, N. A. H. Phospholipases C from *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus cereus*; characterization of catalytic activity. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 7, n. 11, p. 860-866, 2014.

FAZLUL, M. K. K., NAZMUL, M. H. M. Detection of virulence factors and β -lactamase encoding genes among the clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of International Pharmaceutical Research**, v. 45, p. 190-202, 2018.

FUNKEN, H., KNAPP, A., VASIL, M. L., WILHELM, S., JAEGER, K. E., ROSENAU, F. The lipase LipA (PA2862) but not LipC (PA4813) from *Pseudomonas aeruginosa* influences regulation of pyoverdine production and expression of the sigma factor PvdS. **Journal of Bacteriology**, v. 193, n. 20, p. 5858-5860, 2011.

GAJDÁCS, M., BARÁTH, Z., KÁRPÁTI, K., SZABÓ, D., USAI, D., ZANETTI, S., & DONADU, M. G. et al. No correlation between biofilm formation, virulence factors, and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: results from a laboratory-based in vitro study. **Antibiotics**, v. 10, n. 9, p. 1134, 2021.

GHOLAMI, S., TABATABAEI, M., SOHRABI, N. Comparison of biofilm formation and antibiotic resistance pattern of *Pseudomonas aeruginosa* in human and environmental isolates. **Microbial Pathogenesis**, v. 109, p. 94-98, 2017.

GILTNER, C. L., NGUYEN, Y., BURROWS, L. L. Type IV pilin proteins: versatile molecular modules. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 76, n. 4, p. 740-772, 2012.

GOODERHAM, W. J., HANCOCK, R. E. W. Regulation of virulence and antibiotic resistance by two-component regulatory systems in *Pseudomonas aeruginosa*. **FEMS, Microbiology Review**, v. 33, p. 279-294, 2009.

HA, D., KUCHMA, S. L., TOOLE, G. A. O. Plate-Based assay for swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*. **Pseudomonas Methods and Protocols**. Volume 1149, p. 67-72, 2014a.

HA, D., KUCHMA, S. L., & TOOLE, G. A. O. Plate-Based assay for swimming motility in *Pseudomonas aeruginosa*. **Pseudomonas Methods and Protocols**. Volume 1149, p. 59-65. 2014b.

HABERMANN, E., & HARDT, K. L. A sensitive and specific plate test for the quantitation of phospholipases. **Analytical Biochemistry**, v. 50, n. 1, p. 163–173, 1972.

HARMSSEN, M., YANG, L., PAMP, S., TOLKER-NIELSEN, T. An update on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, tolerance, and dispersal. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 59, p. 253-68. 2010.

HASAN, F.; SHAH, A.; HAMEED, A. Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 782-798, 2009.

HUANG, H., SHAO, X., XIE, Y., WANG, T., ZHANG, Y., WANG, X., DENG, X. An integrated genomic regulatory network of virulence-related transcriptional factors in *Pseudomonas aeruginosa*. **Nature communications**, v. 10, n. 1, p. 1-13, 2019.

JÁCOME, P. R. L. A., ALVES, L. R., CABRAL, A. B., LOPES, A. C. S., MACIEL, M. A. V. Phenotypic and molecular characterization of antimicrobial resistance and virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Recife, State of Pernambuco, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, p. 707-712, 2012.

JÁCOME, P. R. L. A. **Estudo epidemiológico e molecular de infecções ocasionadas por *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* spp. e *Acinetobacter* spp. em pacientes com neoplasias sólidas, internados em um hospital de Recife-PE.** 169f. Tese (Doutorado em Medicina Tropical) - Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, Pernambuco, 2015.

JAGGER KS, BAHNER DR, & WARREN RL. Protease phenotypes of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with cystic. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 55-59, 1983.

JAIN, R., BEHRENS, A. J., KAEVER, V., KAZMIERCZAK, B. I. Type IV pilus assembly in *Pseudomonas aeruginosa* over a broad range of cyclic di-GMP concentrations. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 16, p. 4285-4294, 2012.

