



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

VERA LÚCIA DIAS SIQUEIRA

Pseudomonas aeruginosa: Genotipagem, alterações estruturais e expressão gênica diferencial após exposição à combinação de meropenem e ciprofloxacino

Maringá
2013

VERA LÚCIA DIAS SIQUEIRA

Pseudomonas aeruginosa: Genotipagem, alterações estruturais e expressão gênica diferencial após exposição à combinação de meropenem e ciprofloxacino

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos.

Orientador: Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Rosilene Fressatti Cardoso

Maringá
2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

S618p Siqueira, Vera Lúcia Dias
Pseudomonas aeruginosa: genotipagem, alterações estruturais e expressão gênica diferencial após exposição à combinação de meropenem e ciprofloxacino / Vera Lúcia Dias Siqueira. -- Maringá, 2013.
119 f. : il., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Celso Vaturu Nakamura.
Coorientadora: Prof.a Dr.a Rosilene Fressatti Cardoso.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2013.

1. *Pseudomonas aeruginosa*. 2. Multirresistência antimicrobiana. 3. Combinação antimicrobiana. 4. Meropenem. 5. Ciprofloxacino. 6. Expressão gênica. I. Nakamura, Celso Vaturu, orient. II. Cardoso, Rosilene Fressatti, coorient. III. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas IV. Título.

CDD 21.ed.615.50724

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Mariano e Zoroaide (in memoriam), que me apresentaram a importância da família, do respeito ao próximo e da persistência.

Ao meu marido Gilmar e meus filhos Augusto e Heloísa, razão de todo meu viver.

Sem vocês nenhuma conquista valeria a pena.

AGRADECIMENTOS

A Deus, senhor da minha vida e provedor de todas as minhas forças em busca dos meus ideais.

Aos meus pais (in memoriam), que sempre me apoiaram e agora, lá de cima, continuam me apoiando e eu humildemente espero estar correspondendo às expectativas.

Ao meu marido Gilmar e meus filhos, Augusto e Heloísa, pela compreensão e paciência infinitas.

Aos meus irmãos e suas respectivas famílias pelo apoio indireto e constante.

Ao Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura, orientador e exemplo de pesquisador. Meu agradecimento sincero pela oportunidade, pela confiança e toda orientação que tornaram possível a realização deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Rosilene Fressatti Cardoso, co-orientadora deste trabalho, amiga desde sempre, presente nos momentos necessários. Nunca serei grata o suficiente pela sua valorosa orientação e amizade.

Às professoras da disciplina de Bacteriologia Clínica: Rosilene, Luciana, Regiane, Fabiana pelo apoio e substituição nas aulas durante meu afastamento. Em especial à professora Katiany R. C. Ferracioli pelo apoio, compreensão, atenção e incentivo em todos os momentos.

Às colegas de trabalho do Laboratório de Bacteriologia Médica, amigas-irmãs: Rubia, Sonia, Soninha, Edilene e Paula por toda colaboração no desenvolvimento deste trabalho, pelo incentivo e sorrisos diários.

Ao técnico Marcos Apolinário dos Santos, amigo querido, obrigada por toda colaboração dispensada.

Às pós-graduandas, alunos de projetos de iniciação científica e aos bolsistas do Laboratório de Bacteriologia Médica, por toda cooperação durante a execução deste trabalho.

À prof^a. Dr^a Maria Aparecida Fernandez, pelo apoio e receptividade no Laboratório de Biologia Celular e Molecular durante o desenvolvimento dos experimentos de clonagem e sequenciamento.

À Adriana Fiorini, anjo solícito, e aos demais amigos do Laboratório de Biologia Celular e Molecular, pela colaboração nos experimentos de clonagem e sequenciamento.

À Regina Cintia, mais um anjo que Deus colocou para me auxiliar na difícil jornada de doutoranda pelo território do Comcap, obrigada pela colaboração nos trabalhos com o microscópio de varredura.

Às demais amigas da Central de Microscopia do Comcap, Ligia, Kátia e em especial à Michele Viana, outros anjos colocados em meu caminho, obrigada pela colaboração na manipulação dos microscópios eletrônicos.

À Juliana, Débora, Vanessa, Angelo, Jean, e aos demais amigos pós-graduandos do Laboratório de Microbiologia Aplicada ao Estudo de Produtos Naturais e Sintéticos, pela amizade e por todo auxílio prestado.

Aos professores do Laboratório de Microbiologia Aplicada ao Estudo de Produtos Naturais e Sintéticos em especial à professora Dr^a Tania U. Nakamura por apoiar a realização deste trabalho.

Aos professores que compuseram a banca para minha qualificação: prof^a Dr^a Maria Cristina B. Tognim, professora Dr^a Maria A. Fernandez e professor Dr Celso Luiz Cardoso, obrigada por toda atenção e tempo dedicados.

Ao professor Dr Luiz Carlos Corrêa e ao Nunes, técnico do Laboratório de Bioquímica, pela liberação de uso do forno Pasteur para preparação do material a ser usado nos procedimentos com RNA.

Aos professores, técnicos e pós-graduandos do Laboratório de Imunologia Clínica pela receptividade durante o uso de alguns equipamentos necessários para a realização deste trabalho.

Aos professores do Laboratório de Inflamação, em especial à professora Dr^a Silvana Caparróz e ao técnico Jaílson, pela pronta disponibilidade sempre que solicitado.

À Lilian Cristiane Baeza pela assessoria científica durante a realização da técnica de RDA.

À professora Dr^a Terezinha I.E. Svidzinski, demais professores, técnicos e pós-graduandos do Laboratório de Micologia Médica, pela disposição de alguns equipamentos necessários à realização deste trabalho.

Às professoras Dr^a Jane M. G. Mikcha e Dr^a Eliana Shimauti e aos demais professores, pessoal técnico e administrativo do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, pelo incentivo e palavras amigas.

Às técnicas Maria Aparecida Pinheiro e Marinete Martinez Vicentim pela colaboração dispensada no início de meus experimentos e pelo apoio constante.

Aos professores, técnicos e em especial à secretária Helena do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas por toda atenção dispensada.

Aos professores que prontamente aceitaram o convite para participarem da banca de defesa deste doutorado, muito obrigada pela dedicação e atenção.

Ao Laboratório de Bacteriologia Médica e Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas (LEPAC), por oferecer a estrutura utilizada no desenvolvimento de boa parte deste trabalho.

À Fundação Araucária e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por financiar parte do projeto de doutorado.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para realização deste trabalho, meu sincero agradecimento.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”. (Isaac Newton)

RESUMO

Siqueira, V.L.D. ***Pseudomonas aeruginosa*: Genotipagem, alterações estruturais e expressão gênica diferencial após exposição à combinação de meropenem e ciprofloxacino.** 2013, 119f. Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2013.

O uso de combinações antimicrobianas para o tratamento de infecções por *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes é comum na prática clínica. Entretanto, o mecanismo de ação destas associações mantém-se em grande parte desconhecido. O presente estudo identificou alterações estruturais e genes diferencialmente expressos decorrentes da exposição a concentrações subinibitórias de meropenem e ciprofloxacino isoladamente e em combinação (MCC) em um isolado clínico genotipicamente distinto de *P. aeruginosa* multirresistente (1071-MRPA). Os resultados deste trabalho foram compilados em dois manuscritos apresentados no capítulo II. Inicialmente, *P. aeruginosa* isoladas de pacientes internados em um hospital universitário de Maringá, Paraná, Brasil, entre janeiro de 2007 e julho de 2009, foram genotipadas pela técnica *enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction* (ERIC-PCR). Trinta e dois isolados genotipicamente distintos, multirresistentes e com resistência a pelo menos um dos antimicrobianos estudados, foram selecionados para determinação *in vitro* da ação antimicrobiana de MCC. Esta combinação foi sinérgica para 25,0% e 40,6% dos isolados de *P. aeruginosa* testados por *checkerboard* e curva de tempo de morte, respectivamente. Posteriormente, foram avaliadas alterações estruturais por microscopia eletrônica (varredura e transmissão) e alterações na expressão gênica, por análise da representação diferencial (*Representational Difference Analysis, RDA*) e PCR quantitativa em tempo real (qPCR), decorrentes da ação sinérgica de MCC em 1071-MRPA. Pela microscopia eletrônica, uma somatória das alterações morfológicas e estruturais observadas em 1071-MRPA expostas aos antimicrobianos isoladamente, foi visualizada nas células bacterianas expostas à MCC. Entretanto, vesículas de membrana externa, normalmente relacionadas à resposta SOS bacteriana e efeitos citotóxicos no hospedeiro, foram observadas em maior número após exposição ao ciprofloxacino e significativamente inibidas em MCC. Genes relacionados à biossíntese da parede celular e reparo de DNA, entre outros, foram diferencialmente expressos em 1071-MRPA exposta a meropenem, ciprofloxacino e MCC. Adicionalmente, as análises por qPCR revelaram que além dos genes diferencialmente expressos relacionados ao reparo de danos em parede celular e DNA, genes relacionados à resistência aos antimicrobianos estudados e regulação da resposta SOS

bacteriana foram menos expressos durante a exposição à MCC. Os resultados deste estudo sugerem que MCC pode ser uma alternativa para o tratamento de infecções por *P. aeruginosa* multirresistentes. Além disso, os efeitos de MCC em 1071-MRPA podem não somente resultar da somatória dos efeitos dos antimicrobianos isoladamente, mas uma ação diferenciada, provavelmente no mecanismo de proteção bacteriana.

Palavras-Chave: *Pseudomonas aeruginosa*. Multirresistência. Combinação antimicrobiana. Meropenem. Ciprofloxacino. Expressão gênica.

ABSTRACT

Siqueira, V.L.D. ***Pseudomonas aeruginosa*: Genotyping, Structural changes and differential gene expression after exposure to the meropenem and ciprofloxacin combination.** 2013. Thesis. State University of Maringá, 2013.

The use of antimicrobial combinations for the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infection is common in clinical practice. However, the mechanism of action of these combinations remains largely unknown. The present study identified structural changes and differentially expressed genes in a genotypically distinct multi-drug resistant *P. aeruginosa* clinical isolate (1071-MRPA) caused by exposure to subinhibitory concentrations of meropenem and ciprofloxacin alone and in combination (MCC). The results of this study were compiled into two manuscripts presented in Chapter II. Initially, *P. aeruginosa* isolates were obtained from patients in a university hospital in Maringá, Paraná, Brazil, from January 2007 to July 2009. The isolates were genotyped by enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction (ERIC-PCR). Thirty-two genetically distinct multidrug-resistant *P. aeruginosa* isolates and *P. aeruginosa* isolates resistant to at least one of two antimicrobials, were selected for the *in vitro* determination of the antimicrobial action of the MCC. This combination was synergistic to 25.0% and 40.6% of the *P. aeruginosa* isolates tested by checkerboard and time-kill curve assays, respectively. Subsequently, because of the synergistic action of the MCC in 1071-MRPA, structural changes were assessed by scanning and transmission electron microscopy and gene expression using Representational Difference Analysis (RDA) and quantitative real-time PCR (qPCR). Electron microscopy indicated that the MCC caused a summation of the structural and morphological changes induced by the antimicrobials alone in 1071-MRPA. However, outer membrane vesicles that are normally related to the bacterial SOS response and cytotoxic effects in the host were greater amount with ciprofloxacin exposure and significantly inhibited in MCC-exposed cells. Genes related to cell-wall and DNA repair, among others, were differentially expressed in meropenem-, ciprofloxacin-, and MCC-exposed 1071-MRPA. Additionally, qPCR analysis revealed that besides of differentially expressed genes, associated with DNA and cell wall repair, genes related to bacterial SOS response regulation and antimicrobial resistance exhibited lower expression in MCC-exposed cells. The present study suggests that the MCC may be an alternative for the treatment of infections caused by *P. aeruginosa*. The effect of this

antimicrobial combination may be not only the result of a summation of the effects of meropenem and ciprofloxacin but also a result of differential action that likely affects protective mechanisms in the bacteria.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*. Multidrug resistance. Antimicrobial combination. Meropenem. Ciprofloxacin. Gene expression.

Tese elaborada e formatada conforme as normas da ABNT (Capítulo I e III) e das publicações científicas (Capítulo II): *Brazilian Journal Pharmaceutical Science* (artigo 1) disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_serial&pid=1984-8250> e *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (artigo 2) disponível em: <<http://jac.oxfordjournals.org/>>

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	15
1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Infecções causadas por <i>P. aeruginosa</i>	16
1.2 Fatores de virulência.....	16
1.3 Terapia e resistência aos antibacterianos em <i>P. aeruginosa</i>	18
1.3.1 Meropenem.....	22
1.3.2 Ciprofloxacino	23
1.3.3 Uso de associações antimicrobianas para o tratamento de pacientes com infecções causadas por <i>P. aeruginosa</i>	24
1.4 Avaliação da atividade sinérgica de combinações antimicrobianas.....	28
1.4.1 Ensaios de <i>checkerboard</i>	28
1.4.2 Ensaios de curva de tempo de morte	29
1.5 Avaliação da morfologia e estrutura celular de <i>P. aeruginosa</i> por microscopia eletrônica	30
1.6 Vigilância epidemiológica e genotipagem de <i>P. aeruginosa</i>	32
1.6.1 Genotipagem de <i>P. aeruginosa</i> por <i>Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus – Polymerase Chain Reaction (ERIC-PCR)</i>	32
1.7 Avaliação da expressão gênica em <i>P. aeruginosa</i>	33
1.7.1 Avaliação de genes diferencialmente expressos pela técnica de Análise da Diferença Representacional (<i>Representational Difference Analysis-RDA</i>).....	34
1.7.2 Avaliação da expressão gênica por PCR em tempo real.....	36
2. OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS	39
2.1 Objetivo geral.....	39
2.2 Objetivos específicos	39
REFERÊNCIAS.....	41
CAPÍTULO II	52
Artigo 1: High genetic diversity among <i>Pseudomonas aeruginosa</i> and <i>Acinetobacter</i> spp. isolated in a public hospital in Brazil.....	52
Artigo 2: Structural changes and differentially expressed genes in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> exposed to meropenem and ciprofloxacin combination	68
CAPÍTULO III	69
3.1 CONCLUSÕES	104
3.2 PERSPECTIVAS FUTURAS.....	104
ANEXO METODOLOGIA	106

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

Pseudomonas aeruginosa é um patógeno oportunista comumente associado a infecções hospitalares, além de representar uma das principais causas de morte em pacientes com fibrose cística (NAVON-VENEZIA; BEM-AMI; CARMELI, 2005). Por esta espécie bacteriana ser intrinsecamente resistente a diversos agentes antibacterianos e capaz de adquirir resistência a vários outros, as opções terapêuticas para o seu controle são muito limitadas (STRATEVA; YORDANOV, 2009).

A panresistência, definida como completa falta de opção de tratamento (MAGIORAKOS et al., 2011), é cada vez mais frequente nesta espécie bacteriana e tem estimulado a busca por novos compostos ou alternativas terapêuticas (BARREIRO et al., 2008; SIEGEL, 2008, MANGONI et al., 2008), inclusive o uso de combinações antimicrobianas (SADER; JONES, 2005; CIRIONI et al., 2007; KANELLAKOPOULOU et al., 2008; PANKUCH et al., 2008, MITSUGUI et al., 2011).

Na prática clínica interações sinérgicas entre antimicrobianos têm sido investigadas para a melhoria dos resultados terapêuticos, diminuição do potencial tóxico dos antimicrobianos empregados (BODI; GARNACHO, 2007; GARNACHO-MONTEIRO et al., 2007) e supressão da amplificação de subpopulações bacterianas resistentes (LOUIE et al., 2010). Para o tratamento empírico de infecções hospitalares causadas por *P. aeruginosa* multirresistentes, diversas associações são sugeridas, principalmente β -lactâmicos combinados com aminoglicosídeos ou fluoroquinolonas (ERDEM; KUCUKERCAN; CERAN, 2003; SAFDAR; HANDELSMAN; MAKI, 2004; PANKUCH et al., 2008; KANELLAKOPOULOU et al., 2008; MESAROS et al., 2007). Entretanto, determinação *in vitro* do mecanismo de ação sinérgica entre antibacterianos tem sido pouco estudada.

1.1 Infecções causadas por *P. aeruginosa*

Bactéria Gram negativa ubíqua, *P. aeruginosa* é o principal patógeno oportunista em humanos, responsável por um amplo espectro de infecções. Comumente associada à imunossupressão, pode causar desde uma infecção superficial de pele até uma sepse fulminante (FOTHERGILL; WINSTANLEY; JAMES, 2012).

As infecções que acometem indivíduos imunologicamente competentes tendem a ser localizadas, como foliculites e otite externa e, geralmente estão relacionadas à água contaminada, principalmente em piscinas ou banheiras de hidromassagem. Neste caso, raramente há o envolvimento de isolados com resistência aos antimicrobianos (LUTZ; LEE, 2011).

P. aeruginosa é uma das principais causas de infecção hospitalar, especialmente em pacientes internados em unidades de terapia intensiva (FAZELI et al., 2012, RESENDE et al., 2013). Neste caso fatores de risco relacionados à infecção incluem dispositivos de longa permanência (mais comuns são cateteres venosos e vesicais), uso prévio de antibióticos, doença de base grave e imunidade comprometida. Comumente associada a surtos de infecção no ambiente hospitalar, principalmente com a participação de isolados multirresistentes, *P. aeruginosa* vem dificultando o controle de infecção nesse ambiente (SUAREZ et. al, 2011).

Esta espécie bacteriana também representa uma das principais causas de mortalidade em pacientes com fibrose cística. Doença genética autossômica recessiva, cuja principal manifestação clínica é infecção respiratória recorrente, em grande parte decorrente da deficiência no transporte de íons cloreto (CIOFU; HANSEN; HOYBI, 2013).

1.2 Fatores de virulência em *P. aeruginosa*

A produção de diversos fatores de virulência, aliada a resistência aos antimicrobianos e a capacidade de formação de biofilmes, faz de *P. aeruginosa* o maior patógeno oportunista humano (NAVON-VENEZIA; BEM-AMI; CARMELI, 2005; BALASUBRAMANIAN et al., 2013). A expressão destas características esta sob estreita regulação gênica e responde a sinais ambientais ainda pouco conhecidos, mas que têm sido alvo de estudos para diversos

pesquisadores (KARISSON et al., 2012; JÁCOME et al., 2012; JIMENES et al., 2012; BALASUBRAMANIAN et al., 2013). A virulência de *P. aeruginosa* está relacionada à presença de fatores associados à estrutura celular, como flagelo, pili, lipopolissacarídeos, além de fatores secretados pela célula bacteriana, como proteases, elastases, piocianinas, exotoxinas e polissacarídeos extracelulares (VEESENMEYER et al., 2009). Já é conhecido que isolados de *P. aeruginosa* são capazes de detectar sinais externos utilizando sensores proteicos, os quais ativam específicos reguladores de transcrição. Este sistema sensor-regulador é conhecido como sistema dois componentes (*Two-component systems*, TCS) e desempenha um papel fundamental na modulação da expressão gênica bacteriana em resposta a condições ambientais. Características fenotípicas como a formação de biofilmes e outros fatores de virulência (proteases, bombas de efluxo, motilidade, piocianina, etc) estão sob o controle de um mecanismo de reconhecimento de densidade celular, chamado *quorum sensing* (QS) (HARMSEM et al., 2010). Sistema QS em *P. aeruginosa* envolve moléculas sinalizadoras como as 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona, conhecidas como *Pseudomonas Quinolone Signal* (PQS) (PESCI et al., 1999). Esta molécula juntamente com a 3-oxi-dodecanoil-homoserina lactona (3OC12-HSL) e a butiril-homoserina lactona (C4-HSL), constituem uma complexa rede regulatória integrada que controla a transcrição de aproximadamente 5% de todos os genes de *P. aeruginosa*, inclusive muitos genes relacionados à virulência (MASBURN; WHITELEY, 2005). PQS e 3OC12-HSL tem características hidrofóbicas que dificultam a sua circulação no meio extracelular. Mas, a circulação destes sinais parece envolver a participação de sistemas especializados, como o empacotamento em vesículas de membrana externa (*Outer Membrane Vesicles*, OMVs) (MASBURN; WHITELEY, 2005).

OMVs são estruturas esféricas de membrana em bicamada, com 50-250 nm de diâmetro, liberadas pela parede celular de possivelmente todas as bactérias Gram negativas. Estas estruturas podem conter proteínas de membrana externa (*Outer Membrane Proteins*, OMPs), lipopolissacarídeos, fosfolipídeos e constituintes periplásmicos (BEVERIDGE, 1999). Bomberger et al. (2009) mostraram que OMVs de *P. aeruginosa* liberam diversos fatores de virulência, como beta-lactamase, fosfolipase hemolítica C, fosfatase alcalina e toxina Cif diretamente no citoplasma das células epiteliais das vias aéreas do hospedeiro, a partir da fusão com a camada lipídica da célula. A toxina Cif, comprovadamente secretada em OMVs por isolados clínicos de *P. aeruginosa*, diminui a expressão de *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (CFTR) na membrana apical das células epiteliais das vias aéreas humanas, o que consequentemente reduz a secreção de cloreto (SWIATECKA-

URBAN et al., 2006). Assim, a capacidade de *P. aeruginosa* infectar o pulmão em pacientes com fibrose cística, doença pulmonar obstrutiva crônica, bronquiectasia ou mesmo pneumonia está ligada, em parte, à produção de OMVs contendo Cif, que resultará na redução do *clearance* mucociliar deste patógeno (BOMBERGER et al., 2011).