JENNY, M., KINGSBURY, J. Properties and prevention: a review of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Biology and Medical Research**, v. 2, n. 3, p. 1-8, 2018.

JIMENEZ, P. N., KOCH, G., THOMPSON, J. A., XAVIER, K. B., COOL, R. H., QUAX, & W. J. The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 76, n. 1, p. 46-65, 2012.

JOO, H. S., OTTO, M. Molecular basis of in-vivo biofilm formation by bacterial pathogens. **Chemistry & Biology**, v. 19, n. 12, p. 1503-1513, 2012.

KARATUNA, O.; YAGCI, A. Analysis of quorum sensing-dependent virulence factor production and its relationship with antimicrobial susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa* respiratory isolates. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, n. 12, p. 1770-1775, 2010.

KILMURY, S., & BURROWS, L. The *Pseudomonas aeruginosa* PilSR two-component system regulates both twitching and swimming motilities. **BioRxiv-The Preprint server for biology**, p. 323923, 2018.

KIM, S. K., LEE, J. H. Biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Microbiology**, v. 54, n. 2, p. 71-85, 2016.

KING, J. D., KOCÍNCOVÁ, D., WESTMAN, E. L., & LAM, J. S. Revisão: Biossíntese de lipopolissacarídeos em *Pseudomonas aeruginosa*. **Imunidade Inata**, v. 15, n. 5, p. 261–312, 2009.

KIPNIS, E., SAWA, T., & WIENER-KRONISH, J. Targeting mechanisms of *Pseudomonas*

aeruginosa pathogenesis. **Medecine et Maladies Infectieuses**, v. 36, n. 2, p. 78-91, 2006.

KONEMAN, E. W., PROCOP, G. W., CHURCH, D. L., HALL, G. S., JANDA, W. M., SCHRECKENBERGER, P. C., WOODS, G. L. **Color atlas & textbook of diagnostic microbiology**. 6^o ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health, 2017.

KONG, F., YOUNG, L., CHEN, Y., RAN, H., MEYERS, M., JOSEPH, P., CHO, Y.-H., HASSETT, D.J., & AND LAU, G.W. *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin inactivates lung epithelial vacuolar ATPase-dependent cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression and localization. **Cellular Microbiology**, v. 8, n. 7, p. 1121-1133, 2006.

KUTSCHERA, A., SCHOMBEL, U., WRÖBEL, M., GISCH, N., RANF, S. Loss of wbpI disrupts O-polysaccharide synthesis and impairs virulence of plant-associated *Pseudomonas* strains. **Molecular Plant Pathology**, p. 1-15, 2019.

LAAR, T. A. V., ESANI, S., BIRGES, T. J., HAZEN, B., THOMAS, J. M., RAWAT, M. *Pseudomonas aeruginosa* shA mutant is defective in biofilm formation, swarming, and pyocyanin production. **American Society for Microbiology**, v. 3, n. 2, p. 1-13, 2018.

LAARMAN, A. J., BARDOEL, B. W., RUYKEN, M., FERNIE, J., MILDERS, F. J., STRIJP, J. A. V., ROOIJAKKERS, S. H. *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease blocks complement activation via the classical and lectin pathways. **Journal Immunology**, v. 188, n. 1, p. 386-393, 2012.

LEBEAUX, D., GHIGO, J. M., & BELOIN, C. Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 78, n. 3, p. 510-543, 2014.

LEIGHTON, T. L., BUENSUCESO, R. N. C., HOWELL, P. L., BURROWS, L. L. Biogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* type IV pili and regulation of their function. **Environmental Microbiology**, v. 17, n. 11, p. 4148-4163, 2015.

MALAFAIA, C. B. **Formação de biofilme, atividade antibiofilme de extratos vegetais e avaliação de métodos de extração de proteínas em fitobactérias**. 98f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, Pernambuco, 2016.