Além disso, a vesiculação parece estar ligada à resposta SOS e aumento da sobrevivência bacteriana (McBROOM; KUEHN, 2007). Esta resposta pode estar relacionada ao uso de antimicrobianos, principalmente aqueles que atuam sobre o DNA, como as fluoroquinolonas (MAREDA et al., 2012).

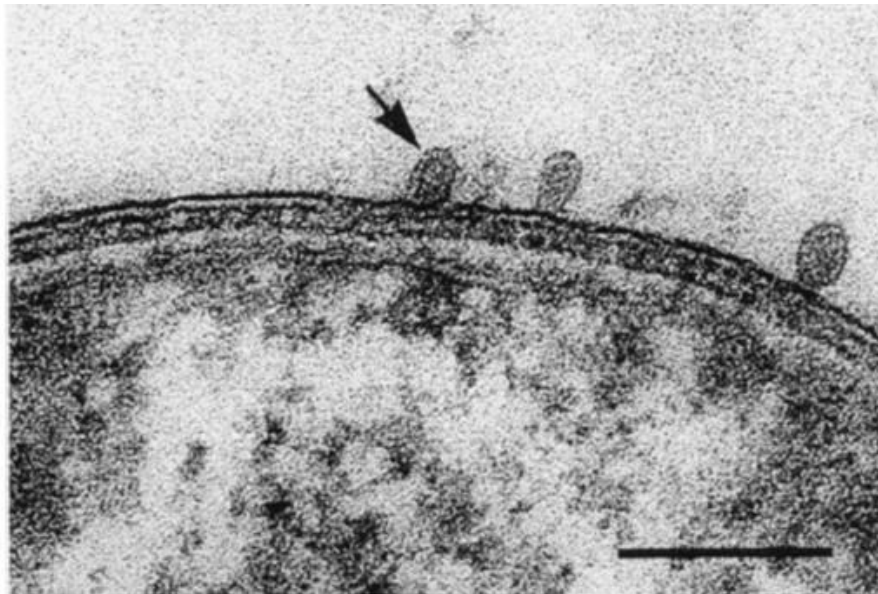


Figura 1. Micrografia de transmissão eletrônica de *P. aeruginosa* mostrando o desenvolvimento de vesículas de membrana externa (OMVs) (Barra 250 nm).
Fonte: Beveridge (1999).

1.3 Terapia e resistência aos antibacterianos em *P. aeruginosa*

P. aeruginosa é intrinsecamente resistente a diversos agentes antimicrobianos como ampicilina, amoxicilina, cefalosporinas de 1^a e 2^a geração, cefotaxima, ertapenem, sulfametoxazol-trimetoprima, cloranfenicol, tetraciclina, ácido nalidíxico entre outros, o que naturalmente restringe as opções terapêuticas para infecções causadas por este micro-organismo (STRATEVA; YORDANOV, 2009; CLSI, 2013).

Dos agentes antimicrobianos que podem ser ativos contra esta espécie bacteriana destacam-se alguns β -lactâmicos como os carbapenêmicos, ceftazidima e cefepima; as

fluoroquinolonas, sendo o representante mais utilizado o ciprofloxacino e os aminoglicosídeos, como principalmente a amicacina. Mais recentemente as polimixinas vêm sendo empregadas para os isolados multirresistentes (EL SOLH; ALHAJHUSAIN, 2009).

P. aeruginosa pode se tornar resistente aos antimicrobianos por diversos mecanismos, incluindo a alteração da permeabilidade celular, modificação do alvo, produção de enzimas inativadoras de antimicrobianos e bomba de efluxo. Muitas vezes os isolados possuem uma combinação de diferentes mecanismos, podendo se tornar resistente a múltiplos agentes antimicrobianos (ZAVASCKI et al., 2010).

Isolados resistentes a múltiplos antimicrobianos, também chamados de multidroga-resistentes (MDR) ou multirresistentes, representam um problema de saúde pública e um desafio para o tratamento e controle de infecções bacterianas, especialmente as causadas por *P. aeruginosa*. Um isolado bacteriano é definido como multirresistente quando apresenta resistência a pelo menos um agente em três ou mais categorias de antimicrobianos. Existem ainda as bactérias XDR (acrônimo em inglês para *extreme* ou *extremely drug resistant* ou *extensive* ou *extensively drug resistant*), definidas como não sensíveis a pelo menos um agente na maioria das categorias, mas permanecendo sensíveis a uma ou duas categorias de antimicrobianos e a mais preocupante de todas, as PDR (*pandrug resistant*), resistente a todos os agentes em todas as categorias de antimicrobianos (MAGIORAKOS et al., 2011).

De um modo geral a permeabilidade da parede celular de *P. aeruginosa* é bastante limitada. Esta limitação associada a alguns mecanismos de efluxo são responsáveis em parte pela gama de resistência intrínseca apresentada pela bactéria. Por outro lado, mutações adquiridas que levam a perda de uma ou mais porina, podem dar origem a outros fenótipos de resistência. Um exemplo é a perda de OprD, uma importante porina de membrana externa em Gram negativos, específica para aminoácidos ácidos e imipenem, capaz de transportar de modo diâmetro-dependente, monossacarídeos, além de facilitar a captação de quinolonas e outros antibióticos (HUANG; HANCOCK, 1993). O meropenem pode ser transportado para dentro de *P. aeruginosa* pela OprD, mas é reconhecido e expulso pelo sistema de efluxo MexAB-OprM. Mutantes com perda de OprD ou com superexpressão do sistema MexAB-OprM, tem um aumento da concentração inibitória mínima (CIM) de meropenem, porém não acima dos pontos de corte pré-determinados para resistência. Por esse motivo a perda da porina OprD leva a resistência ao imipenem, entretanto para se tornar resistente ao meropenem a bactéria necessita de mais uma mutação, a superexpressão de MexAB-OprM. A

superexpressão deste sistema de efluxo também compromete a ação de fluoroquinolonas e outros β -lactâmicos (LIVERMORE, 2001).

Outra proteína de membrana externa, a OprF, é a mais comum em *P. aeruginosa* e funciona como um canal para grandes substratos. Porém, seu papel no transporte de antimicrobianos ainda é discutível (BRATU et al., 2007; ZAVASCKI et al., 2010).

β -lactamases constituem importante causa de resistência aos β -lactâmicos em *P. aeruginosa*. Existem mais de mil tipos de β -lactamases que podem ser produzidas por bactérias, principalmente Gram negativas. Estas enzimas são classificadas basicamente de acordo com a sequência de aminoácidos (classificação molecular ou classificação de Ambler) e a função (classificação funcional ou de Bush, Jacoby & Medeiros) de cada uma (BUSH; JACOBY, 2010). Diversas β -lactamases foram descritas em *P. aeruginosa*, dentre elas se destacam a AmpC e as carbapenemases. As cefalosporinases AmpC são codificadas por genes localizados no cromossomo bacteriano e estão relacionadas a resistência intrínseca, porém podem ter sua expressão induzida pelo uso de certos β -lactâmicos, especialmente os carbapenêmicos. Em recente estudo, AmpC plasmidial (CMY-7) foi identificada pela primeira vez em um isolado clínico de *P. aeruginosa* na China (ZHU et al., 2013). AmpC são enzimas capazes de hidrolisar eficientemente penicilinas, cefamicinas e com menor eficiência as cefalosporinas de espectro ampliado, como as de 3ª geração e os monobactâmicos (aztreonam). A atividade hidrolítica sobre cefalosporina de 4ª geração (cefepima) e carbapenêmicos é muito baixa, o que faz destes antimicrobianos uma opção de tratamento para infecções causadas por isolados com este tipo de resistência (KUNZ; BROOK, 2010).

As carbapenemases mais importantes já descritas em *P. aeruginosa* pertencem à classe A (serino-carbapenemases) e principalmente à classe B de Ambler (metalo- β -lactamases, MBLs) (ZAVASCKI et al., 2010). *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) é uma serino-carbapenemase por apresentar um aminoácido serina em seu sítio ativo. É codificada por genes plasmidiais e capaz de hidrolisar todos os β -lactâmicos, porém é inibida pelos inibidores de β -lactamase, como o ácido clavulânico e o tazobactam (KUNZ; BROOK, 2010). Identificada inicialmente em isolados de *K. pneumoniae*, KPC já foi detectada em outros membros da família *Enterobacteriaceae* e mais recentemente em isolados de *P. aeruginosa* nos Estados Unidos (POIREL, et al., 2010), Porto Rico (WOLTER et al., 2009) e Colômbia, sendo que neste último o gene bla_{KPC} , diferente dos descritos em *Enterobacteriaceae*, estava presente no cromossomo bacteriano (VILLEGAS et al., 2007). MBLs não são inibidas pelos inibidores de β -lactamase disponíveis comercialmente, mas como representam a única família

entre as β -lactamases com um íon zinco em seu sítio ativo, sofrem inibição por quelantes como o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e por derivados do ácido tiolático, como o ácido 2-mercaptopropiônico (2-MPA). Apresentam atividade contra todos os β -lactâmicos, exceto aztreonam (KUNZ; BROOK, 2010). Vários tipos de MBLs têm sido reportados em bactérias Gram negativas, as mais frequentes em *P. aeruginosa* são *imipenemase* (IMP) e *Verona integron-encoded metallo- β -lactamases* (VIM) (LIVERMORE, 2009). Entretanto, no Brasil a enzima São Paulo metallo- β -lactamases (SPM) aparece como o tipo mais isolado (ROSSI, 2011). *New Delhi metallo- β -lactamases* (NDM), foi primeiro descrita em *K. pneumoniae* e *Escherichia coli* isoladas de pacientes oriundos da Índia em 2008. Trouxe muita preocupação pela rápida distribuição inter e intraespécies bacterianas. Atualmente existem relatos de bactérias produtoras de NDM em diferentes regiões do mundo (NORDMAN et al., 2011). Entretanto, somente recentemente foi detectada em *P. aeruginosa* isolada de um paciente sérvio com infecção urinária pós-cirúrgica, diagnosticado na França (FLATEAU et al., 2012).

Os aminoglicosídeos geralmente são empregados associados a outros antimicrobianos para o tratamento de infecções por *P. aeruginosa*. Aminoglicosídeos com atividade antipseudomonas incluem amicacina, gentamicina e tobramicina e resistência a estes agentes é muito comum, especialmente entre isolados da Europa e América Latina (ZAVASCKI et al., 2010). A resistência para aminoglicosídeos está mais comumente relacionada à produção de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos que diminuem a afinidade pelo alvo ribossomal (POOLE, 2005).

Dentre as fluoroquinolonas, ciprofloxacino tem a melhor atividade *in vitro* contra *P. aeruginosa*, podendo ser utilizado para tratamento de infecções causadas por esta espécie bacteriana, especialmente infecções pulmonares relacionadas à fibrose cística (ZHANEL et al., 2002; HURLEY; SMITH, 2012). Atuam inibindo a ação da DNA-girase (topoisomerase II) e da topoisomerase IV, enzimas que garantem uma eficiente replicação, transcrição, recombinação e reparo do DNA, por manterem o estado topológico do mesmo. Geralmente a resistência a esta classe de antimicrobianos está ligada a mutações nas regiões determinantes de resistência a quinolona (*quinolone resistance-determining regions*, QNDRs) nos genes *gyrA* (codificador da DNA-girase) e *parC* (codificador da topoisomerase IV), que codificam para enzimas com alterações no alvo de ligação com o substrato (JALAL; WRETLIND, 1998). A resistência para fluoroquinolonas em *P. aeruginosa* também pode ser atribuída à superexpressão de bombas de efluxo, já que estes antimicrobianos podem servir de substratos

para diversos sistemas de efluxo descritos nesta bactéria (MexAB-OprM; MexCD-OprJ; MexEF-OprN; MexXY-OprM e MVW-OprM). Uma interação entre mutações na DNA-girase e topoisomerase IV com superexpressão de bombas de efluxo, tem resultado em isolados de *P. aeruginosa* altamente resistentes à fluoroquinolonas (STRATEVA; YORDANOV, 2009).

Há vários anos nenhum composto capaz de sobrepujar os mecanismos de resistência em *P. aeruginosa* tem sido proposto para o tratamento de infecções por isolados MDR. Todavia, polimixina, fármaco desenvolvido há mais de 50 anos, representa atualmente o antimicrobiano mais ativo contra *P. aeruginosa* (ZAVASCKI et al., 2010). As polimixinas são lipopeptídeos policatiônicos que exercem seu efeito especificamente em Gram negativos. Atuam por um efeito detergente, destruindo a molécula de lipopolissacarídeo da parede bacteriana, causando lise celular. O número de isolados de *P. aeruginosa* resistentes as polimixinas ainda é baixo e a resistência é devida a uma mutação que resulta em alteração na parede celular bacteriana, como diminuição no conteúdo de lipopolissacarídeo, proteínas de membrana externa, íons Ca^{2+} e Mg^{2+} (BALAJI; JEREMIAH; BALIGA, 2011).

1.3.1 Meropenem

Meropenem é um β -lactâmico da subclasse dos carbapenêmicos que, de modo semelhante aos demais β -lactâmicos, são bactericidas por atuarem inibindo as proteínas ligadoras de penicilina (*penicillin-binding proteins*, PBPs) e conseqüentemente a síntese da parede celular. Os carbapenêmicos são capazes de interagir com basicamente todas as PBPs de bactérias Gram negativas, mas possuem maior afinidade com as PBP-1a e -1b de *P. aeruginosa* e *Escherichia coli*. O meropenem se diferencia dos outros carbapenêmicos pela sua maior afinidade à PBP-3 de *P. aeruginosa* (EDWARDS, 1995). A estrutura química básica do meropenem é semelhante a dos outros carbapenêmicos. Entretanto, um grupamento dimetilcarbomilpirrolidintio no carbono 2 do esqueleto carbapenêmico confere uma ação mais potente sobre *P. aeruginosa* (LISTER, 2007). A presença de um grupamento 1-hidroetil na posição *trans* em justaposição ao grupamento carbonila do anel β -lactâmico é o responsável pela maior resistência à ação das β -lactamases. A inserção de um grupamento 1- β -metil no anel carbapenêmico (Figura 2) resultou em maior estabilidade metabólica, impedindo a

hidrólise pela dihidropeptidase-I (DPH-I) presente no rim. Esta enzima é responsável pela eliminação renal do imipenem quando não ligado à cilastatina (EL-GAMAL; OH, 2010).

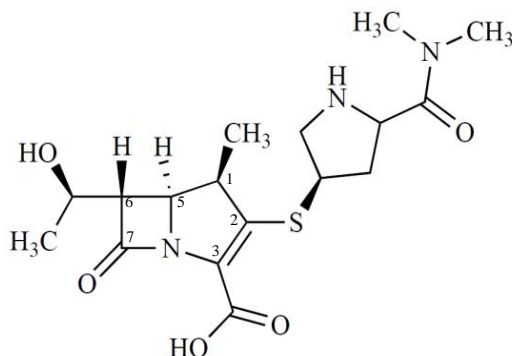


Figura 2. Estrutura química do meropenem
Fonte: EL-Gamal; Oh, 2010 (adaptação).

O carbapenêmico meropenem, assim como imipenem e doripenem, representam a última linha de defesa contra infecções de difícil tratamento causadas por bactérias Gram negativas, como *P. aeruginosa*, e por isso devem ser usados de forma apropriada. O carbapenêmico ertapenem é mais indicado para o tratamento de infecções por bactérias Gram negativas outras que não *Pseudomonas* ou *Acinetobacter*. A falta de atividade antipseudomonas, clinicamente relevante, do ertapenem tem levantado suspeita sobre o potencial deste agente em induzir resistência em *P. aeruginosa* para os outros carbapenêmicos, o que tem desencorajado o seu uso para o tratamento de infecções com a provável participação desta bactéria (NICOLAU et al., 2012).

1.3.2 Ciprofloxacino

Ciprofloxacino faz parte da geração das quinolonas fluoradas, com um mecanismo de ação primário baseado na inibição das topoisomerases bacterianas. O grupo carboxila na posição 3 e a molécula de cetona na posição 4 do núcleo quinolônico (Figura 4), são essenciais para atividade antimicrobiana por estarem envolvidos na ligação da molécula ao

seu alvo, o complexo DNA/topoisomerase, além de facilitar a penetração na célula bacteriana (ZHANEL, et al., 2002).

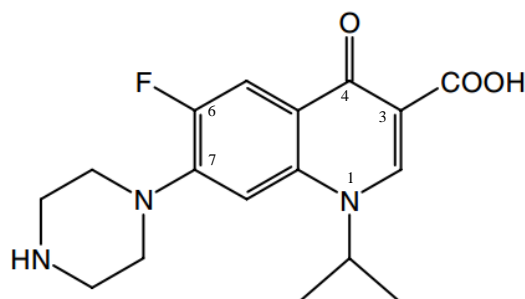


Figura 3. Estrutura química do ciprofloxacino
Fonte: Zhanel et al., 2002 (adaptação)

A penetração das moléculas de fluoroquinolonas na célula bacteriana se dá por simples difusão através da membrana ou captação via porina e seu acúmulo intracelular é fundamental para sua ação antimicrobiana (PIDDOCK et al., 1999).

1.3.3 Uso de associações antimicrobianas para o tratamento de pacientes com infecções causadas por *P. aeruginosa*

A multirresistência observada em *P. aeruginosa*, aliada a falta de compostos capazes de sobrepujar todos os mecanismos de resistência desenvolvidos por esta espécie, tem levado ao emprego de novas opções terapêuticas como as combinações antimicrobianas. Considera-se que combinações antimicrobianas sinérgicas aumentam a probabilidade de sucesso terapêutico, especialmente quando usadas empiricamente (SANDIUMENGE; RELLO, 2012; VARDAKAS et al., 2013) e minimizam a emergência de resistência (LISTER et al., 2009; LOUIE et al., 2010).

Muitas combinações de antimicrobianos vêm sendo testadas para o tratamento de pacientes com infecções causadas por *P. aeruginosa*, especialmente MDR (TIMURKAYANAK et al., 2006; MITSUGHI et al., 2011; HIRSCHI et al., 2012). Lim et al. (2011) reportaram a necessidade da combinação de pelo menos três antimicrobianos para um

efeito sinérgico cepa-dependente contra isolados de *P. aeruginosa* XDR. β -lactâmicos, associados à fluoroquinolonas ou aminoglicosídeos têm sido as combinações mais testadas *in vitro* contra *P. aeruginosa* com resultados, em sua maioria, promissores (NAVON-VENEZIA; AMI; CARMELI, 2005). Meropenem associado ao ciprofloxacino é uma das combinações explorada por diversos ensaios *in vitro*. Na Tabela 1 estão listados estudos sobre o uso desta associação contra isolados de *P. aeruginosa*. Esses estudos envolvem isolados provenientes de diferentes regiões do mundo, apresentando, provavelmente, diferentes respostas aos antimicrobianos testados, fato que, aliado às variações metodológicas, dificulta a comparação dos resultados. Entretanto, na maioria dos ensaios, os autores detectaram atividade sinérgica ou aditiva entre meropenem e ciprofloxacino. Exceção é relatada por Campana et al. (2003) no caso de um isolado (tipo mucoide) de paciente com fibrose cística.

Tabela 1. Relação de trabalhos científicos abordando estudos *in vitro* da atividade antimicrobiana da combinação de meropenem e ciprofloxacino contra *P. aeruginosa*.

Autor	Origem dos isolados testados	Metodologia/Concentração de cada antimicrobiano	Interpretação	Resultados
Hayami et al., 1999	26 amostras bacterianas com diferentes perfis de sensibilidade, isoladas de pacientes hospitalizados com infecção do trato urinário, Kagoshima, Japão.	<i>Checkerboard</i> com diluição em caldo/0,025-1600 µg/mL de cada antimicrobiano. Obs, Curva de tempo de morte/0,25 e 0,125 da CIM, para confirmar resultados do <i>checkerboard</i> em apenas 2 isolados.	<i>Checkerboard</i> – sinergismo = FICI ≤ 0,5 Curva tempo morte – redução na contagem de viáveis ≥ 3 log ₁₀ UFC/mL após 6 h exposição, comparado ao fármaco sozinho mais ativo.	<i>Checkerboard</i> – sinergismo em 38,5% dos isolados. Curva tempo morte – confirmou resultado checkerboard nos 2 isolados testados.
Isenberg, Alperstein e France, 1999.	30 amostras bacterianas, a maioria sensível aos 2 antimicrobianos, isolados de pacientes hospitalizados em Nova York, EUA.	<i>Checkerboard</i> com diluição em ágar/0,5-256 µg/mL de cada antimicrobiano (adicionados juntos em cada placa).	Sinergismo = CIM de cada droga em combinação foi 4 x menor que a CIM de cada fármaco sozinho.	Não detectou sinergismo
Ermetcam et al., 2001	18 amostras bacterianas, a maioria resistentes aos 2 antimicrobianos, isoladas de pacientes hospitalizados em Manisa, Turquia.	Macrodiluição em caldo/CIM e 0,5 x a CIM	Sinergismo = redução de 100x em UFC/mL dos isolados expostos à combinação, comparados aos isolados expostos aos fármacos sozinhos.	Sinergismo em 22% dos isolados expostos a 0,5 x CIM e 61 % dos isolados expostos a 1x CIM
Erdem et al., 2002	32 amostras bacterianas MDR, a maioria resistente aos 2 antimicrobianos testados, isoladas de pacientes hospitalizados em Istambul, Turquia.	<i>Checkerboard</i> com microdiluição em caldo/Sem citação de concentração empregada.	Sinergismo = FICI ≤ 0,5	Sinergismo em 6,2% dos isolados
Erdem et al., 2003	5 amostras bacterianas MDR, isoladas de pacientes hospitalizados em Istambul, Turquia.	Curva tempo de morte/4 µg/mL de meropenem e 1 µg/mL de ciprofloxacino	Sinergismo = redução de 100 x UFC/mL dos isolados expostos à combinação, comparados aos isolados expostos aos fármacos sozinhos.	Sinergismo em 20% dos isolados

Continua na próxima página

Tabela 1 continuação

Autor	Origem dos isolados testados	Metodologia/Concentração de cada antimicrobiano	Interpretação	Resultado
Campana et al., 2003	14 amostras bacterianas (10 não-mucóides e 4 mucóides), com perfil de sensibilidade variável, isoladas de pacientes com fibrose cística, em Florencia, Itália.	E-test – usando tiras dispostas de forma cruzada/Concentração padrão presente nas fitas.	Sinergismo = FICI \leq 0,5	Sinergismo em 20% dos isolados com fenótipo não- mucoides. Entre os isolados mucoides sinergismo não foi observado.
Solak et al., 2005	20 amostras bacterianas, maioria resistentes ao ciprofloxacino, isoladas clínicos de Ankara, Turquia.	Checkerboard com microdiluição em caldo	Sinergismo = FICI \leq 0,5	Sinergismo em 30% dos isolados
Kanellakopoulou et al., 2008	24 amostras bacterianas MDR e resistente aos 2 antimicrobianos testados, isoladas de pacientes hospitalizados em Atenas, Grécia.	Curva tempo de morte/16 μ g/mL de meropenem e 2 μ g/mL de ciprofloxacino (repetição com concentrações de 25 μ g/mL de meropenem e 3 μ g/mL de ciprofloxacino).	Sinergismo = redução de 100 x no número de UFC/mL dos isolados expostos à combinação, comparados aos isolados expostos aos fármacos sozinhos.	Sinergismo em 8,3% dos isolados, nas 2 diferentes concentrações testadas.
Pankuchet al., 2008	50 amostras bacterianas, maioria sensível aos 2 antimicrobianos testados, isoladas de pacientes hospitalizados (alguns com fibrose cística) em Hershey, EUA. Uma amostra adicional produtora de metalo- β -lactamase do tipo VIM-2.	Curva de tempo de morte/até 4 x acima e 4 x abaixo da CIM das drogas sozinhas.	Sinergismo = redução de 100 x em UFC/mL dos isolados expostos à combinação, comparados aos isolados expostos aos fármacos sozinhos, depois de 3, 6, 12 e 24 h, com o número de sobreviventes na presença da combinação 100 x abaixo do número de UFC/mL do inóculo inicial.	Sinergismo em 74,5% e 66,7% dos isolados na 12 ^a e 24 ^a h de exposição a concentrações sub-inibitórias da combinação, respectivamente.

CIM: concentração inibitória mínima; FICI: índice de concentração fracional inibitória (*Fractional Inhibitory concentrations index*); UFC: unidade formadora de colônia.

1.4 Avaliação da atividade sinérgica de combinações antimicrobianas

A avaliação de combinações antimicrobianas para emprego na clínica médica deve ser cuidadosa, pois a interação entre agentes antimicrobianos pode ser antagônica ao invés de sinérgica. Uma variedade de metodologias com diferentes princípios tem sido empregada para avaliação *in vitro* de combinações antimicrobianas. *Checkerboard* e curva de tempo de morte são dois métodos laboratoriais comumente utilizados para avaliar combinações de antimicrobianos em bactéria, inclusive *P. aeruginosa* (PILLAI; MOELLERING; ELIPOULOS, 2005). Diversos autores já reportaram dificuldades de comparações entre as técnicas bem como a discordância entre os resultados obtidos (CAPPELLETY; RYBAK, 1996; BAJAKSOUZIAN et al., 1997; FOWERAKER et al., 2009).

1.4.1 Ensaios de *checkerboard*

Ensaios de *checkerboard* podem ser realizados empregando microdiluição em caldo ou ágar. A técnica de múltipla diluição em caldo, usando microplacas de 96 poços é a mais amplamente empregada. Normalmente são testadas quatro diluições acima e abaixo da concentração inibitória mínima (CIM) de cada agente antimicrobiano. É possível testar até três antimicrobianos em combinação ao mesmo tempo, sendo que um deles é adicionado em uma concentração pré-determinada em todas as cavidades da placa teste. Como a metodologia *checkerboard* está baseada na técnica de diluição em caldo para determinação da CIM, utiliza um inóculo final bacteriano de aproximadamente 5×10^5 UFC/mL e um tempo de incubação variando de 16 a 24 h, dependendo da bactéria testada. No caso específico de *P. aeruginosa* a leitura do teste deve ser realizada entre 16 e 20 h de incubação a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ (CLSI, 2012).

A interpretação do teste é realizada pela determinação do índice de concentração fracional inibitória (*Fractional Inhibitory Concentrations Index*, FICI), calculado pela fórmula: $\text{FIC}_A + \text{FIC}_B = \text{FICI}$, sendo que $\text{FIC}_A = \text{CIM}$ do antimicrobiano A em combinação/ CIM do antimicrobiano A sozinho e $\text{FIC}_B = \text{CIM}$ do antimicrobiano B em combinação/ CIM do antimicrobiano B sozinho. Sinergismo de uma determinada combinação

é definido como um FICI $\leq 0,5$, indiferença FICI $> 0,5$ e ≤ 4 e antagonismo FICI > 4 (PILLAI; MOELLERING; ELIPOULOS, 2005).

Checkerboard proporciona resultados de inibição do crescimento bacteriano e traz como vantagem a fácil execução e o menor custo, já que emprega quantidades mínimas de meio de cultura e antimicrobianos. A maior desvantagem está relacionada à sua baixa reprodutibilidade (CAPPELLETY; RYBAK, 1996).

1.4.2 Ensaios de curva de tempo de morte

Curva de tempo de morte avalia a atividade bactericida da combinação de antimicrobianos sobre um determinado período de tempo. O emprego de concentrações do antimicrobiano próximas às concentrações alcançadas no soro ou em outro sítio de infecção, após administração de doses usuais, resultará em dados mais relevantes para aplicação clínica (PILLAI; MOELLERING; ELIPOULOS, 2005; KANELLAKOPOULOU, 2008). Como visto na metodologia por *checkerboard*, os protocolos para realização de curva de tempo de morte são flexíveis e na literatura são observadas diversas variações (quantidade de meio de cultura, tempo entre os cultivos, concentração dos antimicrobianos, bem como nas diluições seriadas realizadas para a retirada do antimicrobiano antes da semeadura para contagem das colônias), como reportado nos trabalhos listados na Tabela 1. Pela metodologia de curva de morte descrita por Pillai; Moellering e Eliopoulos (2005), a interpretação é feita comparando os resultados obtidos entre a combinação e o fármaco mais ativo, considerando que pelo menos um antimicrobiano testado não tenha efeito sobre o crescimento bacteriano. Por esta metodologia sinergismo é definido como uma diminuição $\geq 2\text{-log}_{10}$ no número de UFC/mL (ou número de viáveis) após 24 h de exposição à combinação antimicrobiana, comparado com o antimicrobiano mais ativo usado sozinho e com o inóculo inicial. Para definir como ação bactericida da combinação, a redução no número de UFC/mL deve ser $\geq 3\text{-log}_{10}$ (LIM et al., 2011). A principal desvantagem desta técnica é a necessidade de repetitivos cultivos (amostragem) de cada concentração de antimicrobiano, o que a torna muito trabalhosa, limitando o número de combinações testadas (FOWERAKER et al., 2009).

1.5 Avaliação da morfologia e estrutura celular de *P. aeruginosa* por microscopia eletrônica

Microscopia eletrônica, principalmente as de alta resolução são importantes ferramentas para a análise de estruturas moleculares e vem contribuindo para produzir mudanças radicais em vários conceitos estabelecidos pela microscopia óptica. O microscópio eletrônico revelou muitas estruturas em células, previamente inimagináveis (GURSKY, 2012).

Na microscopia eletrônica a radiação utilizada é produzida por um feixe de elétrons, os quais são refratados por meio de lentes eletromagnéticas, permitindo um poder de resolução pelo menos 1000 vezes superior ao do microscópio óptico comum (JENSEN, 2012). O contraste no microscópio eletrônico depende do número atômico dos átomos presentes na amostra, de tal forma que, quanto maior o número atômico, mais elétrons são dispersos e conseqüentemente o contraste é maior. Como moléculas biológicas são compostas de átomos de número atômico muito baixo, necessitam ser impregnadas com sais de metais pesados como o ouro, urânio e o chumbo (ALBERTS et al., 1997).

Existem diferentes métodos em microscopia eletrônica que usam diferentes sinais, decorrentes da interação do feixe elétrico com a amostra, para obter várias informações em relação à estrutura, morfologia e composição (STAHLBERG; WALLS, 2008). Basicamente as metodologias mais empregadas são microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET).

Na MEV a amostra a ser examinada é fixada, desidratada e coberta por uma camada fina de metal pesado (normalmente ouro), necessária para originar o feixe de elétrons secundários, de baixa energia, que formam imagens com relativa alta resolução. A MEV propicia uma grande profundidade de foco, porém somente características da superfície podem ser examinadas, portanto é uma técnica mais utilizada para o estudo de células intactas e tecidos do que para estruturas intracelulares. Ao contrário da TEM que precisa de amostras muito finas, a MEV pode examinar amostras maiores (DEDAVID et al., 2007). A metodologia MEV sofreu diversas otimizações, a principal delas foi a substituição da geração do feixe de elétrons via filamento termoiônico pela obtenção de elétrons via efeito de emissão de campo (*Field emission scanning electron microscopy*, FESEM), o que tornou possível a obtenção de imagens com alta resolução (PAWLEY, 1997).

O uso da MET em estudos com materiais biológicos é bastante difundido, já que essa permite a definição de imagens intracelulares, contribuindo para os estudos de morfologia celular, interação parasito-célula, efeitos citopáticos ocasionados por diferentes tipos de micro-organismos, entre outros. Algumas vezes é possível evidenciar macromoléculas específicas dentro da estrutura celular, utilizando técnicas envolvendo reações enzimáticas ou imunológicas. A MET permite ampliações maiores que 1 milhão de vezes e devido à alta resolução exigida por esta técnica, o microscópio eletrônico de transmissão é um equipamento bastante complexo e as amostras precisam ser preparadas em secções extremamente finas (JENSEN, 2012).

A microscopia eletrônica (MEV ou MET) tem sido aplicada para avaliação da ação antibacteriana de diversos compostos, sendo inclusive utilizada para sugerir mecanismos de ação de potenciais fármacos (SANTOS et al., 2008; AZIZ et al., 2012). Henriques et al. (2011) e Choi et al. (2010) avaliaram o efeito de mel de abelhas e de extratos vegetais, respectivamente, sobre a estrutura de *P. aeruginosa* utilizando MET e MEV. Zhang et al. (2011) destacaram, tanto por MEV quanto por MET, a presença de OMV nas células tratadas com ozônio e ligaram o fato a um aumento na permeabilidade celular provocada pelo composto estudado. Mais recentemente, Schaar et al. (2013) utilizando MET, mostraram a associação entre β -lactamase e OMVs em isolado clínico de *Moraxella catarrhalis*. Os autores ainda observaram que as OMVs protegiam a β -lactamase da ação de anti- β -lactamases do tipo IgG. Técnicas de microscopia eletrônica foram empregadas por alguns autores para avaliação de associação de antimicrobianos contra *P. aeruginosa*. MEV foi empregada para avaliar associação de ciprofloxacino com protamina contra células planctônicas e em biofilme de *P. aeruginosa* (SOBOH et al., 1995). A ação da combinação de vários antimicrobianos, inclusive meropenem e ciprofoxacino, sobre a morfologia de *P. aeruginosa* também já foi avaliada por MEV e os autores observaram alterações morfológicas, com a combinação sinérgica, diferentes das observadas com os antimicrobianos usados isoladamente (WAISBREN; HURLEY; WAISBREN, 1980; HAYAMI et al., 1999).

1.6 Vigilância epidemiológica e genotipagem de *P. aeruginosa*

P. aeruginosa é responsável por 11,0 a 13,8 % das infecções hospitalares em geral, mas essa taxa pode chegar um pouco acima dos 20,0 % se somente a unidades de terapia intensiva forem avaliadas (DRISCOLL; BRODY; KOLLEF, 2007). Considerando a importância desta espécie dentro do ambiente hospitalar, programas de controle de infecção tornam-se essenciais. Avaliar rotas de aquisição de micro-organismos é fundamental para a concepção de um controle adequado dos casos de infecção, o que normalmente exige a aplicação de técnicas de vigilância epidemiológica, incluindo genotipagem (SCHULTSZ et al., 2013).

1.6.1 Genotipagem de *P. aeruginosa* por *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus – Polymerase Chain Reaction (ERIC-PCR)*

Diversos métodos de tipagem molecular estão disponíveis para a caracterização genotípica de bactérias e devido ao seu alto poder discriminatório, a técnica de *pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE) é considerada padrão-ouro, embora seja trabalhosa e demorada (FOTHERGILL et al., 2010). Técnicas de tipagem menos complexas, mais rápidas e de menor custo, baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR), como a ERIC-PCR podem ser facilmente aplicadas em estudos de genotipagem de agentes de infecção hospitalar, inclusive *P. aeruginosa* (SYRMIS et al., 2004; KIDD et al., 2011). ERIC-PCR revela um perfil de fragmentos de DNA de diferentes tamanhos em gel de agarose, dependente da localização da sequência repetitiva no genoma bacteriano. Esta característica torna possível a diferenciação entre vários isolados bacterianos (VERSALOVIC; KOEUTH; LUPSKI, 1991).

1.7 Avaliação da expressão gênica em *P. aeruginosa*

Bactérias, como outros organismos vivos, rapidamente se adaptam a qualquer condição de mudança alterando sua expressão gênica. Desta forma, a avaliação dos produtos transcritos pode levar ao entendimento das diferentes situações a que as células são submetidas (BALASUBRAMANIAN; MATHEE, 2009). Diversas bactérias já tiveram seus genomas completamente sequenciados, incluindo algumas cepas de *P. aeruginosa*. Esta espécie bacteriana possui um genoma em torno de 6 Mb capaz de codificar mais de 5000 proteínas (STOVER et al., 2000; KLOCKGETHER et al., 2011). A partir desse conhecimento, técnicas capazes de avaliar níveis de expressão de transcritos em larga escala, como o microarranjo (*microarray*), têm sido empregadas para uma variedade de abordagens experimentais, como farmacogenômica (GOERTSCHES; ZETTL; HECKER, 2011), diagnóstico de patologias (NG; CHAN; POON, 2013), estudos de virulência e resistência bacteriana (FIROVED; DERETIC, 2003) entre outros. Métodos baseados em *arrays* não são aplicados para estudos nos quais as fontes de dados são limitadas ou inexistentes. Entretanto, algumas técnicas já foram descritas para avaliação da expressão gênica em bactérias sob diversos estímulos, sem o conhecimento prévio da sequência gênica a ser analisada, as denominadas tecnologias de arquitetura aberta. As mais facilmente aplicadas são as baseadas em PCR, das quais se pode citar a *differential display* PCR (DD-PCR) (LIANG; PARDEE, 1992), RNA *arbitrary primed*-PCR (RAP-PCR) (WELSH et al., 1992), cDNA-*amplified restriction fragment length polymorphism* (ARFLP) (PRASHAR; WEISSMAN, 1996), além dos métodos subtrativos como a Análise da Diferença Representacional (RDA acrônimo em inglês para *Representational Difference Analysis*) (LISITSYN; LISITSYN; WIGLER, 1993). Essas técnicas são aplicadas quando se busca uma abordagem direta ou mais focada para identificar genes diferencialmente expressos sob uma determinada situação e não uma avaliação de mudanças globais no perfil de expressão gênica. Nesse sentido, nas tecnologias abertas, o método escolhido vai selecionar o gene alvo baseado em propriedades da amostra como abundância, presença de sítio de restrição ou *status* de metilação (GROHME; FROHME; MALI, 2009).

1.7.1 Avaliação de genes diferencialmente expressos pela técnica de Análise da Diferença Representacional (*Representational Difference Analysis-RDA*)

Originalmente designada para identificar diferenças entre populações de DNA genômico, a RDA foi modificada para permitir a análise de populações de RNA-mensageiro e o isolamento de sequências mais e menos expressas em duas populações diferentes de DNA complementar (cDNA), sendo neste caso, referida como cDNA-RDA (HUBANK; SCHATZ, 1994).

A metodologia original de RDA, desenvolvida por Lisitsyn; Lisitsyn e Wigler (1993) baseou-se em hibridização subtrativa e enriquecimento cinético pela PCR, purificando fragmentos de DNA presentes em uma população e ausentes em outra. Porções representativas da sequência de DNA ou cDNA alvo são preparadas, o que permite alcançar um maior rendimento durante a etapa de hibridização subtrativa e conseqüentemente, um enriquecimento cinético mais efetivo, com grande purificação da sequência alvo. A RDA aplica este princípio por meio da amplificação, por PCR, dos híbridos formados pelo *tester*. Para que isto ocorra, uma combinação de adaptadores é usada, um com 24 bases é ligado na extremidade 5' do DNA *tester* e outro menor, com 12 bases, que é complementar ao maior, é usado para aumentar a eficiência da ligação e embora, não se ligue efetivamente ao DNA, faz uma ligação não-covalente e se dissocia a altas temperaturas. Em seguida, o adaptador de 24 bases é usado como iniciador em uma PCR, permitindo desta maneira que as sequências de DNA alvo sejam amplificadas seletivamente (Figura 4). Sucessivas interações *tester-driver* usando proporções crescentes de driver são empregadas para competir com sequências comuns para ambas as populações e para enriquecer as sequências alvo até que elas apareçam como bandas distintas em gel de agarose. Para que o enriquecimento seletivo não seja limitado pela eficiência da enzima de restrição, diferentes adaptadores são usados em cada rodada de interação *tester-driver*. Fragmentos com 200 a 600 pares de bases são preferencialmente enriquecidos pela PCR acoplada à hibridização subtrativa na técnica de cDNA-RDA, desta forma, a escolha da enzima de restrição é muito importante para a geração de fragmentos de DNA de tamanhos adequados (LISITSYN, 1995).

Esta técnica tem-se mostrado útil no estudo de micro-organismos de importância médica, como no isolamento seletivo de genes envolvidos na interação parasito-hospedeiro

em diferentes isolados de *Giardia duodenalis* (MA'AIEH; BROOK-CARTER, 2012), bem como na diferenciação de grupos filogenéticos de *Trypanosoma cruzi* (TOMA et al., 2007).

A técnica de RDA foi empregada por alguns autores para avaliação de genes diferencialmente expressos por *Paracoccidioides brasiliensis*, durante a diferenciação morfológica do fungo que acontece na infecção em humanos (BAILÃO et al., 2006; BORGES et al., 2011). Baeza et al. (2007) detectaram por RDA, genes diferencialmente expressos por *Trichophyton rubrum*, após contato com queratina, em uma simulação de infecção humana. RDA usando DNA foi empregada para determinação direta de genes de virulência em *P. aeruginosa* comparando uma amostra da bactéria isolada clinicamente com uma cepa cujos fatores de virulência eram previamente conhecidos (CHOI et al., 2002). Também utilizando a técnica de RDA, Del Rio et al. (2005) identificaram um fragmento de DNA específico (alelo *suII* da enzima dihydropteroato sintetase) da sorovariedade 2 de *Haemophilus parasuis*.

Embora frequentemente aplicada em eucariotos, esta metodologia tem sido pouco empregada para a avaliação da expressão gênica em bactérias de interesse médico. Bowler, Hubank e Spratt (1999) avaliaram a aplicação de cDNA-RDA em um sistema modelo para identificar genes regulados por ferro em *Neisseria meningitidis*. De acordo com estes autores a metodologia de cDNA-RDA apresenta grande potencial para estudar a expressão diferencial de genes durante a interação patógeno-hospedeiro em processo infeccioso bacteriano. Mais recentemente, genes expressos diferencialmente por *Mycobacterium tuberculosis* foram detectados, pela técnica de cDNA-RDA, após a exposição a compostos de rutênio com atividade antimicobacteriana (LEITE et al., 2013).