MALDONADO, R. F., SÁ-CORREIA, I., VALVANO, M. A. Lipopolysaccharide modification in gram negative bacteria during chronic infection. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 40, p. 480-493, 2016.

MARQUART, M. E., CABALLERO, A. R., CHOMNAWANG, M., THIBODEAUX, B. A., TWINING, S. S., & O'CALLAGHAN, R. J. Identification of a novel secreted protease from *Pseudomonas aeruginosa* that causes corneal erosions. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 46, n. 10, p. 3761-3768, 2005.

MASÁK, J., ČEJKOVÁ, A., SCHREIBEROVÁ, O., & ŘEZANKA, T. *Pseudomonas* biofilms: Possibilities of their control. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 89, n. 1, p. 1-14, 2014.

MATTINGLY, A. E., WEAVER, A. A., DIMKOVIKJ A., SHROUT, J. D. Assessing Travel Conditions: Environmental and Host Influences on Bacterial Surface Motility. **Journal Bacteriology**, v. 200, n. 11, p. 14-18, 2018.

MORADALI, M. F., GHODS, S., & REHM, B. H. A. *Pseudomonas aeruginosa* lifestyle: a paradigm for adaptation, survival, and persistence. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. 39, p. 1-29, 2017.

MULCAHY, L. R., VINCENT, I. M., LEWIS, K. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in disease.

Microbial Ecology, v. 68, n. 1, p. 1-12, 2014.

MURRAY, T. S., & KAZMIERCZAK, B. I. FlhF is required for swimming and swarming in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 19, p. 6995-7004, 2006.

NAVES, P., PRADO, G. D., HUELVES, L., GARCIA, M., RUIZ, V., BLANCO, J., DAHABI, G., BLANCO, M., PONTE, M. C., & SORIANO, F. Correlation between virulence factors and in vitro biofilm formation by *Escherichia coli* strains. **Microbial Pathogenesis**, v. 45, n. 2, p. 86-91, 2008.

OLSEN, I. Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 34, n. 5, p. 877-886, 2015.

OTTON L. M, CAMPOS M. S, MENEGHETTI K. L, CORÇÃO G. Influence of twitching and swarming motilities on biofilm formation in *Pseudomonas* strains. **Arch Microbiol**, v. 199, n. 5, p. 677-682, 2017.

OZER, E. A., NNAH, E., DIDELOT, X., WHITAKER, R. J., & HAUSER, A. R. The population structure of *Pseudomonas aeruginosa* is characterized by genetic isolation of exoU⁺ and exonS⁺ lineages. **Genome Biology and Evolution**, v. 11, n. 1, p. 1780-1796, 2019.

PAZ-ZARZA, V. M., MORDANI, S. M., MALDONADO, A. M., HERNÁNDEZ, D. A., GEORGINA, S. G. S., & VÁZQUEZ-LÓPEZ, R. *Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. **Revista Chilena de Infectología**, v. 36, n. 2, p. 180-189, 2019.

PEARSON, J. P., FELDMAN, M., IGLEWSKI, B. H., & PRINCE, A. *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signaling is required for virulence in a model of acute pulmonary infection. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 7, p. 4331-4334, 2000.

PEREIRA, S. M. S. G. ***Pseudomonas aeruginosa* em ambiente termal - Prevalência e determinantes de patogenicidade**. 176f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra - FFUC, Coimbra. 2013.

PLYUTA, V., ZAITSEVA, J., LOBAKOVA, E., ZAGOSKINA, N., KUZNETSOV, A. Effect of plant phenolic compounds on biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. **Apmis**, v. 121, n. 11, p. 1073-1081, 2013.

PRESTON, G. M., STUDHOLME, D. J., & CALDELARI, I. Profiling the secretomes of plant pathogenic Proteobacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, e. 2, 331-360. 2005.