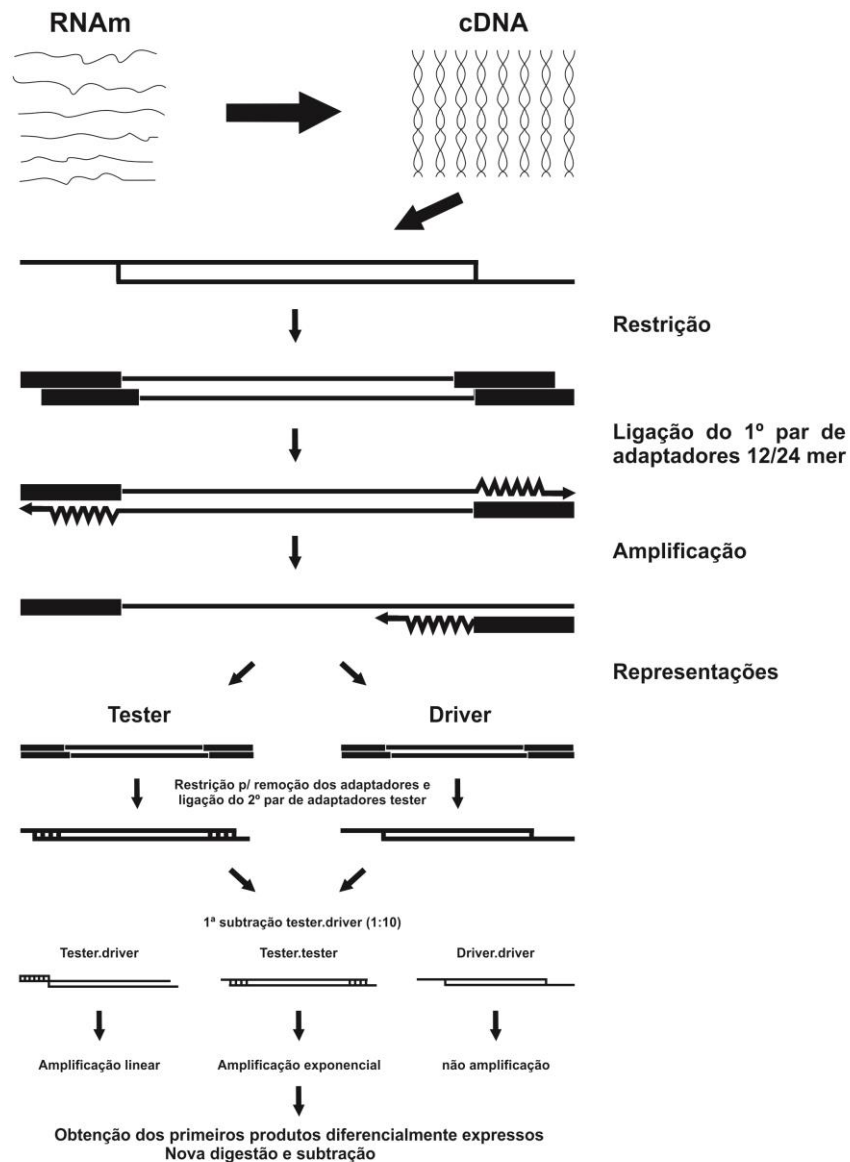


Figura 4. Esquema representativo da técnica de Análise da Diferença Representacional (RDA). Adaptado de Hubank; Schatz (1994)

1.7.2 Avaliação da expressão gênica por PCR em tempo real

Transcrição reversa acoplada à PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR *reverse transcription quantitative real-time* PCR ou simplesmente qPCR) é um método de quantificação de transcritos, rotineiramente usado para investigar a expressão de um pequeno ou moderado número de genes (VANGUILDER; VRANA; FREEMAN, 2008). O princípio da qPCR para análise de expressão gênica está baseado na detecção em tempo real da

amplificação por PCR do RNA presente em uma amostra. Após a transcrição reversa do RNA em cDNA é necessário uma adequada detecção dos produtos de PCR, um instrumento para monitorizar a amplificação em tempo real e um *software* apropriado para a análise quantitativa. Quanto maior a quantidade inicial do ácido nucleico alvo na amostra, mais cedo um significativo aumento na fluorescência é detectado (WITTEWER et al., 1997). A detecção química pode estar baseada em sondas (detecção específica) ou não-sondas (inespecífica). Um sistema de detecção químico inespecífico amplamente utilizado é o SYBR Green. Este fluoróforo emite fluorescência quando está intercalado entre a dupla fita do DNA. Desta forma, quando monitorados em tempo real um aumento no sinal da fluorescência é detectado com o prosseguimento da polimerização. Uma desvantagem do sistema SYBR Green é que a especificidade da técnica depende da especificidade do iniciador (*primer*) utilizado. Detecção química utilizando sonda fluorescente é mais específica, pois o sinal fluorescente é gerado apenas quando a sonda se hibridiza com o DNA alvo complementar (BUSTIN; MUELLER, 2005).

A quantificação da expressão gênica pode ser absoluta ou relativa. A quantificação absoluta é realizada a partir de uma curva padrão gerada de uma fonte externa conhecida e permite expressar dados em termos de transcritos por unidade biológica. A precisão da quantificação absoluta depende inteiramente da padronização e curvas-padrão são altamente confiáveis, permitindo a geração de resultados reprodutíveis e específicos. A quantificação relativa descreve a expressão gênica baseada em unidades arbitrárias comparadas a uma amostra ou uma série de amostras calibradoras. A expressão relativa é usualmente normalizada para um ou mais genes endógenos a fim de corrigir as variações nas concentrações e ou qualidade do molde inicial. As diferenças na obtenção da amostra (RNA), conseqüente à ampla variação de resposta de células sujeitas as mesmas condições, torna a normalização uma estratégia fundamental na quantificação por *real-time*. Apesar de não superar todos os problemas de variações subpopulacionais, o emprego de genes ribossomais (RNAr) ainda é o mais indicado para normalização, já que estes sofrem menos variações que os RNA mensageiros quando expostos as mesmas condições (BUSTIN et al., 2005).

Em análises de expressão gênica envolvendo *P. aeruginosa*, genes ribossomais como *rpsL*, *rpoC* e *rpoD* são utilizados como normalizador endógeno, principalmente em estudos de quantificação da expressão de genes de resistência (SAVLI, et al., 2003; HOCQUET et al., 2012; OCAMPO-SOSA et al., 2012)

O mais simples e mais usado modelo matemático de avaliação de expressão gênica, inclusive em *P. aeruginosa* (LEGENDRE et al., 2012; CONWAY; ESIÖBU; LOPEZ, 2012) é o método do $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), descrito pela equação:

$$RQ = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$
$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t (\text{amostra teste}) - \Delta C_t (\text{amostra calibradora})$$
$$\Delta C_t = C_t (\text{amostra teste}) - C_t (\text{gene endógeno})$$

Onde RQ é a quantificação relativa e C_t é o *ciclo threshold*, que representa o número de ciclo em que a fluorescência gerada pela amostra excede um limiar pré-definido pelo fabricante do equipamento ou pelo próprio pesquisador.

2. OBJETIVOS GERAL E ESPECÍFICOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar alterações estruturais e identificar genes diferencialmente expressos em um isolado clínico genotipicamente distinto de *P. aeruginosa* multirresistente (1071-MRPA) decorrentes da exposição a concentrações subinibitórias de meropenem e ciprofloxacino isoladamente e em combinação (MCC)

2.2 Objetivos específicos

- Selecionar isolados de *P. aeruginosa* multirresistentes entre os isolados bacterianos de pacientes internados no Hospital Universitário de Maringá (HUM) – Paraná, no período compreendido entre janeiro de 2007 a julho de 2009;
- Genotipar os isolados de *P. aeruginosa* selecionados por *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*-PCR (ERIC-PCR);
- Determinar a concentração inibitória mínima de meropenem e ciprofloxacino para cada isolado selecionado;
- Determinar a ação antimicrobiana da combinação de meropenem e ciprofloxacino (MCC) sobre cada bactéria usando a técnica de *checkerboard* e curva de tempo de morte;
- Avaliar a morfologia e a ultraestrutura celular de *P. aeruginosa*, utilizando microscopia eletrônica de varredura e transmissão, após exposição a meropenem, ciprofloxacino e MCC.
- Avaliar a expressão gênica diferencial em *P. aeruginosa*, utilizando a técnica de *Representational Difference Analysis* (RDA) após exposição ao meropenem, ciprofloxacino e MCC;
- Confirmar a expressão de determinados genes diferencialmente expressos por *P. aeruginosa*, utilizando *Reverse Transcription Quantitative Real-Time* PCR (qPCR), após exposição ao meropenem, ciprofloxacino e MCC;

- Quantificar a expressão de genes relacionados à resistência aos antibacterianos estudados e resposta SOS em *P. aeruginosa*, utilizando qPCR, após exposição ao meropenem, ciprofloxacino e MCC.

REFERÊNCIAS

ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da célula**. 3ª Ed. Porto Alegre: Artes médicas, 1997, cap. 4, p. 139-189.

AZIZ, M.A. et al. Antimicrobial properties of a chitosan dextran-based hydrogel for surgical use. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, DC, v. 56, n. 1, p. 280-7, 2012.

BAEZA, L.C. et al. cDNA representational difference analysis used in the identification of genes expressed by *Trichophyton rubrum* during contact with keratin. **Microbes and Infection**, Paris, v. 9, n. 12-13, p. 1415-21, 2007.

BAILÃO, A.M. et al. Differential gene expression by *Paracoccidioides brasiliensis* in host interaction conditions: representational difference analysis identifies candidate genes associated with fungal pathogenesis. **Microbes and Infection**, Paris, v. 8, p. 2686-97, 2006.

BALAJI, V.; JEREMIAH, S. S.; BALIGA, P. R. Polymyxins: Antimicrobial susceptibility concerns and therapeutic options. **Indian Journal of Medical Microbiology**, New Delhi, v.29, p.230-42, 2011.

BALASUBRAMANIAN, D. et al. A dynamic and intricate regulatory network determines *Pseudomonas aeruginosa* virulence. **Nucleic Acids Research**, London, v.41, n. 1, p. 1-20, 2013.

BALASUBRAMANIAN, D.; MATHEE, K. Comparative transcriptome analyses of *Pseudomonas aeruginosa*. **Human Genomics**, London, v. 3, n. 4, p. 349-361, 2009.

BAJAKSOUZIAN, S. et al. Activities of levofloxacin, ofloxacin, and ciprofloxacin, alone and in combination with amikacin, against acinetobacters as determined by checkerboard and time-kill studies. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, DC, v. 41, n. 5, p. 1073-6, 1997.

BARREIRO, E. et al. Synthesis and antimicrobial activities of silver(I) 3-(substituted phenyl) sulfanylpropenoates. **European Journal Medicinal Chemistry**, Paris, v 43, n. 11, p. 2489-2497, 2008

BEVERIDGE, T.J.; Structures of Gram negative cell walls and their derived membrane vesicles. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC, v. 181, n. 16, p. 4725-33, 1999.

BODÍ, M.; GARNACHO, Y.J. *Pseudomonas aeruginosa*: tratamento combinado frente a monoterapia. **Medicina Intensiva**, Madrid, v. 31, n. 2, p. 83-87, 2007.

BOMBERGER, J.M. et al. Long-distance delivery of bacterial virulence factors by *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane vesicles. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 5, n. 4, p. e1000382, 2009.

BOMBERGER, J.M. et al. A *Pseudomonas aeruginosa* toxin that hijacks the host ubiquitin proteolytic system. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 7, n. 3, p. e1001325, 2011.

BORGES, C.L. et al. Genes potentially relevant in the parasitic phase of the fungal pathogen *Paracoccidioides brasiliensis*. **Mycopathologia**, Dordrecht, v. 171, n. 1, p. 1-9, 2011.

BOWLER, L.D.; HUBANK, M.; SPRATT, B.G. Representational difference analysis of cDNA for the detection of differential gene expression in bacteria: development using a model of iron-regulated gene expression in *Neisseria meningitidis*. **Microbiology**, Reading, v.145, p.3529-37, 1999.

BRATU, S. et al. Role of AmpD, OprF and penicillin-binding proteins in beta-lactam resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Medical Microbiology**, Reading, v. 56, n. Pt 6, p. 809-14, 2007.

BUSH, K.; JACOBY, G.A. Updated functional classification of beta-lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, DC, v. 54, n. 3, p. 969-76, 2010.

BUSTIN, S.A. et al. Quantitative real-time RT-PCR--a perspective. **Journal of Molecular Endocrinology**, Bristol, v. 34, n. 3, p. 597-601, 2005.

BUSTIN, S.A.; MUELLER, R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. **Clinical Science**, London, v. 109, n. 4, p. 365-79, 2005.

CAMPANA, S. et al. Antimicrobial susceptibility and synergistic activity of meropenem against Gram-negative non-fermentative bacteria isolated from cystic fibrosis patients. **Journal of Chemotherapy**, Firenze, v. 15, n. 6, p. 551-4, 2003.

CAPPELLETTY, D.M. RYBAK, M.J. Comparison of methodologies for synergism testing of drug combinations against resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, DC, v. 40, n. 3, p. 677-83, 1996.

CHOI, J.Y. et al. Identification of virulence genes in a pathogenic strain of *Pseudomonas aeruginosa* by representational difference analysis. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC, v. 184, n. 4, p. 952-61, 2002.

CHOI, U.K. et al. Optimization of antibacterial activity of *Perilla frutescens* var. *acuta* leaf against *Pseudomonas aeruginosa* using the Evolutionary Operation-Factorial Design Technique. **International Journal of Molecular Science**, Basel, v. 11, n. 10, p. 3922-32, 2010.

CIOFU, O.; HANSEN, C.R.; HOIBY, N. Respiratory bacterial infections in cystic fibrosis. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, Philadelphia, v. 19, n. 3, p. 251-8, 2013.

CIRIONI, O. et al. Efficacy of tachyplesin III, colistin, and imipenem against a multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* strain. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, DC, v 51, n. 6, p. 2005-10. 2007.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility**. Twenty-third Informational Supplement. Document M100-S23. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, USA, 2013

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**. Approved Standard Ninth Edition. Document M7-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, USA, 2012. 65p.

CONWAY, C.A.; ESIÖBU, N.; LOPEZ, J.V. Co-Cultures of *Pseudomonas aeruginosa* and *Roseobacter denitrificans* reveal shifts in gene expression levels compared to solo cultures. **The Scientific World Journal**, v. 2012; ID 120108, 2012.

DEDAVID, B.A.; GOMES, C.I.; MACHADO, G. Microscopia eletrônica de varredura aplicações e preparações de amostras. Porto Alegre: Edipucrs, 2007, 60p.

DEL RIO, M.L. et al. Identification of *suII* allele of dihydropteroate synthase by representational difference analysis in *Haemophilus parasuis* serovar2. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 40, p. 436-442, 2005

DRISCOLL, J.A.; BRODY, S.L.; KOLLEF, M.H. The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Drugs**, Auckland, v. 67, n. 3, p. 351-68, 2007.

EDWARDS, J.R. Meropenem: a microbiological overview. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 3, suppl.A, p. 1-17, 1995.

EL-GAMAL, M.I.; OH, C.H. Current status of carbapenem antibiotics. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, Hilversum, v. 10, n. 18, p. 1882-97, 2010.

EL SOLH, A.A.; ALHAJHUSAIN, A. Update on the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 64, n. 2, p. 229-38, 2009.

ERDEM, I. et al. The comparison of in the vitro effect of imipenem or meropenem combined with ciprofloxacin or levofloxacin against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 20, n. 5, p. 384-6, 2002.

ERDEM I, KUCUKERCAN M, CERAN N.. In vitro activity of combination therapy with cefepime, piperacillin-tazobactam, or meropenem with ciprofloxacin against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. **Chemotherapy**, Basel, v. 49, n 6, p.294-97, 2003.

ERMERTCAN, S.et al. Investigation of synergism of meropenem and ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* strains isolated from intensive care unit infections. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, London, v. 33, n. 11, p. 818-21, 2001.

FAZELI, H.et al. *Pseudomonas aeruginosa* infections in patients, hospital means, and personnel's specimens. **Journal of Research in Medical Sciences**, Isfahan v. 17, n. 4, p. 332-337, 2012.

FIROVED, A.M.; DERETIC, V. Microarray analysis of global gene expression in mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC, v. 185, n. 3, p. 1071-81, 2003.

FLATEAU C, et al. Recurrent pyelonephritis due to NDM-1 metallo-beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in a patient returning from Serbia, France, 2012. Euro surveillance: bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin, Stockholm, v. 17, n. 45, 2012. Disponível em: <http://www.eurosurveillance.org/images/dynamic/EE/V17N45/art20311.pdf>. Acesso em: 10 Abr. 2013.

FOTHERGILL, J.L.et al. Impact of *Pseudomonas aeruginosa* genomic instability on the application of typing methods for chronic cystic fibrosis infections. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 48, n. 6, p. 2053-9, 2010.

FOTHERGILL, J.L.; WINSTANLEY, C.; JAMES, C.E. Novel therapeutic strategies to counter *Pseudomonas aeruginosa* infections. **Expert Review of Anti Infective Therapy**, London, v. 10, n. 2, p. 219-35, 2012.

FOWERAKER, J.E.et al. Comparison of methods to test antibiotic combinations against heterogeneous populations of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* from patients with acute infective exacerbations in cystic fibrosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, DC, v. 53, n. 11, p. 4809-15, 2009.

GARNACHO-MONTERO, J. et al. Optimal management therapy for *Pseudomonas aeruginosa* ventilator-associated pneumonia: an observational, multicenter study comparing monotherapy with combination antibiotic therapy. **Critical Care Medicine**, Philadelphia, v. 35, n. 8, p.1888-95, 2007.

GOERTSCHES, R.H.; ZETTL, U.K.; HECKER, M. Sieving treatment biomarkers from blood gene-expression profiles: a pharmacogenomic update on two types of multiple sclerosis therapy. **Pharmacogenomics**, London, v. 12, n 3, p. 423-32, 2011.

GROHME, M.; FROHME, M.; MALI,B. Open architecture PCR-based methods for differential gene expression analysis. **Current Pharmaceutical Analysis**, Oak Park, v. 5, p. 1-9, 2009.

GURSKY, R. New information from large tissue volumes to the smallest structures of the cell: what new methods and electron microscopy can do for your research. **Toxicologic Pathology**, Newark, v. 40, n. 2, p. 403-10, 2012.

HAYAMI, H.et al. Activities of beta-lactams, fluoroquinolones, amikacin and fosfomicin alone and in combination against *Pseudomonas aeruginosa* isolated from complicated urinary tract infections. **Journal of Infection and Chemotherapy**, Tokyo,v. 5, n. 3, p. 130-138, 1999.

HARMSSEN, M.et al. An update on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, tolerance, and dispersal. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 59, n. 3, p. 253-68, 2010.

HENRIQUES, A.F. et al. The effect of manuka honey on the structure of *Pseudomonas aeruginosa*. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, Berlin, v. 30, n. 2, p. 167-71, 2011.

HIRSCHI, E.D. et al. *In vitro* activity of MK-7655, a novel β -lactamase inhibitor, in combination with imipenem against carbapenem-resistant Gram-negative bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, DC, v.56, n. 3, p. 3753-7, 2012.

HOCQUET, D. et al. Evidence for induction of integron-based antibiotic resistance by the SOS response in a clinical setting. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 8, n. 6, p.e1002778, 2012.

HUANG, H.; HANCOCK, R.E. Genetic definition of the substrate selectivity of outer membrane porin protein OprD of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Bacteriology**, Washington, DC, v. 175, n. 24, p. 7793-800, 1993.

HUBANK, M.; SCHATZ, D.G. Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 22, n. 25, p. 5640-8, 1994.

HURLEY, M.; SMYTH, A. Fluoroquinolones in the treatment of bronchopulmonary disease in cystic fibrosis. **Therapeutic Advances in Respiratory Diseases**, London, v. 6, n. 6, p. 363-73, 2012

ISENBERG, H.D.; ALPERSTEIN, P.; FRANCE, K. *In vitro* activity of ciprofloxacin, levofloxacin, and trovafloxacin, alone and in combination with beta-lactams, against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, and *Burkholderia cepacia*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, New York, v. 33, n. 2, p. 81-6, 1999.

JÁCOME, P.R. et al. 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, n. 6, p. 707-12, 2012.

JALAL, S.; WRETLIND, B. Mechanisms of quinolone resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbial Drug Resistance**, New York, v. 4, n. 4, p. 257-61, 1998.

JENSEN, E.C. Types of imaging, Part 1: Electron microscopy. *The anatomical record*, Hoboken, v. 295, p. 716-21, 2012.

JIMENEZ, P.N. et al. The multiple signaling systems regulating virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, DC, v. 76, n. 1, p. 46-65, 2012.

KARLSSON, T. et al. The *Pseudomonas aeruginosa* N-acylhomoserine lactone quorum sensing molecules target IQGAP1 and modulate epithelial cell migration. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 8, n. 10, p. e1002953, 2012.

KANELLAKOPOULOU, K. et al. *In vitro* synergism of β -lactams with ciprofloxacin and moxifloxacin against genetically distinct multidrug-resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 32, p. 33-39, 2008.

KLOCKGETHER, J. et al. *Pseudomonas aeruginosa* Genomic Structure and Diversity. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, p. 2-19, 2011.

KIDD, T.J. et al. Comparison of three molecular techniques for typing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in sputum samples from patients with cystic fibrosis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 49, n. 1, p. 263-268, 2011.

KUNZ, A.N.; BROOK, I. Emerging resistant Gram-negative aerobic bacilli in hospital-acquired infections. **Chemotherapy**, Basel, v. 56, n. 6, p. 492-500, 2010.

LEGENDRE, C. et al. *Pseudomonas aeruginosa* Alkyl quinolones repress hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) signaling through HIF-1 α degradation. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 11, p. 3985-92, 2012.

LEITE, G.G.S. et al. Genes differentially expressed by *Mycobacterium tuberculosis* after exposure to ruthenium phosphinic compound and isoniazid. **International Journal of Microbiology Research**, Mumbai, v. 5, n. 1, p. 356-61, 2013.

LIANG, P.; PARDEE, A.B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. **Science**, New York, v. 27, p. 967-971, 1992.

LIM, T.P. et al. Effective antibiotics in combination against extreme drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with decreased susceptibility to polymyxin B. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n. 12, p. e28177, 2011.

LISITSYN, N.A. Representational difference analysis: finding the differences between genomes. **Trends in Genetics**, Cambridge, v. 11, n. 8, p. 303-7, 1995.

LISITSYN, N.; LISITSYN, N.; WIGLER, M. Cloning the differences between two complex genomes. **Science**, New York, v. 259, n. 5097, p. 946-51, 1993.

LISTER, P.D. Carbapenems in the USA: focus on doripenem. **Expert Review of Anti Infective Therapy**, London, v. 5, n. 5, p. 793-809, 2007.

LISTER, P.D.; WOLTER D.J.; HANSON, N.D. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, DC, v. 22, n. 4, p. 582-610, 2009.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, San Diego, v. 25, n. 4, p. 402-8, 2001.

LIVERMORE, D.M. Has the era of untreatable infections arrived? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 64, suppl. 1, p. i29-i36, 2009.

LIVERMORE, D.M. Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 47, n. 3, p. 247-50, 2001

LOUIE, A. et al. The combination of meropenem and levofloxacin is synergistic with respect to both *Pseudomonas aeruginosa* kill rate and resistance suppression. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Washington, DC, v. 54, n. 6, p. 2646-54, 2010.

LUTZ, J.K.; LEE, J. Prevalence and antimicrobial-resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in swimming pools and hot tubs. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, Basel, v. 8, n. 2, p. 554-64, 2011.

MA'AYEH, S.Y.; BROOK-CARTER, P.T. Representational difference analysis identifies specific genes in the interaction of *Giardia duodenalis* with the murine intestinal epithelial cell line, IEC-6. **International Journal for Parasitology**, New York, v. 42, n. 5, p. 501-9, 2012.

MAGIORAKOS, A.P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, Oxford, v.18, n.3, p.268-281, 2012.

MANGONI, M.L. et al. Comparative analysis of the bactericidal activities of amphibian peptide analogues against multidrug-resistant nosocomial bacterial strains. **Antimicrobials Agents and Chemotherapy**, Washington, DC, v. 52, n.1, p. 85-91, 2008.

MAREDIA, R. et al. Vesiculation from *Pseudomonas aeruginosa* under SOS. **The Scientific World Journal**, Newbury, ID 402919, doi: 10.1100/2012/402919, 2012.

MASHBURN, L.M.; WHITELEY, M. Membrane vesicles traffic signals and facilitate group activities in a prokaryote. **Nature**, Basingstoke, v. 437, n. 7057, p. 422-5, 2005.

MCBROOM, A.J.; KUEHN, M.J. Release of outer membrane vesicles by Gram-negative bacteria is a novel envelope stress response. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 63, n. 2, p. 545-58, 2007.

MESAROS, N. et al. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. **Clinical Microbiology and Infection**, Paris, v. 13, n. 6, p. 560-578, 2007.

MITSUGUI, C.S. et al. In vitro activity of polymyxins in combination with β -lactams against clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 38, n. 5, p. 447-50, 2011.

NAVON-VENEZIA, S.; BEN-AMI, R.; CARMELI, Y. Update on *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* infections in the healthcare setting. **Current Opinion in Infectious Diseases**, Hangerstown, v. 18, n. 4, p. 306-13, 2005.

NG, P.C.; CHAN, K.Y.; POON, T.C. Biomarkers for prediction and diagnosis of necrotizing enterocolitis. **Clinics in Perinatology**, Philadelphia, v. 40, n. 1, p. 149-59, 2013

NICOLAU, D.P. Carbapenem stewardship: does ertapenem affect *Pseudomonas* susceptibility to other carbapenems? A review of the evidence. **International Journal Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 39, n.1, p. 11-15, 2012

NORDMANN, P. et al. The emerging NDM carbapenemases. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 19, n. 12, p. 588-95, 2011.

OCAMPO-SOSA, A.A. et al. Alterations of OprD in Carbapenem-Intermediate and -Susceptible Strains of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Patients with Bacteremia in a Spanish Multicenter Study. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. Washington, DC, v.56, n. 4, p. 1703-13, 2012.

PANKUCH, G.A. et al. Activity of meropenem with and without ciprofloxacin and colistin against *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Washington, DC, v. 52, n. 1, p. 333-336, 2008.

PAWLEY, J. The development of field-emission scanning electron microscopy for imaging biological surfaces. **Scanning**, New York, v. 19, n. 5, p. 324-36, 1997.

PESCI, E.C. et al. Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of *Pseudomonas aeruginosa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 96, n. 20, p. 11229-34, 1999.

PIDDOCK, L.J. et al. Quinolone accumulation by *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 43, n. 1, p. 61-70, 1999.

PILLAI, S.K, MOELLERING JR, R.C.; ELIOPOULOS, G.M. Antimicrobial Combinations,. In Lorian V. (ed.), **Antibiotics in Laboratory Medicine**, Fifth edition ed. Lippincott Williams & Wilkins: New York, p. 365-440, 2005

POIREL, L. et al. Emergence of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the United States. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, DC, v. 54, n. 7, p. 3072, 2010.

POOLE, K. Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, DC, v. 49, n. 2, p. 479-87, 2005.

PRASHAR, Y.; WEISSMAN, S.M. Analysis of differential gene expression by display of 3' end restriction fragments of cDNAs. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v.93, n. 2, p. 659-63, 1996.

RESENDE, M.M. et al. Epidemiology and outcomes of ventilator-associated pneumonia in northern Brazil: an analytical descriptive prospective cohort study. **BMC Infectious Diseases**, London, v. 5, n. 13:119, doi: 10.1186/1471-2334-13-119, 2013.

ROSSI, F. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. **Clinical Infectious Diseases**, Oxford, v. 52, n. 9, p. 1138-43, 2011.

SADER, H.S.; JONES, R.N. Comprehensive in vitro evaluation of cefepime combined with aztreonam or ampicillin/sulbactam against multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 25, n. 5, p. 380-384, 2005.

SAFDAR, N.; HANDELSMAN, J.; MAKI, D.G. Does combination antimicrobial therapy reduce mortality in Gram-negative bacteraemia? A meta-analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 4, n. 8, p. 519-27, 2004.

SANDIUMENGE, A.; RELLO, J. Ventilator-associated pneumonia caused by ESKAPE organisms: cause, clinical features, and management. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, Philadelphia, v. 18, n. 3, p. 187-93, 2012.

SANTOS, A.O. et al. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 103, n. 3, p. 277-81, 2008.

SAVLI, H. et al. Expression stability of six housekeeping genes: a proposal for resistance gene quantification studies of *Pseudomonas aeruginosa* by real-time quantitative RT-PCR. **Journal of Medical Microbiology**, v. 52, p. 403-408, 2003.

SCHAAR, V. et al., Outer membrane vesicles shield *Moraxella catarrhalis* β -lactamase from neutralization by serum IgG. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 68, p. 593-600, 2013.

SCHULTSZ, C. et al. Effects of infection control measures on acquisition of five antimicrobial drug-resistant microorganisms in a tetanus intensive care unit in Vietnam. **Intensive Care Medicine**, Paris, v.39, n.4, p.661-71, 2013.

SIEGEL, R.E. Emerging gram-negative antibiotic resistance: daunting challenges, declining sensitivities, and dire consequences. **Respiratory Care**, Dallas, v. 53, n. 4, p. 471-479, 2008.

SOBOH, F. et al. Effects of ciprofloxacin and protamine sulfate combinations against catheter-associated *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, DC, v. 39, n. 6, p. 1281-6, 1995.

SOLAK, S. et al. In vitro activity of meropenem in combination with ciprofloxacin against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **International Journal Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 25, n. 2, p. 181-2, 2005.

STAHLBERG, H.; WALZ, T. Molecular electron microscopy: state of the art and current challenges. **American Chemical Society chemical biology**, Washington, DC, v. 3, n. 5, p. 268-81, 2008.

STOVER, C.K. et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. **Nature**, Londres, v. 406, n. 6799, p. 959-64, 2000.

STRATEVA, T.; YORDANOV, D. *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance. **Journal of Medical Microbiology**, Reading, v. 58, n. Pt 9, p. 1133-48, 2009.

SUAREZ, C. et al. A large sustained endemic outbreak of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*: a new epidemiological scenario for nosocomial acquisition. **BMC Infectious Diseases**, London, v. 13, n. 11, p. 272-9, 2011.

SYRMIS, M.W. et al. Rapid genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* isolates harboured by adult and paediatric patients with cystic fibrosis using repetitive-element-based PCR assay. **Journal of Medical Microbiology**. Reading, v. 53, p. 1089-1096, 2004.

SWIATECKA-URBAN, A. et al. *Pseudomonas aeruginosa* inhibits endocytic recycling of CFTR in polarized human airway epithelial cells. **American Journal of Physiology, Cell Physiology**, Bethesda, v. 290, n. 3, p. C862-72, 2006.

TIMURKAYNAK, F. et al. In vitro activities of non-traditional antimicrobials alone or in combination against multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care units. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 27, n. 3, p. 224-8, 2006.

TOMA, H.K. et al. *Trypanosoma cruzi*: subtractive hybridization as a molecular strategy to generate new targets to distinguish groups and hybrids. **Experimental Parasitology**, New York, v. 117, n. 2, p. 178-87, 2007.

VANGUILDER, H.D.; VRANA, K.E.; FREEMAN, W.M. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. **Biotechniques**, London, v. 44, n. 5, p. 619-26, 2008.

VARDAKAS, K.Z. et al. β -Lactam plus aminoglycoside or fluoroquinolone combination versus β -lactam monotherapy for *Pseudomonas aeruginosa* infections: A meta-analysis. **International Journal Antimicrobial Agents**, London, v. 41, n. 4, p. 301-10, 2013.

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

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, London, v. 19, n. 24, p. 6823-31, 1991.

VILLEGAS, M. et al. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing β -lactamase. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Washington, v. 51, p. 1553-5, 2007.

WAISBREN, S.J.; HURLEY, D.J.; WAISBREN, B.A. Morphological expressions of antibiotic synergism against *Pseudomonas aeruginosa* as observed by scanning electron microscopy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, DC, v. 18, n. 6, p. 969-75, 1980.

WELSH, J. et al. Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA. **Nucleic Acids Research**, London, v. 20, n. 19, p. 4965-70, 1992.

WITTEWER, C.T. et al. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. **Biotechniques**, London, v. 22, n. 1, p. 130-8, 1997.

WOLTER, D.J. et al. Surveillance of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Puerto Rican Medical Center Hospitals: dissemination of KPC and IMP-18 beta-lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, DC, v. 53, n. 4, p. 1660-4, 2009.

ZAVASCKI, A.P. et al. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, London, v. 8, n. 1, p. 71-93. 2010.

ZHANEL, G.G. et al. A critical review of the fluoroquinolones: focus on respiratory infections. **Drugs**, Auckland, v. 62, n. 1, p. 13-59, 2002.

ZHANG, Y.Q. et al. Effects of ozone on membrane permeability and ultrastructure in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, n. 4, p. 1006-15, 2011.

ZHU B, et al. Study on drug resistance of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid-mediated AmpC β -lactamase. **Molecular Medicine Reports**, Athens, v. 7, p. 664-8, 2013.

CAPÍTULO II

Artigo 1: High genetic diversity among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. isolated in a public hospital in Brazil

(Artigo publicado na revista científica *Brazilian Journal Pharmaceutical Science*)

High genetic diversity among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. isolated in a public hospital in Brazil

Vera Lúcia Dias Siqueira^{1,*}, Rosilene Fressatti Cardoso², Rubia Andreia Falleiros de Pádua², Katiany Rizzieri Caleffi-Ferracioli², Cesar Helbel³, Adolfo Carlos Barreto Santos⁴, Elisabeth Eyko Aoki³, Celso Vataru Nakamura¹

¹Postgraduate Program in Pharmaceutical Science, ²Department of Clinical Analysis and Biomedicine, ³University Hospital of Maringá, State University of Maringá, ⁴Laboratory of Mycobacteriology, Department of Biological Science, School of Pharmaceutical Science, Paulista State University

***Correspondence:**

Laboratório de Bacteriologia Médica
Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina
Universidade Estadual de Maringá
Av. Colombo, 5790, Bloco T-20, sala 202
87020-900 - Maringá - Paraná, Brasil
Telefone: 55 44 3011-5376
E-mail: vldsiqueira@uem.br

In Brazil and other regions of the world, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. Have emerged as important agents of nosocomial infection and are commonly involved in outbreaks. The main objective of the present study was to evaluate the genetic relationship among *P.aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. isolated from patients in a public university hospital in northwestern Paraná, Brazil, and report their antimicrobial resistance profile. A total of 75 *P. aeruginosa* and 94 *Acinetobacter* spp. isolates were phenotypically identified and tested for antibiotic susceptibility using automated methodology. Polymyxin B was tested by disk diffusion for *P. aeruginosa*. Metallo- β -lactamase (MBL) was detected using a disk approximation test. Genotyping was performed using enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction (ERIC-PCR). Approximately 55% of the *P. aeruginosa* isolates and 92% of the *Acinetobacter* spp. isolates were multiresistant, but none were MBL-producers. ERIC-PCR revealed the presence of small clusters of carbapenem-

resistant *Acinetobacter* spp., most likely OXA-type carbapenemase producers. Furthermore, high genetic diversity in *P. aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. clinical isolates was observed, suggesting that cross-transmission is not very frequent in the studied hospital.

Uniterms: Antimicrobial resistance. Bacterial typing. ERIC-PCR. *Pseudomonas aeruginosa*. *Acinetobacter* spp.

No Brasil, bem como em outras regiões do mundo, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. surgiram como importantes agentes de infecção nosocomial e são comumente envolvidos em surtos. O objetivo principal deste estudo foi descrever a relação genética de *P. Aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. isoladas de pacientes internados em hospital universitário público do noroeste do Paraná- Brasil e reportar o perfil de resistência dessas bactérias. Um total de 75 *P. aeruginosa* e 94 *Acinetobacter* spp. isolados foi fenotipicamente identificado e testado para a susceptibilidade aos antibióticos por metodologia automatizada. A polimixina B foi testada por difusão em disco para *P. aeruginosa*. Metalo- β -lactamase (MBL) foi detectada por disco-aproximação. Análise genotípica foi realizada por *enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction* (ERIC-PCR). Aproximadamente 55% dos isolados de *P. aeruginosa* e 92% de *Acinetobacter* spp. isolados foram multirresistentes, mas nenhum foi produtor de MBL. Os resultados de ERIC-PCR revelaram pequenos grupamentos de *Acinetobacter* spp. resistentes aos carbapenêmicos, provavelmente pela produção de carbapenemases do tipo OXA. Além disso, alta diversidade genética entre os isolados de *P.aeruginosa* e *Acinetobacter* spp., foi observada, sugerindo que a transmissão cruzada destas espécies bacterianas não é muito frequente em nosso hospital.

Unitermos: Resistência antimicrobiana. Tipagem bacteriana. ERIC-PCR. *Pseudomonas aeruginosa*. *Acinetobacter* spp.

INTRODUCTION

Pseudomonas aeruginosa and *Acinetobacter* spp. have been the cause of nosocomial outbreaks worldwide (Cortes *et al.*, 2009; Hosoglu *et al.*, 2011), including in Brazil (Brito *et*

al., 2003; Prates *et al.*, 2011), where multidrug resistance is common among these isolates (Rossi, 2011). Carbapenems often represent the only effective treatment. However, carbapenem-resistant isolates have frequently been detected, leading clinicians to resume the use of older classes of antibiotics, such as polymyxins (Giamarellou, 2010). The production of carbapenemase enzymes has been an important mechanism of resistance in these bacteria. Metallo- β -lactamases (MBLs), enzymes able to hydrolyze all β -lactam antibiotics with the exception of monobactams, are particularly common in *P.aeruginosa*, and the genes that encode them are carried by highly mobile elements that play an important role in hospital environments (Cornaglia, Giamarellou, and Rossolini, 2011).

Enterobacterial repetitive intergenic consensus-polymerase chain reaction (ERIC-PCR) has shown good applicability in typing *A.baumannii* and *P.aeruginosa* (Presterl *et al.*, 1997; Syrmis *et al.*, 2004; Kidd *et al.*, 2011). Although some studies have used ERIC-PCR to epidemiologically study *P.aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. nosocomial isolates in Brazil (Costa *et al.*, 2006; Saalfeld *et al.*, 2009; Stehling, Leite, and Silveira, 2010; Ferreira *et al.*, 2011; Viana *et al.*, 2011), the specific epidemiology of these microorganisms remains unknown.

The main objective of the present study was to describe the genetic relationship among *P.aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. clinical isolates using ERIC-PCR and report their resistance profiles against antimicrobial agents that are routinely used in a public university hospital in northwestern Paraná, Brazil.

MATERIAL AND METHODS

Seventy-five *P. aeruginosa* and 94 *Acinetobacter* spp. isolates from various clinical specimens from patients admitted to a public hospital in northwestern Paraná, Brazil, between January 2007 and July 2009 were studied. Only one isolate from each patient was selected and stored at -80°C in the Laboratory of Medical Bacteriology, Department of Clinical Analysis and Biomedicine, State University of Maringá. No personal data were retrieved from the patients, so privacy could be assured and legal transgressions concerning human research could be avoided (Resolution 196/96 Brazil National Health Council, Health Ministry). The present study was approved by the Regulatory Commission of Academic Activities and Voluntary Services of the studied hospital.

Phenotypic identification and antimicrobial susceptibility testing (AST) were performed using an AUTO-SCAN-4 automated system (Siemens Microscan, Deerfield, IL, USA), with the exception of polymyxin B for *P. aeruginosa*, which was tested by disk diffusion. The data were interpreted according to the criteria of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI; 2007-2009).

Ceftazidime-resistant *P. aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. isolates were evaluated for the presence of MBL using the disk-approximation test, 2-mercaptopropionic acid (2-MPA; Acros, Bridgewater, NJ, USA), and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA; Arakawa *et al.* 2000). IMP-1-producing *Acinetobacter baumannii* (A-3227) and *P. aeruginosa* ATCC 27853 were used as positive and negative controls, respectively.

Genomic DNA of *P. aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. isolates was extracted from overnight bacterial growth on Mueller-Hinton agar (Difco, Becton Dickinson, Sparks, MD, USA; Swanenburg *et al.*, 1998). The PCRs were performed using primers ERIC1R (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC-3') and ERIC2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3') as described by Szczuka and Kaznowski (2004). The gels were stained with ethidium bromide, and the spectral band analysis on agarose gels was performed using BioNumerics software (version 4.45, Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). The Dendrogram was constructed using the Dice coefficient, and the phylogenetic distance was determined using the Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean algorithm (Sneath and Sokal, 1973). Isolates with $\geq 95\%$ similarity were considered closely related.

RESULTS

The studied institution is a small-size public hospital with three intensive care units (ICUs): adult, pediatric, and neonatal. *P. aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. were isolated more frequently in male patients (62.7% and 59.6%, respectively), especially in patients older than 60 years (54.7% and 39.4%, respectively) and in ICUs (41.4% and 71.3%, respectively). *P. aeruginosa* isolates were detected at a higher frequency in urine samples, whereas *Acinetobacter* spp. isolates were mainly recovered from tracheal aspirate.

The resistance rate in *P. aeruginosa* isolates was less than 30% for most of the β -lactam antibiotics, and 54.6% were multiresistant (i.e., resistant to three or more antimicrobial classes; Magiorakos *et al.*, 2012). All of the isolates were polymyxin B-susceptible. For *Acinetobacter* spp. isolates, the β -lactam resistance rate was greater than 90% to cephalosporins and greater than 50% to the tested carbapenems (Table I). Multiresistance was observed in 91.5%. None of the *P. aeruginosa* ($n = 39$) and *Acinetobacter* spp. ($n = 88$) isolates with total or intermediate resistance to ceftazidime were positive for MBL.

Table I. Resistance profiles of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. isolates from inpatients in a public hospital in northwestern Paraná, Brazil.