RASAMIRAVAKA, T., LABTANI, Q., DUEZ, P., & JAZIRI, M. EL. The formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: a review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms. **BioMed Research International**, 2015.

RASHID, M. H., KORNBERG, A. Inorganic polyphosphate is needed for *swimming*, *swarming*, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 9, p. 4885-4890, 2000.

ROCHA, A. J., BARSOTTINI, M. R. O., ROCHA, R. R., LAURINDO, M. V., MORAES, F. L. L., ROCHA, S. L. *Pseudomonas aeruginosa*: virulence factors and antibiotic resistance genes. **Review Human & Animal Health**, v. 62, p. 1-15, 2019.

ROLSMA, S., FRANK, D. W., & BARBIERI, J. T. *Pseudomonas aeruginosa* toxins. In **The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins**. 2015.

ROSSEZ, Y., WOLFSON, E. B., HOLMES, A., GALLY, D. L., & HOLDEN, N. J. Flagelos bacterianos: Twist and Stick, ou Dodge across the Kingdoms. **Plos Pathogens**, v. 11, n. 1,

SADIKOT, R. T., BLACKWELL, T. S., CHRISTMAN, J. W., PRINCE, A. S. Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 171, n. 11, p. 1209-1223, 2005.

SAEKI, E.K., YAMADA, A.Y., SOUZA, I.A., ARAUJO, L., ANVERSA, R.K., KOBAYASHI, R.K.T., NAKAZATO, G. Pesquisa fenotípica dos fatores de virulência em *Pseudomonas aeruginosa* isolados de água de abastecimento público. **Scientia Plena**, v. 16, n. 6, 067502. 2020.

SAHA, R., SAHA, N., DONOFRIO, R. S., BESTERVELT, L. L. Microbial siderophores: a mini review. **Journal of Basic Microbiology**, v. 53, p. 303-317, 2013.

SALCEDO, D. G. O., SALVATIERRA, M. E. R. Evaluación de la influencia del meropenem en la formación de pioocianina y alginato en *Pseudomonas aeruginosa* formadora de biopelícula. **Farmacia Y** [s. l.], 2014.

SALEH, M. M., ABBAS, H. A., ASKOURA, M. M. Repositioning secnidazole as a novel virulence factors attenuating agent in *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbial Pathogenesis**, v. 127, p. 31-38, 2019.

SCOFFONE, V. C., TRESPIDI, G., CHIARELLI, L. R., BARBIERI, G., BURONI, S. Quorum sensing as antivirulence target in cystic fibrosis pathogens. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, p. 1-38, 2019.

SHAJIEI, A., MALAL, A. R., SHAHABI, G., FARHOUDI, R., FAEZI, S., TEBIANIAN, M., SOHRABI, N., MAHDAVI, M. *Pseudomonas aeruginosa* Recombinant Flagellin Induced Poly-Isotypic Humoral Immune Responses in the Balb/C Mice. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 6, n. 7, e6760, 2013.

SILVA, J. O.; COSTA, P. P.; RECHE, S. H. C. Manutenção de leveduras por congelamento a 20°C. **Revista Brasileira Análises Clínicas**, p. 73-74, 2008.

SILVA, S. T. **Análise fenotípica e genética de fatores virulência de isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* multidroga-sensível e multidroga-resistente de Recife-PE**. 69f. Universidade Federal de Pernambuco, Programa de Mestrado em Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública, 2016.

STEPANOVIĆ, S., VUKOVIĆ, D., HOLA, V., BONAVENTURA, GD., DJUKIĆ, S., ĆIRKOVIĆ, I., RUZICKA, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **Apms**. v. 115, n. 8, p. 891-899, 2007.

STOODLEY, P., SAUER, K., DAVIES, D. G., COSTERTON, J. W. Biofilm as Complex Differentiated Communities. **Annual review of microbiology**, v. 56, p. 187-209, 2002.

STRATEVA, T., & MITOV, I. Contribution of an arsenal of virulence factors to pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Annals of Microbiology**, v. 61, n. 4, p. 717-732, 2011.