Antimicrobial agent	Resistant isolates (%)	
	<i>P. aeruginosa</i> ($n = 75$)	<i>Acinetobacter</i> spp. ($n = 94$)
Aztreonam	13 (29.3) ^a	NT
Amikacin	30 (40.0)	53 (56.4)
Ampicillin/Sulbactam	NT	21 (27.6) ^b
Cefepime	22 (29.3)	87 (92.5)
Ceftazidime	21 (28.0)	85 (90.4)
Ciprofloxacin	37 (49.3)	88 (93.6)
Gentamicin	33 (44.0)	70 (74.5)
Imipenem	19 (25.4)	52 (54.8)
Meropenem	19 (25.4)	53 (56.4)
Piperacillin/Tazobactam	10 (13.3)	NT
Polymyxin B	0.0 (0.0)	NT
Trimethoprim/Sulfamethoxazole	NT	88 (93.6)

NT, not tested; ^aTested isolates = 46; ^bTested isolates = 76.

The ERIC-PCR applied to *P. aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. clinical isolates showed a banding pattern with sizes that range, from approximately 120 pb to 1200 pb and 120 pb and 1900 pb, respectively.

Considering a Dice correlation coefficient ≥ 0.95 , 72 ERIC-PCR patterns were obtained in 75 *P. aeruginosa* clinical isolates. Seventy isolates (93.3%) were orphans, and the remaining five (6.7%) were included in two clusters comprising two (cluster A) and three (cluster B) isolates (Fig. 1).

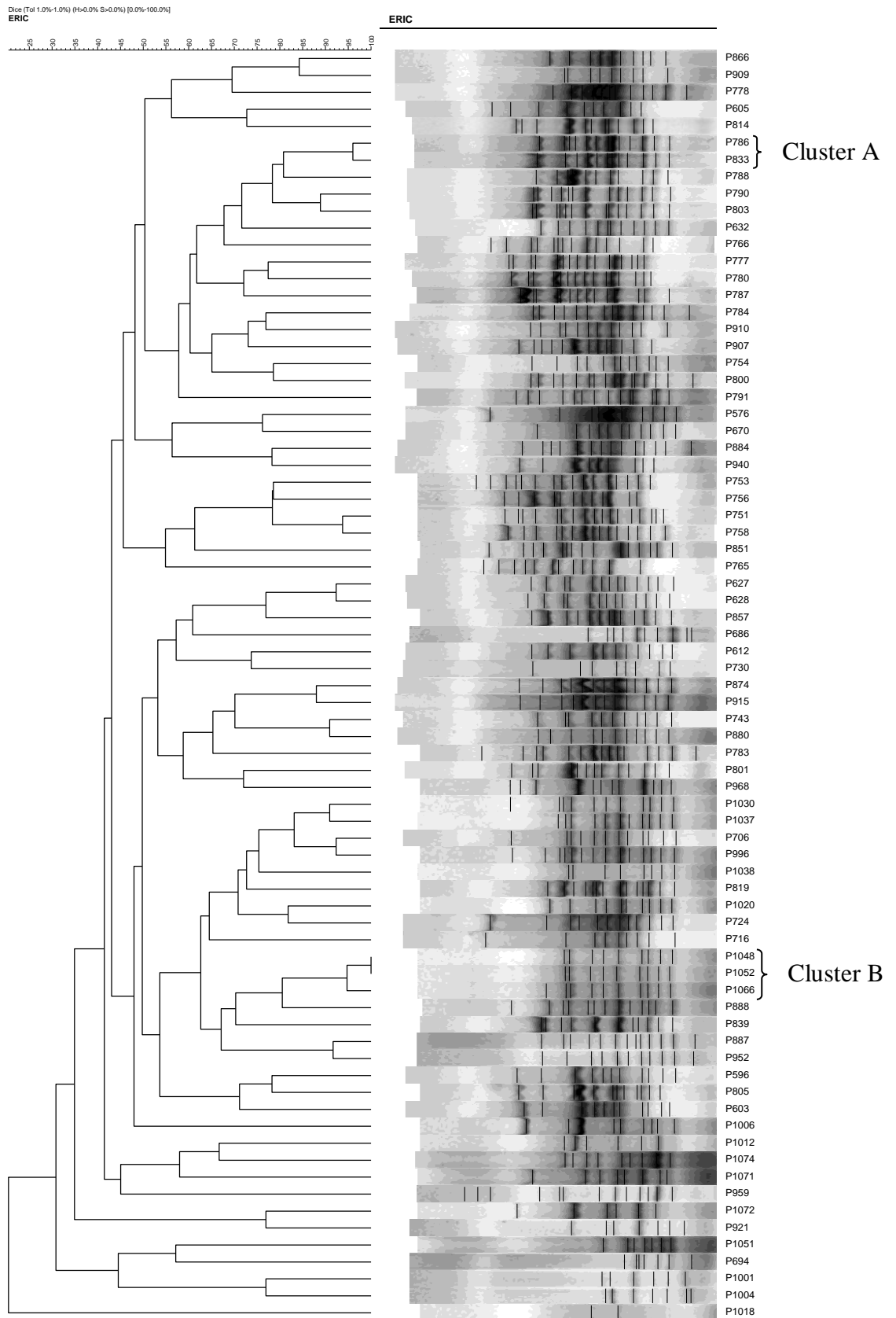


FIGURE 1. Dendrogram and DNA-banding profiles that represent the genetic relationship among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical specimens of inpatients in a public hospital in northwestern Paraná, Brazil.

Two isolates that belonged to cluster A showed identical antimicrobial resistance profiles and were isolated from patients in different clinical units within a time interval of approximately 2 months. Isolates that belonged to cluster B, two with 100% similarity, had equal resistance profiles and were isolated from patients in an adult ICU within a time interval of only 4 days. The third isolate that belonged to cluster B, despite having the same resistance profile, was isolated 13 days later in a patient admitted to the pediatric unit (Table II).

TABLE II. Demographics and phenotypic and genotypic features of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. isolates with similarity $\geq 95\%$.

Cluster	Microorganism (isolate)	Clinical Specimens	Date of Isolation	Hospital Ward	Antimicrobial Resistance Pattern
A	<i>P. aeruginosa</i> (786)	Urine	4 Mar 2008	Pediatrics	Susceptible to all tested antimicrobials
A	<i>P. aeruginosa</i> (833)	Tracheal aspirate	12 May 2008	Adult ICU	Susceptible to all tested antimicrobials
B	<i>P. aeruginosa</i> (1048)	Tracheal aspirate	12 Jun 2009	Adult ICU	Cip; Azt; Cef; Cfz
B	<i>P. aeruginosa</i> (1052)	Blood	8 Jun 2009	Adult ICU	Cip; Azt; Cef; Cfz
B	<i>P. aeruginosa</i> (1066)	Urine	25 Jun 2009	Medical clinic	Cip; Azt; Cef; Cfz
C	<i>Acinetobacter</i> spp. (885)	Urine	13 Jul 2008	Medical clinic	Amp/Sul; Cip; Sut; Cef; Cfz
C	<i>Acinetobacter</i> spp. (893)	Tracheal aspirate	14 Aug 2008	Adult ICU	Amp/Sul; Cip; Sut; Cef; Cfz; Gen; Ami
D	<i>Acinetobacter</i> spp. (1033)	Tracheal aspirate	14 May 2009	Pediatric ICU	Amp/Sul; Cip; Sut; Cef; Cfz; Gen; Ami; Imp; Mer
D	<i>Acinetobacter</i> spp. (1067)	Tracheal aspirate	24 Jun 2009	Adult ICU	Amp/Sul; Cip; Sut; Cef; Cfz; Gen; Ami; Imp; Mer
D	<i>Acinetobacter</i> spp. (1043)	Tracheal aspirate	25 May 2009	Adult ICU	Amp/Sul; Cip; Sut; Cef; Cfz; Gen; Ami; Imp; Mer
E	<i>Acinetobacter</i> spp. (1002)	Urine	4 Mar 2009	Adult ICU	Amp/Sul; Cip; Sut; Cef; Cfz; Gen; Ami; Imp; Mer
E	<i>Acinetobacter</i> spp. (1024)	Blood	23 Mar 2009	Medical clinic	Amp/Sul; Cip; Sut; Cef; Cfz; Gen; Ami; Imp; Mer
F	<i>Acinetobacter</i> spp. (900)	Tracheal aspirate	20 Aug 2008	Adult ICU	Cip; Sut; Cef; Cfz; Gen; Ami
F	<i>Acinetobacter</i> spp. (918)	Tracheal aspirate	24 Sep 2008	Adult ICU	Cip; Sut; Cef; Cfz; Gen; Ami
G	<i>Acinetobacter</i> spp. (573)	Urine	17 Feb 2007	Adult ICU	Amp/Sul; Cip; Sut; Cef; Cfz; Gen; Ami; Imp; Mer
G	<i>Acinetobacter</i> spp. (585)	Blood	15 Mar 2007	Adult ICU	Amp/Sul; Cip; Sut; Cef; Cfz; Gen; Imp; Mer
H	<i>Acinetobacter</i> spp. (559)	Surgical wound	29 Jan 2007	Adult ICU	Amp/Sul; Cip; Sut; Cef; Cfz; Gen; Ami; Imp; Mer
H	<i>Acinetobacter</i> spp. (564)	Tracheal aspirate	29 Jan 2007	Adult ICU	Amp/Sul; Cip; Sut; Cef; Cfz; Gen; Ami; Imp; Mer
H	<i>Acinetobacter</i> spp.(548)	Tracheal aspirate	3 Jan 2007	Adult ICU	Amp/Sul; Cip; Sut; Cef; Cfz; Gen; Ami; Imp; Mer
I	<i>Acinetobacter</i> spp. (611)	Tracheal aspirate	17 Apr 2007	Adult ICU	Cip; Sut; Cef; Cfz; Gen; Ami; Imp; Mer
I	<i>Acinetobacter</i> spp. (613)	Tracheal aspirate	26 Apr 2007	Adult ICU	Amp/Sul; Cip; Sut; Cef; Cfz; Gen; Imp; Mer
J	<i>Acinetobacter</i> spp. (554)	Tracheal aspirate	16 Jan 2007	Adult ICU	Cip; Sut; Cef; Cfz; Gen; Ami
J	<i>Acinetobacter</i> spp. (557)	Tracheal aspirate	4 Feb 2007	Pediatric ICU	Cip; Sut; Cef; Cfz; Gen; Ami
K	<i>Acinetobacter</i> spp. (566)	Tracheal aspirate	22 Jan 2007	Medical clinic	Cip; Sut; Cef; Cfz; Ami
K	<i>Acinetobacter</i> spp. (568)	Tracheal aspirate	15 Feb 2007	Adult ICU	Cip; Sut; Cef; Cfz; Gen; Ami
L	<i>Acinetobacter</i> spp. (610)	Tracheal aspirate	17 Apr 2007	Adult ICU	Amp/Sul; Cip; Sut; Cef; Cfz; Gen; Ami; Imp; Mer
L	<i>Acinetobacter</i> spp. (617)	Tracheal aspirate	11 May 2007	Adult ICU	Cip; Sut; Cef; Cfz; Gen; Ami

ICU,intensive care unit; Ami, amikacin; Amp/Sul,ampicillin/sulbactam;Azt, aztreonam; Cef, cefepime; Cfz, ceftazidime; Cip, ciprofloxacin; Gen, gentamicin; Imp, imipenem; Mer, meropenem;Sut,trimethoprim/sulfamethoxazole.

A total of 70 *Acinetobacter* spp. isolates (74.5%) showed orphan ERIC-PCR patterns, and the remaining 24 (25.5 %) were included in 10 clusters (C-L) comprising two isolates each, with the exception of clusters D and H with three isolates each (Fig. 2).

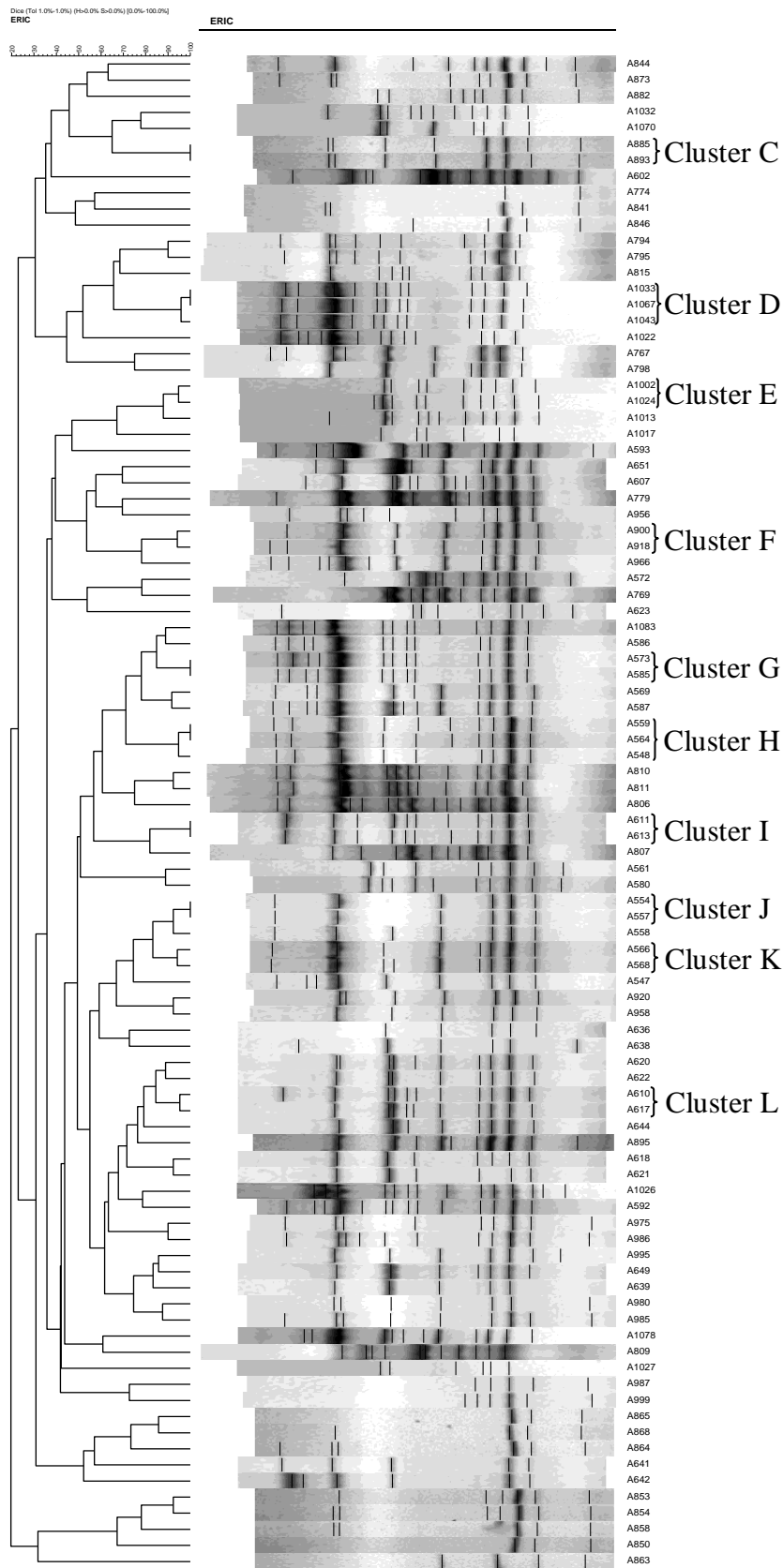


FIGURE 2. Dendrogram and DNA-banding profiles that represent the genetic relationship among *Acinetobacter* spp. isolated from clinical specimens of inpatients in a public hospital in northwestern Paraná, Brazil.

The several small clusters found in *Acinetobacter* spp. were generally detected in the same unit or units with displacement of patients, such as the adult ICU and medical clinic. Exceptions were observed in clusters D and J, which were composed of isolates from the adult and pediatric ICUs. *Acinetobacter* clusters included isolates with similar resistance profiles, with some differences related to aminoglycosides and carbapenems. Notably, 60% of the small clusters were carbapenems-resistant *Acinetobacter* spp. (Table II).

DISCUSSION

In the present study, the ERIC-PCR assessment and antimicrobial resistance profiles of *P. aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. isolates from inpatients in a small-size teaching hospital in northwestern Paraná showed a high percentage of multiresistance and genetic diversity. Worrying rates of ceftazidime and carbapenems resistance were observed in *P. aeruginosa* isolates. However, they were smaller than those observed in isolates from other university hospitals in Brazil, where resistance to these antimicrobials was near or greater than 50% (Zavascki, Cruz, and Goldani, 2004; Rocha *et al.*, 2008).

In recent years, MBL production has represented an important mechanism of resistance to most β -lactam antibiotics, including carbapenems, especially in *P. aeruginosa* (Kunz and Brook, 2010). However, despite a resistance rate of just over 25% detected for carbapenems, none of the *P. aeruginosa* isolates tested was positive for MBL, demonstrating the probable participation of other resistance mechanisms. The isolation rates of MBL-producing *P. aeruginosa* have widely varied among Brazilian hospitals, with incidences ranging from 3.1% (Wirth *et al.*, 2009) to 35% (Gonçalves *et al.*, 2009). According to Rossi (2011), São Paulo metallo- β -lactamase (SPM) is the most prevalent MBL in Brazilian isolates. For *Acinetobacter* spp. isolated in the present study, the observed resistance rates of > 90% for third-generation cephalosporins and nearly 55% for carbapenems may be responsible for the difficulty treating these cases, which has been reported in other studies (Towner, 2009; Kunz and Brook, 2010). MBL was not detected in isolates from this genus, which corroborates other studies that found a low contribution of this enzyme to the increasing rates of resistance in *Acinetobacter* spp. (Mostachio *et al.*, 2009; Kunz and Brook, 2010). OXA-type β -lactamases have shown an important role in carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. (Poirel, Naas, and Nordmann, 2010). In *Acinetobacter* spp. isolates from Brazilian hospitals,

carbapenem resistance is mostly related to β -lactamase OXA-23 (Gales *et al.*, 2012). However, a recent study found a high prevalence of OXA-143 in these bacterial genera (Mostachio *et al.*, 2012). Therefore, the small clusters of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. isolated in this study may have been OXA-type carbapenemase producers.

Although clonal spread is commonly found in hospitals worldwide (Scott and Pitt, 2004; Cortes *et al.*, 2009), including Brazil (Stueling, Leite, and Silveira, 2010), the present study detected high genetic diversity, especially among *P. aeruginosa* isolates. Only two (2.7%) of the 75 isolates showed identical ERIC-PCR patterns (100% similarity), and five (6.7%) had $\geq 95\%$ similarity. However, according to the phenotypic features and demographic conditions, the cross-spread of small clusters of *P. aeruginosa* and *Acinetobacter* spp., including carbapenem-resistant isolates, among patients in the hospital, was evident. Importantly, however, the findings of Saalfeld *et al.* (2009) should be considered, in which high genetic similarity was found among clinical and environmental *Acinetobacter* spp. isolates in an adult ICU in the same hospital from January to July 2008. These authors suggested that an endemic situation existed by observing the genotypic similarity of isolates using a Dice correlation coefficient $> 90\%$.

CONCLUSION

Using ERIC-PCR, the present study found high genetic diversity among *P. aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. isolates, suggesting that cross-contamination is not very frequent in the studied hospital. Because of the known applicability of ERIC-PCR, its good discriminatory power and reproducibility allowed an understanding of the epidemiology of these bacteria in the studied hospital environment.

ACKNOWLEDGEMENTS

The present research received financial support from Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)/Pan-American Health Organization (PAHO).

REFERENCES

- ARAKAWA, Y.; SHIBATA, N.; SHIBAYAMA, K.; KUROKAWA, H.; YAGI, T.; FUJIWARA, H.; GOTO, M. Convenient test for screening metallo-beta-lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. *J. Clin. Microbiol.*, v.38, n.1, p.40-43, 2000.
- BRITO, D.V.D.; OLIVEIRA, E.J.; DARINI, A.L.C.; ABDALLAH, V.O.S.; GONTIJO-FILHO, P.P. Nosocomial outbreaks due to *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in a neonatal intensive care unit (nICU) of the Uberlândia federal university hospital. *Braz. J. Microbiol.*, v.34, suppl.1, p.27-28, 2003.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. Wayne, 2007. 177 p. (M100-S-17 Seventeenth Informational Supplement).
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. Wayne, 2008. 181 p. (M100-S-18 Eighteenth Informational Supplement).
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. Wayne, 2009. 149 p. (M100-S-19 Nineteenth Informational Supplement).
- CORTES, J.A.; CUERVO, S.I.; URDANETA, A.M.; POTDEVIN, G.; ARROYO, P.; BERMÚDEZ, D.; CORREA, A.; VILLEGAS, M.V. Identifying and Controlling a Multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* Outbreak in a Latin-American Cancer Centre and Its Associated Risk Factors. *Braz. J. Infect. Dis.*, v.13, n.2, p.99-103, 2009.
- COSTA, G.F.M.; TOGNIM, M.C.B.; CARDOSO, C.L.; CARRARA-MARRONE, F.E.; GARCIA, L.B. Preliminary evaluation of adherence on abiotic and cellular surfaces of *Acinetobacter baumannii* strains isolated from catheter tips. *Braz. J. Infect. Dis.*, v.10, n.6, p.346-351, 2006.
- CORNAGLIA, G.; GIAMARELLOU, H.; ROSSOLINI, G.M. Metallo- β -lactamases: a last frontier for β -lactams? *Lancet Infect. Dis.*, v.11, n.5, p.381-393, 2011.
- FERREIRA, A.E.; MARCHETTI, D.P.; CUNHA, G.R.; OLIVEIRA, L.M.; FUENTEFRIA, D.B.; DALL BELLO, A.G.; BARTH, A.L.; CORÇÃO, G. Molecular characterization of clinical multiresistant isolates of *Acinetobacter* sp. From hospitals in Porto Alegre, State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.44, n.6, p.725-730, 2011.
- GALES, A.C.; CASTANHEIRA, M.; JONES, R.N.; SADER, H.S. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). *Diagn Microbiol Infect Dis.*, v.3, n.4, p.354-360, 2012.
- GIAMARELLOU, H. Multidrug-resistant Gram-negative bacteria: how to treat and for how long. *Int. J. Antimicrob. Agents*, v.36, suppl 1, p.S50-S54, 2010.

GONÇALVES, D.C.P.S.; LIMA, A.B.M.; LEÃO, L.S.N.O.; CARMO FILHO, J.R.; PIMENTA, F.C.; VIEIRA, J.D.G. Detecção de metalo-beta-lactamase em *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de pacientes hospitalizados em Goiânia, Estado de Goiás. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.42, n.4, p.411-414, 2009.

HOSOGLU, S.; HASCUHADAR, M.; YASAR, E.; USLU, S.; ALDUDAK, B. Control of an *Acinetobacter baumannii* outbreak in a neonatal ICU without suspension of service: a devastating outbreak in Diyarbakir, Turkey. *Infection*. Publicação on line, DOI 10.1007/s15010-011-0180-y, 2011.

KIDD, T.J.; GRIMWOOD, K.; RAMSAY, K.A.; RAINEY, P.B.; BELL, S.C. Comparison of three molecular techniques for typing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in sputum samples from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.*, v.49, n.1, p.263-268, 2011.

KUNZ, A.N.; BROOK, I. Emerging Resistant Gram-Negative Aerobic Bacilli in Hospital-Acquired Infections. *Chemotherapy*, v.56, n.6, p.492-500, 2010.

MAGIORAKOS, A.P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R.B.; CARMELI, Y.; FALAGAS, M.E.; GISKE, C.G.; HARBARTH, S.; HINDLER, J.F.; KAHLMETER, G.; OLSSON-LILJEQUIST, B.; PATERSON, D.L.; RICE, L.B.; STELLING, J.; STRUELENS, M.J.; VATOPOULOS, A.; WEBER, J.T.; MONNET, D.L. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin.Microbiol.Infect.*, v.18, n.3, p.268-281, 2012.

MOSTACHIO, A.K.; HEIDJEN, I.; ROSSI, F.; LEVIN, A.S.; COSTA, S.F. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding oxacillinases and metallo-b-lactamases in carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. *J. Med. Microbiol.*, v.58, n.11, p.1522-1524, 2009.

MOSTACHIO, A.K.; LEVIN, A.S.; RIZEK, C.; ROSSI, F.; ZERBINI, J.; COSTA, S.F. High prevalence of OXA-143 and alteration of outer membrane proteins in carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. isolates in Brazil. *Int. J. Antimicrobial. Agents*, v.39, n.5, p.396-401, 2012.

POIREL, L.; NAAS, T.; NORDMANN, P. Diversity, Epidemiology, and Genetics of Class D β -Lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.54, n.1, p.24-38, 2010.

PRESTERL, E.; NADRCHAL, R.; MAKRISTATHIS, A.; KOLLER, W.; ROTTER, M.L.; HIRSCHL, A.M. Molecular typing of *Acinetobacter baumannii* from ten different intensive care units of a university hospital. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, v.16, n.10, p.740-743, 1997.

PRATES, C.G.; MARTINS, A.F.; SUPERTI, S.V.; LOPES, F.S.; RAMOS, F.; CANTARELLI, V.V.; ZAVASCKI, A.P. Risk factors for 30-day mortality in patients with carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* during an outbreak in an intensive care unit. *Epidemiology and Infection*, v.139, n.3, p.411-418, 2011.

ROCHA, L.A.; VILELA, C.A.P.; CEZÁRIO, R.C.; ALMEIDA, A.B.; GONTIJO-FILHO, P. Ventilator-Associated Pneumonia in an Adult Clinical-Surgical Intensive Care Unit of a Brazilian University Hospital: Incidence, Risk Factors, Etiology, and Antibiotic Resistance. *Braz. J. Infect. Dis.*, v.12, n.1, p.80-85, 2008.

ROSSI, F. The Challenges of antimicrobial resistance in Brazil. *Clin. Infect. Dis.*, v.52, n.9, p.1138-1143, 2011.

SAALFELD, S.M.; VIANA, G.F.; SIQUEIRA, V.L.D.; CARDOSO, C.L.; GARCIA, L.B.; TOGNIM, M.C.B. Endemic carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a Brazilian intensive care unit. *J Hosp Infect.*, v.72, n.4, p.365-368, 2009.

SCOTT, F.W., PITT, T. Identification and characterization of transmissible *Pseudomonas aeruginosa* strains in cystic fibrosis patients in England and Wales. *J Med Microbiol.*, v.53, n.7, p.609-615, 2004.

SNEATH, P.H.A., SOKAL, R.R. *Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification*. San Francisco: Freeman, 1973. 573 p.

STEHLING, E.G.; LEITE, D.S.; SILVEIRA, W.D. Molecular typing and biological characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cystic fibrosis patients in Brazil. *Braz. J. Infect. Dis.*, v.14, n.5, p.462-467, 2010.

SYRMIS, M.W.; O'CARROLL, M.R.; SLOOTS, T.P.; COULTER, C.; WAINWRIGHT, C.E.; BELL, S.C.; NISSEN, M. Rapid genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* isolates harboured by adult and paediatric patients with cystic fibrosis using repetitive-element-based PCR assay. *J. Med. Microbiol.*, v.53, n.11, p.1089-1096, 2004.

SWANENBURG, M.; URLINGS, H.A.P.; KEUZENKAMP, D.A.; SNIJDERS, J.M.A. Validation of ERIC PCR as a tool in epidemiologic research of *Salmonella* in slaughter pigs. *J. Ind. Microbiol Biotechnol.*, v.21, p.141-144, 1998.

SZCUKA, E.; KAZNOWSKI, A. Typing of Clinical and Environmental *Aeromonas* sp. Strains by Random Amplified Polymorphic DNA PCR, Repetitive Extragenic Palindromic PCR, and Enterobacterial repetitive intergenic Consensus Sequence PCR. *J Clin Microbiol.*, v.42, n.1, p.220-228, 2004.

TOWNER, K.J. *Acinetobacter*: an old friend, but a new enemy. *J. Hosp. Infect.*, v.73, p.355-363, 2009.

VIANA, G.F.; DOS SANTOS SAAFELD, S.M.; GARCIA, L.B.; CARDOSO, C.L.; PELISSON, M.; TOGNIM, M.C. Evolution of antimicrobial resistance of *Acinetobacter baumannii* in a university hospital. *Lett. Appl. Microbiol.*, v.53, n.3, p.374-378, 2011.

ZAVASCKI, A.P.; CRUZ, R.P.; GOLDANI, L.Z. High Rate of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* at a Tertiary-Care Teaching Hospital in Southern Brazil. *Infect Control Hosp Epidemiol.*, v.25, n.10, p.805-807, 2004.

WIRTH, F.W.; PICOLI, S.U.; CANTARELLI, V.V.; GONÇALVES, A.L.S.; BRUST, F.R.; SANTOS, L.M.O.; BARRETO, M.F. Metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in two hospitals from Southern Brazil. *Braz. J. Infect. Dis.*, v.13, n.3, p.170-172, 2009.

Received for publication on 09th April 2012

Accepted for publication on 02nd November 2012

Artigo 2: Structural changes and differentially expressed genes in *Pseudomonas aeruginosa* exposed to meropenem and ciprofloxacin combination

**Structural changes and differentially expressed genes in *Pseudomonas aeruginosa*
exposed to meropenem and ciprofloxacin combination**

**Running Head: Synergistic effect of meropenem and ciprofloxacin on *Pseudomonas
aeruginosa***

Vera Lucia Dias Siqueira^{1,2}, Rosilene Fressatti Cardoso², Katiany Rizzieri Caleffi-Ferracioli²,
Regiane Bertin de Lima Scodro², Maria Aparecida Fernandez³, Adriana Fiorini², Tania Ueda-
Nakamura¹, Benedito Prado Dias-Filho¹, Celso Vataru Nakamura¹

¹Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, State University of Maringa, ²Department
of Clinical Analysis and Biomedicine, State University of Maringa, ³Department of Cellular
Biology and Genetics, State University of Maringa, Av Colombo, 5790, 87020-900, Maringá,
Paraná, Brazil.

Keywords: Antimicrobial combination, Electron microscopy, Expression gene.

***Corresponding author. Mailing Address:** Laboratory of Technological Innovation in the
Development of Drugs and Cosmetics, State University of Maringa, *Phone:* +55 (44) 3011-
5012, *Fax:* +55 (44) 3011-5046. *E-mail:* cvnakamura@uem.br.

Abstract

Objectives: The present study identified an *in vitro* synergistic effect of a meropenem and ciprofloxacin combination (MCC) on cell structure and gene expression in multidrug resistant (MDR) *Pseudomonas aeruginosa*.

Methods: The effect of the MCC on the susceptibility of MDR *P. aeruginosa* isolates was determined using checkerboard and time-kill curve techniques. Differential gene expression and structural changes that resulted from the synergistic action of the MCC against one of the MDR *P. aeruginosa* clinical isolates (1071-MRPA) were evaluated using Representational Difference Analysis (RDA) and scanning and transmission electron microscopy, respectively. The expression of differentially expressed, SOS response-associated, and resistance-associated genes in 1071-MRPA exposed to meropenem, ciprofloxacin, and the MCC was monitored by quantitative PCR.

Results: The MCC was synergistic against 25% and 40.6% of MDR *P. aeruginosa* clinical isolates, indicated by the checkerboard analysis and time-kill curves, respectively. The morphological and structural changes that resulted from the synergistic action of the MCC on 1071-MRPA were a summation of the effects observed with each antimicrobial alone. One exception included outer membrane vesicles (OMVs), which are normally related to the bacterial SOS response and cytotoxic effects. These OMVs were in greater amount in 1071-MRPA exposed to ciprofloxacin and significantly inhibited in 1071-MRPA exposed to the MCC. Cell-wall and DNA repair-associated genes were differentially expressed in 1071-MRPA exposed to meropenem, ciprofloxacin, and the MCC. However, some of the RDA-detected, resistance-associated, and SOS response-associated genes were expressed at significantly lower levels in 1071-MRPA exposed to the MCC.

Conclusion: The MCC may be an alternative for the treatment of infections caused by MDR *P. aeruginosa*. The effect of this antimicrobial combination may be not only the result of a summation of the effects of meropenem and ciprofloxacin but also a result of differential action that likely affects protective mechanisms in the bacteria.

Introduction

Pseudomonas aeruginosa is a highly successful opportunistic pathogen that displays intrinsic multidrug resistance and has a great ability to acquire further resistance mechanisms.¹ Limited classes of antibiotics can be used for the treatment of *P. aeruginosa* infection.² The emergence of multidrug-resistant (MDR) *P. aeruginosa* (MRPA) has prompted the search for new agents or alternative therapeutics,^{1,3,4} including antimicrobial combinations.⁵⁻⁸

Synergistic interactions between drugs have been investigated to improve therapeutic results, decrease the potential toxicity of antimicrobial agents, and prevent the emergence of bacterial resistance.^{5,9,10} Antimicrobial combinations have been suggested for the empirical treatment of nosocomial infections caused by *P. aeruginosa*.¹¹⁻¹³ Several studies have evaluated the effects of a meropenem and ciprofloxacin combination (MCC) in *P. aeruginosa*,¹⁴⁻¹⁶ including MDR isolates.^{7,17} Despite some differences in the results, likely attributable to technical and bacterial isolates variations, the MCC represents a promising antipseudomonal therapeutic option.¹⁴⁻¹⁶ Although β -lactams and fluoroquinolones represent classic antimicrobials with previously known mechanisms of action, the molecular basis of synergism between these classes of drugs has not yet been elucidated.

Several molecular biological methodologies have been used to understand the mechanism of the antimicrobial activity of compounds. Techniques have been developed to assess the differential expression of genes in an organism or cell.¹⁸⁻²⁰ Some of these are important tools to detect changes in the expression of messenger RNA without any prior knowledge of the genes in question.²¹ The Representational Difference Analysis (RDA) technique, first described by Lisitsyn et al.²² in a study with whole genomes, is based on the detection of specific DNA fragments that are present in one population but absent in another

by subtractive hybridization and kinetic enrichment. cDNA-RDA is a cDNA-specific modification of this PCR-based subtractive hybridization technique, commonly used to detect differentially expressed genes.^{20,21} Furthermore, exponential enrichment by PCR in cDNA-RDA allows the detection of rare transcripts.²³

Transmission and scanning electron microscopy (TEM and SEM, respectively) have become important tools for assessing the ultrastructure of bacteria and can be used to elucidate cellular targets involved in bacterial and antibacterial interactions.²⁴⁻²⁶ Thus, because of high rates of resistance observed in Brazilian *P. aeruginosa* isolates²⁷ and consequent possibility of using antimicrobial combination therapy,²⁸ the present study sought to identify bacterial cell structure changes and differential transcripts in MDR *P. aeruginosa* exposed to the MCC, selected among genetically distinct, MDR clinical isolates from a Brazilian university hospital.

Material and methods

Bacterial strains

A total of 32 genetically distinct MDR *P. aeruginosa* isolates and *P. aeruginosa* isolates resistant to at least one of the two antimicrobials studied (meropenem and ciprofloxacin) were tested. The isolates were selected after screening 75 *P. aeruginosa* isolates from several biological sources from patients admitted to a university hospital in northwestern Paraná, Brazil, from January 2007 to July 2009. The resistance profiles and genetic relationships were previously determined.²⁹ The selected isolates were stored in Tryptic Soy Broth (TSB; Difco Laboratories, Sparks, MD, USA) with 15% glycerol at -80°C. *P. aeruginosa* ATCC 27853 was used as a control for antimicrobial activity and the synergism tests.

Determination of MIC

The MICs of meropenem (lot no. 09405C-1; AstraZeneca, Cotia, Brazil) and ciprofloxacin (lot no. 0001396108, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) were determined by microdilution using cation-adjusted Mueller Hinton Broth (CAMHB; Difco) according to the CLSI,³⁰ and categorical susceptibility was based on CLSI breakpoints.³¹ All of the determinations were performed in triplicate.

Checkerboard assay

The MCCs were assessed in microtiter plate checkerboard assays with CAMHB.³² Both drugs were tested alone and combined at concentrations up to four times higher and lower than the MICs of the drugs tested alone. The final inoculum concentration of the *P. aeruginosa* isolates tested was approximately 5.0×10^5 cfu/mL, and the plates were incubated at 35°C for 18 h. The tests were performed in triplicate. Fractional inhibitory concentrations indices (FICIs) were calculated. Synergy was defined as $FICI \leq 0.5$, no interaction was defined as $FICI > 0.5$ and ≤ 4 , and antagonism was defined as $FICI > 4$.³³

Time-kill curve assay

Time-kill curve assays for all of the *P. aeruginosa* isolates were performed in CAMHB. Meropenem, ciprofloxacin, and the MCC were tested at concentrations of 0.5× and 0.25× the MIC for each isolate. All of the assays included a growth control with no antimicrobial. The final inoculum used was 10^5 cfu/mL. The antimicrobial and growth control tubes were continuously shaken on an orbital incubator at 35°C. Aliquots (0.1 mL) were removed at 0, 3, 6, 9, 12, and 24 h and serially diluted in sterile saline to avoid antibiotic carryover. Afterward, 20 µL of each dilution was immediately inoculated in Tryptic Soy Agar (TSA; Difco) in triplicate. The plates were incubated at 35°C for 18 to 24 h, colony counts were

performed and the lowest limit of detection was 50 cfu/mL. All of the time-kill assays were performed in duplicate. *P. aeruginosa* ATCC 27853 (susceptible to meropenem and ciprofloxacin) was tested as a control strain. Data from at least two independent experiments were averaged and plotted as \log_{10} cfu/mL vs. time (h) for each time point over 24 h. Synergism was defined as a reduction $\geq 10^2$ cfu/mL with the MCC compared with the most active single antibiotic at 24 h, with the number of surviving organisms in the presence of the combination being $\geq 2\text{-log}_{10}$ cfu/mL below the starting inoculum.³² Bactericidal activity was defined as a reduction $\geq 3\text{-log}_{10}$ cfu/mL in the colony count from the starting inoculum at 24 h.⁸

Scanning and transmission electron microscopy

A clinical isolate (1071-MRPA) for which the MCC showed a synergistic action was selected for the evaluation of morphological and structural changes. The 1071-MRPA cells were exposed to 0.5 \times the MIC of meropenem, ciprofloxacin, and the MCC for 3 and 12 h and fixed for at least 2 h with 2.5% glutaraldehyde (Sigma) in 0.1 M cacodylate buffer (Electron Microscopy Science, Hatfield, PA, USA) at 4°C. Subcultures on TSA were made to ensure that no contaminating organisms were present. Prior to subculture, dilutions were performed to avoid antibiotic carryover. The electron microscopy experiments were performed in duplicate on different days. For SEM, the treated cells were placed on a glass support with poly-L-lysine (Sigma), dehydrated in graded ethanol, critical-point-dried in CO₂, coated with gold, and observed in a Shimadzu SS-550 (Kyoto, Japan) scanning electron microscope. An average of 30-50 microscopic fields in each sample were selected by random scanning and photographed. For TEM, fixed cells in glutaraldehyde were postfixated for 2 h at room temperature in 2.0% osmium tetroxide (EMS) plus 2.0% potassium ferrocyanide (Merck, Darmstadt, Germany), dehydrated in acetone, and embedded in EMbed resin (EMS). Ultrathin 60 nm sections were

then prepared, stained with uranyl acetate (EMS) and lead citrate (EMS), and observed in a JEM-1400 (JEOL, Tokyo, Japan) microscope that operated at 80 kV. An average of 200 fields was photographed. Two thousand cells were evaluated for the MCC and single antimicrobial tests at different times, and only cellular changes that were repeated in at least 70% of the observed images were considered.

RNA isolation and cDNA synthesis

Overnight TSA (Difco) growth of 1071-MRPA was transferred to four vials that contained CAMHB (Difco) and incubated at 35°C to obtain growth with an optical density at 600 nm (OD_{600}) of 0.4. Meropenem, ciprofloxacin, and the MCC were separately added at a final concentration of 16 mg/L (corresponding to 0.5× MIC). These antimicrobial vials were referred to as TESTERS (T1, T2, and T3, respectively). A vial without antimicrobial was used as a control and referred to as DRIVER (D). Sixty minutes after the addition of the antimicrobials, treated and control bacterial cells were harvested at 4,700 rpm for 10 min and washed twice with RNase-free ultrapure water. Total RNA was extracted from 1071-MRPA cells for each experimental condition (T1, T2, T3, and D) using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Quantification/purity and quality assessments were performed with a Qubit2.0 fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and on 1% agarose gels, respectively. Contaminating DNA was removed by treatment with RNase-free DNase I (Invitrogen) and subjected to conventional PCR to ensure that all DNA was removed as assessed by agarose gel. First-strand cDNA synthesis was performed with RT Superscript III (Invitrogen) using 1 µg of DNase-treated total RNA, 0.8 µM oligodT primer (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA), and 0.8 µM Random Primer (Invitrogen). Sequentially, the second strand was synthesized using Random Primer and

Platinum *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions.

cDNA RDA

Approximately 1 µg of T1, T2, T3, and D cDNAs was digested with *Sau3AI* (Promega, Madison, WI, USA), and the RDAs for meropenem (RDA1), ciprofloxacin (RDA2), and MCC (RDA3) were performed according to Leite et al.,³⁴ with modification, in rounds of subtractions and amplifications. Three *tester-driver* hybridizations (1:10, 1:20, and 1:10 ratios) were performed consecutively for each RDA condition. A reverse cDNA-RNA experiment was performed as a control under the same conditions described above, in which the TESTER cultures were not exposed to the MCC, and the DRIVER cultures were exposed to MCC. The final RDA products were purified using QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen), cloned into pGEM-T-Easy vector (Promega), and transformed into *Escherichia coli* DH5- α -competent cells. Plasmidial DNA was extracted as previously described.³⁵ Sequencing was performed with universal M13 primers (Promega) and standard fluorescence-labeling dye-terminator protocols. The samples were loaded onto a MegaBACE 1000 DNA sequencer (GE Healthcare Life Science, Piscataway, NJ, USA) for automated analysis. Expressed sequence tags (ESTs) were analyzed using the Phred, Crossmatch, and CAP3 (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>) programs. Sequences with at least 100 nucleotides and Phred quality ≥ 20 were considered for further analysis. The ESTs were grouped in clusters, represented by contigs and singlets. The screened sequences were compared against the GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) non-redundant (nr) database from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) using the BLASTX algorithm³⁶ with an E-value cut-off at 10^{-5} .