STREETER, K., KATOULI, M. *Pseudomonas aeruginosa*: A review of their Pathogenesis and Prevalence in Clinical Settings and the Environment. **Infection, Epidemiology and Medicine**. 2. p. 25-32, 2016.

TAYLOR, P. K., YEUNG, A. T. Y., HANCOCK, R. E. W. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: Towards the development of novel anti-biofilm therapies. **Journal of Biotechnology**, v. 191, p. 121-130, 2014.

THI, M. T. T., WIBOWO, D., REHM, B. H. A. Biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa*. **Revista**

TODAR, K. **Todar's online Textbook of bacteriology**. 2012. Disponível em: <<http://www.textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html>>.

TOYOFUKU, M., & YOON, S. S. Nitric Oxide, an Old Molecule With Noble Functions in *Pseudomonas aeruginosa* Biology. **Advances in Microbial Physiology**, 1 ed., v. 72, p 117-145, 2018.

TRABULSI, L. R., & ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 6ª ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2015.

TREMBLAY, J.; DÉZIEL, E. Improving the reproducibility of *Pseudomonas aeruginosa* swarming motility assays. **Journal of Basic Microbiology**, v. 48, n. 6, p. 509-515, 2008.

TRUAN, D., VASIL, A., STONEHOUSE, M., VASIL, M., & POHL, E. High-level over-expression, purification, and crystallization of a novel phospholipase C/sphingomyelinase from *Pseudomonas aeruginosa*. **Protein Expression and Purification**, v. 90. p. 40-46, 2013.

VANDECANDELAERE, I., MATTHIJS, N., VAN NIEUWERBURGH, F., DEFORCE, D., VOSTERS, P., DE BUS, L., NELIS, H. J., DEPUYDT, P., & COENYE, T. Assessment of microbial diversity in biofilms recovered from endotracheal tubes using culture dependent and independent approaches. **PLoS One**, v. 7, n. 6, e38401, 2012.

VASIL, M. L. *Pseudomonas aeruginosa* phospholipases and phospholipids. In RAMOS, J. L., LEVESQUE, R. C. (eds). **Pseudomonas: molecular biology of emerging issues**. Springer, Dordrecht, Netherlands. p. 69–97, 2006.

WAGNER, S., SOMMER, R., HINSBERGER, S., LU, C., HARTMANN, R. W., EMPTING, M., & TITZ, A. Novel strategies for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, n. 13, p. 5929-5969, 2016.

WANG, H., TU, F., GUI, Z., LU, X., CHU, W. Antibiotic resistance profiles and quorum sensing-dependent virulence factors in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Indian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 163-167, 2013.

WANG, F., HE, Q., YIN, J., XU, S., HU, W., GU, L. BrIR from *Pseudomonas aeruginosa* is a receptor for both cyclic di-GMP and pyocyanin. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 2563, 2018.

WEI, Q., & MA, L. Z. Biofilm matrix and its regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 10, p. 20983-21005, 2013.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global priority list of antibiotic – resistant bacteria to guide research, discovery and development of new antibiotics**. Geneva: World Health Organization, 2017.

WIN JR., W., ALLEN, S., JANDA, W., KONEMAN, E., PROCOP, G., SCHRECKENBERGER, P., WOODS, G. Bacilos Gram-negativos não-fermentadores. In **Diagnóstico Microbiológico**. Ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro. 2008.

WOLFGANG, M. C., KULASEKARA, B. R., LIANG, X., LORY, S. Conservation of genome content and virulence determinants among clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 14, p. 8484-8489, 2003.

ZINEBA G, HASSAN L, MOSTAFA M, ABDELLAH H, MOHAMMED T, MOSTAFA ME.

Virulence phenotype, physicochemical properties, and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* on polyethylene used in drinking water distribution systems. **Water Resour**, v. 42, n. 1, p. 98–107, 2015.