Quantitative PCR

To confirm and quantify the relative transcript levels of the selected RDA products, quantitative PCR (qPCR) was performed from T1, T2, T3, and D cDNA using StepOnePlus real-time PCR systems (version 2, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Transcripts detected by RDA1, 2, and 3 with redundancy superior to 10 were tested, including three genes related to meropenem or ciprofloxacin resistance and one gene related to the SOS response (*lexA* gene). The primers were designed using Primer Express software (version 3.0, Applied Biosystems), with the exception of the resistance and *lexA* genes (Table 1). The primer concentrations were adjusted to provide amplification efficiencies of approximately 90-110% for all of the experiments. Polymerase chain reaction was performed using SYBR Select Master Mix (Applied Biosystems) with 1 μ L of cDNA and 400 nM of each primer in a total volume of 10 μ L. Polymerase chain reaction thermal cycling was performed at 95°C for 10 min and 40 cycles at 95°C for 15 s, 60°C for 20 s, and 72°C for 20 s. A melting curve analysis was performed to confirm a single PCR product. The cycle threshold (C_t) values for the triplicate PCRs and duplicate biological for each cDNA sample were averaged, and then $2^{-\Delta\Delta CT}$ values were calculated.³⁷ A negative control was also included that contained all of the reagents except cDNA. The *rpsL* gene was used to normalize all of the reactions. The *P. aeruginosa* antimicrobial growth-free cDNA DRIVER (D) was used as a reference sample. The genes were considered up- or downregulated when the amounts of the transcripts were at least two-times higher or lower than those present in the reference sample (D).

Data analysis

Group comparisons (meropenem, ciprofloxacin, and the MCC by qPCR and transmission electron microscopy) were made using one-way analysis of variance ANOVA with SAS 9.0

software (SAS OnlineDoc 9, SAS Institute, Cary, NC), followed by the Tukey *post hoc t*-test. Values of $p < 0.01$ were considered statistically significant.

Results

Clinical isolates susceptibility and combination assays

All of the *P. aeruginosa* were MDR and isolated from several biological sources from patients admitted in different hospital units (Table 2). The MIC₅₀ and MIC₉₀ of meropenem and ciprofloxacin for *P. aeruginosa* were 4 and 32 mg/L and 32 and 64 mg/L, respectively. Seventeen of the 32 isolates (53.1%) were resistant to ciprofloxacin. Five of the isolates (15.6%) were resistant to meropenem, and 10 of the isolates (31.3%) were resistant to both (Table 3).

The checkerboard titrations yielded a synergistic FICI (≤ 0.5) for eight (25.0%) of the isolates tested. For the remainder of the isolates, the antimicrobial combination displayed no interaction (Table 3).

In all of the kill-curve assays, the viable counts in the control with and without the antimicrobial agents tested at 0 h were close to the initial inoculum, thus ensuring that an antimicrobial carry-over effect was avoided. The results of the time-kill assays showed a ≥ 2 -log₁₀ decrease in viable counts for the MCC at 0.5× MIC, regardless of the time of bacterial growth, in 31 (96.9%) of the isolates. This decrease was more apparent with 12 h exposure (87.5% of the isolates). However, synergism as previously defined³² was observed in 13 (40.6%) of the isolates tested (Table 3). With combinations of 0.25× MIC + 0.5× MIC for each antimicrobial and 0.25× MIC for both antimicrobials, a ≥ 2 -log₁₀ reduction of viable counts was observed in 10 (31.3%) of the isolates between 6 and 12 h and in one isolate at 24

h of exposure (data not shown). Bactericidal activity was observed in only four (12.5%) of the isolates with the MCC at 0.5× MIC (Table 3).

Representative time-kill curves for ATCC strain and MDR clinical isolates the using 0.5× MIC of the MCC are illustrated in Figure 1a and b, respectively. The time-kill curve of the ATCC strain showed a $\geq 2\text{-log}_{10}$ reduction of viable counts between 12 and 24 h of exposure (Figure 1). No reduction $\geq 2\text{-log}_{10}$ cfu/mL below the starting inoculum was observed with 0.25× MIC against the clinical isolates or 0.25× and 0.5× MIC against the ATCC strain (data not shown), indicating no synergism.

Morphological and structural changes

Because of the favorable results from the time-kill curves and checkerboard assay, one MDR *P. aeruginosa* clinical isolate (1071-MRPA) was selected for electron microscopy assays after exposure to 0.5× MIC of meropenem, ciprofloxacin, and the MCC at 3 h (i.e., the start of the decrease in viable counts) and 12 h (i.e., the time with a greater decrease in viable counts). Scanning electron microscopy indicated that the effect of ciprofloxacin on cell morphology was less evident compared with cells treated with meropenem. Rounding and a wrinkled appearance were observed in 1071-MRPA cells exposed to meropenem (Figure 2b and f) and ciprofloxacin (Figure 2c and g), respectively, mainly at 12 h of antimicrobial exposure. The changes caused by the MCC were observed mainly at 12 h of treatment and appeared to be a summation of the observed changes in 1071-MRPA caused by meropenem and ciprofloxacin exposure (i.e., rounding and cell wrinkling; Figure 2d and h). Structures similar to outer membrane vesicles (OMVs) were observed in a higher number in 1071-MRPA cells exposed to ciprofloxacin at 3 h (Figure 2c, inset).

Transmission electron microscopy was used to observe and quantify changes inside and on the wall of 1071-MRPA cells treated with meropenem, ciprofloxacin, and the MCC.

Rounding cells and cell wall disintegration were observed in meropenem-exposed cells (Table 4, Figure 3b and f). A low electron density of areas without content was observed in ciprofloxacin-treated cells (Table 4, Figure 3c and g). Changes in MCC-treated cells were a summation of the effects (cellular rounding and areas without content) observed with each antimicrobial alone (Table 4, Figure 3d and h). Cellular changes were observed mainly at 12 h with the different treatments. Outer membrane vesicles were observed in 1071-MRPA cells subjected to the three different treatments, but a significantly greater number of OMVs was observed in ciprofloxacin-treated cells at 3 h (Table 4, Figure 3c and inset). A significant decrease in OMVs amount was observed in MCC-exposed cells at 3 and 12 h (Table 4, Figure 3d and h).

Differentially expressed genes

After three rounds of subtractive cDNA RDA hybridization, several DNA fragments were detected that indicated differential expression. A total of 91, 86, and 89 clones were successfully sequenced, and the RDA1 (meropenem exposure), RDA2 (ciprofloxacin exposure), and RDA3 (MCC exposure) Phred and CAP3 results are summarized in Table 5. The most redundant contigs were matched with serine acetyltransferase and OprF in RDA1, cell wall hydrolase and alanine racemase in RDA2, and alanine racemase plus a hypothetical protein in RDA3 (Table 5). The singlets formed from ESTs of the different RDAs did not match with the databases and were not considered for further studies. In the reverse-RDA experiment, a total of 38 clones were sequenced. The transcriptional profile did not display any similarity with the one previously observed in the cDNA RDA of *P. aeruginosa* exposed to antimicrobials (data not shown).

Gene expression quantification

From the differentially detected transcripts in RDA1, RDA2, and RDA3, eight with redundancy higher than 10 were quantified. The genes that encoded OprF and a hypothetical protein were the most induced (4.961- and 2.112-fold, respectively) in the presence of meropenem. Alanine racemase (2.106-fold) was the most induced by ciprofloxacin exposure. Significantly lower expression was observed for most of the differentially expressed genes in MCC-treated 1071-MRPA (Figure 4) compared with meropenem and ciprofloxacin exposure alone. Of the genes related to antimicrobial resistance, no significant difference in *mexA* expression was observed with the three treatments. However, *ampC* and *oprD* were upregulated when exposed to meropenem and significantly less expressed with MCC exposure (Figure 4). The same was observed with the SOS response repressor gene *lexA*.

Discussion

The use of antimicrobial combinations has been a strategy to clinically control MDR *P. aeruginosa* infection³⁸ and suppress the amplification of resistant subpopulations.⁹ However, the mechanism of action of the compounds in combination has been little investigated.

In the present study, important synergism of the MCC against MDR *P. aeruginosa* clinical isolates was observed, mainly reflected by the time-kill curves. Some studies investigated this combination for the treatment of *P. aeruginosa* infection. However, comparisons of these results are hampered because of methodological differences, with differences in the percentages of synergism of 74.5% in the United States,¹⁶ 22.0% and 61.0% in Turkey,¹⁴ and 8.0% in Greece.³⁹ Also, no synergism of the MCC was observed with American⁴⁰ and Italian isolates.⁴¹ The checkerboard and time-kill curve assays used in the

present study were justified because the best technique for assessing synergism in bacteria is unclear.^{42,43} A low correlation was found between the checkerboard and time-kill curve results in the present study. The correlation between the MIC and synergism results was inconclusive. The MCC time-kill curve assay showed synergism mainly in isolates resistant to ciprofloxacin, whereas checkerboard synergism was more evident among isolates that were resistant to both antimicrobials. In the present study, some isolates with MIC values higher than the maximum serum level for ciprofloxacin⁴⁴ or meropenem⁴⁵ were tested in the time-kill curve assay to evaluate the *in vitro* effect of the MCC against highly resistant isolates. Of the three isolates with a ciprofloxacin MIC = 512 mg/L, one showed synergism (indicated by the time-kill curve and checkerboard results) with bactericidal activity of the MCC at 0.5× MIC; with the other two, although not synergistic, the MCC reduced the viable cell count at 24 h.

For electron microscopy and cDNA-RDA studies, the clinical isolate 1071-MRPA was selected based on the MCC synergism detected by the time-kill curve and checkerboard assays. Transmission electron microscopy, SEM, and cDNA RDA were used to determine morphological and structural changes and identify differential transcripts in MRPA exposed to meropenem, ciprofloxacin, and the MCC.

The 1071-MRPA cell changes observed by SEM and TEM increased with meropenem, ciprofloxacin, and MCC exposure time. In the present study, the morphological and structural changes observed in MCC-treated cells suggest a summation of the effects observed with meropenem and ciprofloxacin treatment alone. Nonetheless, a significantly lower number of OMVs was detected in MCC-treated cells compared with meropenem- and mainly ciprofloxacin-exposed cells. Outer membrane vesicles are constantly and naturally discharged from the cell wall during Gram-negative bacterial growth.⁴⁶ These vesicles play an important role in bacterial virulence, transporting enzymes and other virulence factors for the host cell.^{47,48} Apparently, these structures can increase the survival of bacteria under stress,

such as the stress produced by antimicrobials, such as ciprofloxacin.^{49,50} This antimicrobial target DNA gyrase and topoisomerase IV, leading to breaks in the DNA strand, thus triggering the SOS response, stimulating bacterial outer membrane vesiculation, and contributing to cytotoxicity.⁴⁹ Thus, a speculation could be made about the contribution of the MCC in reducing cytotoxicity in the host cell caused by bacterial OMVs.

Waisbren et al.⁵¹ tested several antimicrobial combinations other than the MCC against *P. aeruginosa*. They observed some cellular changes by SEM that were not observed in cells exposed to the antimicrobials alone. According to these authors, the changes observed involved the protective mechanisms of which the organisms were deprived when exposed to synergistic combinations. Hayami et al.⁵² studied MCCs using SEM and found different cellular changes with the MCC compared with the cells exposed to the antimicrobials alone.

In the present study, differences in the gene expression of 1071-MRPA exposed to subinhibitory concentrations of meropenem, ciprofloxacin, and the MCC were identified compared with 1071-MRPA not exposed to antimicrobial agents. Critical considerations when studying bacterial gene expression are the exposure time and antimicrobial concentrations to be used for analysis. The literature on this subject has been quite variable.⁵³⁻⁵⁵ A long exposure time and different concentrations may be related to toxic and side effects and not represent the primary target of the antimicrobial.³⁴ In the present study, we used 60 min exposure to $0.5 \times \text{MIC}$ (meropenem, ciprofloxacin, and the MCC), which represents the beginning of the reduction of viable cells, and antimicrobial concentrations with better synergistic action, assessed by time-kill assays. Considering evidence of polyadenylated mRNA in *P. aeruginosa*,⁵⁶ the cDNA was obtained with random oligonucleotide hexamers plus oligodT primers. This strategy was used in an attempt to have the highest fidelity in the analysis of gene expression by constructing cDNA.

By RDA analyses, transcripts related to the cell wall repair or synthesis, DNA repair, bacterial metabolism as well as several hypothetical proteins of unknown function were observed. The most redundant contig detected by the RDA in meropenem-exposed 1071-MRPA (RDA1) was a transcript related to serine acetyltransferase protein. Additionally, similar and reduced expression levels of this protein were detected by qPCR in 1071-MRPA exposed to ciprofloxacin and the MCC ($p > 0.01$), respectively. Serine acetyltransferase catalyzes the first step of a two-step reaction pathway for L-cysteine biosynthesis from L-serine in bacteria, fungi, and plants,⁵⁷ but the relationship between this enzyme and the antimicrobials studied herein remains to be clarified. The redundancy of OprF observed in RDA1 was confirmed by qPCR, which demonstrated the overexpression of *oprF* (4.9-fold). This protein is the most abundant outer membrane porin of *P. aeruginosa*,⁵⁸ and its role in transporting antimicrobials is not well understood.⁵⁹ OprF also plays an important role in maintaining cell shape, particularly in adverse environments.⁶⁰ The overexpression of *oprF* observed in 1071-MRPA cells exposed to meropenem could be an attempt to maintain cell shape, which is quite altered by the action of meropenem, demonstrated by SEM and TEM. Previous RDA and qPCR studies conducted in our laboratory with *P. aeruginosa* ATCC (susceptible strain) showed that OprF was also differentially overexpressed in cells exposed to meropenem (data not shown). Recent studies suggest that OprF is related to virulence factor production, including the formation of OMVs through the modulation of the levels of a quorum sensing signal, the *Pseudomonas* quinolone signal (PQS).^{61,62} These findings reinforce the relationship between OprF and meropenem.

Cell-wall hydrolase differentially detected in ciprofloxacin-exposed 1071-MRPA showed similar expression with meropenem exposure too. This enzyme that appears to be involved in cell-wall biosynthesis and remodeling by promoting peptidoglycan hydrolysis,⁶³ exhibited lower expression in MCC-exposed cells ($p < 0.01$). A decrease in cell-wall repair

and hence in the bacterial defensive response could explain the higher activity of the MCC against 1071-MRPA.

The gene that encodes the alanine racemase, differentially expressed in 1071-MRPA ciprofloxacin and MCC exposed, was overexpressed in ciprofloxacin exposure. Alanine racemase is a bacterial enzyme that catalyzes the interconversion of L- and D-alanine, which is an amino acid that represents an important component of peptidoglycan in most bacteria.⁶⁴ Low concentrations of ciprofloxacin alter the structure of peptidoglycan.⁶⁵ Thus, we may infer that the bacteria also overexpressed alanine racemase to repair the peptidoglycan as a defensive mechanism. Uracil-DNA glycosylase proteins were also differentially expressed in 1071-MRPA exposed to ciprofloxacin and the MCC. However, it was expressed more intensely ($p < 0.01$) in meropenem-exposed 1071-MRPA. This enzyme plays an important role in preventing mutagenesis, eliminating uracil from DNA molecules by cleaving the *N*-glycosylic bond and initiating the base-excision repair (BER) pathway.⁶⁶ Further studies are needed to better understand the relationship between serine acetyltransferase, alanine racemase, and uracil-DNA glycosylase in the response of *P. aeruginosa* to the tested antimicrobials.

1071-MRPA is resistant to ciprofloxacin and carbapenems (i.e., imipenem and meropenem), but metallo- β -lactamase was not detected by genotypic and phenotypic analysis (data not shown). RDA detected no genes that are described in the literature related to resistance to both antimicrobials. The loss or decreased expression of the outer membrane porin OprD, coupled with the overexpression of the efflux pump and AmpC, is another important mechanism of resistance in *P. aeruginosa*²⁸ and could be a mechanism involved in the resistance of 1071-MRPA to meropenem and ciprofloxacin. Based on this, the *ampC*, *mexA*, and *oprD* genes were tested by qPCR to gain additional knowledge about the effect of the MCC on 1071-MRPA. A possible explanation for the present RDA failure may be

attributable to the inability of the restriction enzyme used in the current study (*Sau3AI*) to digest these gene sequences, thus preventing their amplification once the PCR-coupled cDNA-RDA subtractive hybridization technique preferentially amplified DNA fragments between 200 to 600 bp.²⁰

A significant difference in *ampC* and *oprD* expression in 1071-MRPA was observed with meropenem, ciprofloxacin, and MCC exposure. As expected, 1071-MRPA exposed to meropenem, a β -lactam, showed *ampC* and *oprD* overexpression. An intriguing observation was the significantly lower expression of *ampC* and *oprD* with MCC exposure, which will require further study.

Despite the different techniques, concentrations, and times of exposure to the antimicrobials, the use of certain antibiotics, including ciprofloxacin, triggers the SOS response, allowing the bacteria to adapt to the environment or host, in addition to contributing to the development of resistance.^{50,67} The SOS response in *P. aeruginosa* involves the controlled derepression of 15 genes by the LexA repressor.⁵⁴ In the present study, *lexA* was overexpressed with meropenem and ciprofloxacin exposure, indicating that the transcription of the SOS genes was activated. These data are consistent with the SEM and TEM OMV findings, which corroborate the results of Maredia et al.⁴⁹ Thus, as suggested by Cirz et al.,⁵⁰ an inhibitor of LexA cleavage might have a favorable effect in *P. aeruginosa* therapy. Nonetheless, with MCC treatment, lower *lexA* expression and OMV production was found. Much remains unknown about LexA-regulated expression in *P. aeruginosa*, and further studies could clarify the MCC results obtained in the present study.

Although the present results need to be corroborated by additional studies, they suggest that the MCC could be an alternative for the treatment of infections caused by MDR *P. aeruginosa*. The effects of this antimicrobial combination may result not only from the

summation of the effects of meropenem and ciprofloxacin but also from differential actions that likely involve the protective mechanisms of the bacteria.

Acknowledgements

We would like to thank Mychelle Vianna, Regina Cintia C. M. Velho and Juliana Cogo for collaboration in handling of ultramicrotome and electron microscopes. In addition, the authors would like to thank Lilian C. Baeza for many useful discussions.

Funding

This work was supported through grant from Programa de Apoio à Pesquisa Básica e Aplicada/Fundação Araucária; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Complexo de Centrais de Apoio a Pesquisa (COMCAP), Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas (LEPAC) and Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá.

Transparency declarations

None to declare.

REFERENCES

1. Fothergill JL, Winstanley C, James CE. Novel therapeutic strategies to counter *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2012; **10**: 219-35.
2. McGowan Jr JE. Resistance in Nonfermenting Gram-Negative Bacteria: Multidrug Resistance to the Maximum. *Am J Infect Control* 2006; **34**: S29-37.
3. Mangoni ML, Maisetta G, Di Luca M et al. Comparative analysis of the bactericidal activities of amphibian peptide analogues against multidrug-resistant nosocomial bacterial strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**: 85-91.
4. Mesaros N, Nordmann P, Plesiat P et al. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clin Microbiol Infect* 2007; **13**: 560-78.
5. El Solh AA, Alhajhusain A. Update on the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *J Antimicrob Chemother* 2009; **64**: 229-38.
6. Cirioni O, Ghiselli R, Silvestri C et al. Efficacy of tachyplestin III, colistin, and imipenem against a multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* strain. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**: 2005-10.
7. Kanellakopoulou K, Sarafis P, Galani I et al. In vitro synergism of β -lactams with ciprofloxacin and moxifloxacin against genetically distinct multidrug-resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents* 2008; **32**: 33-9.
8. Lim TP, Lee W, Tan TY et al. Effective antibiotics in combination against extreme drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with decreased susceptibility to polymyxin B. *PLoS One* 2011; **6**: e28177.
9. Louie A, Grasso C, Bahniuk N et al. The combination of meropenem and levofloxacin is synergistic with respect to both *Pseudomonas aeruginosa* kill rate and resistance suppression. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 2646-54.
10. Lister PD, Wolter DJ, Wickman PA et al. Levofloxacin/imipenem prevents the emergence of high-level resistance among *Pseudomonas aeruginosa* strains already lacking susceptibility to one or both drugs. *J Antimicrob Chemother* 2006; **57**: 999-1003.
11. Sandiumenge A, Rello J. Ventilator-associated pneumonia caused by ESKAPE organisms: cause, clinical features, and management. *Curr Opin Pulm Med* 2012; **18**: 187-93.
12. Mitsugui CS, Tognim MC, Cardoso CL et al. In vitro activity of polymyxins in combination with beta-lactams against clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents* 2011; **38**: 447-50.
13. Fish DN, Choi MK, Jung R. Synergic activity of cephalosporins plus fluoroquinolones against *Pseudomonas aeruginosa* with resistance to one or both drugs. *J Antimicrob Chemother* 2002; **50**: 1045-9.
14. Ermertcan S, Hosgor M, Tunger O et al. Investigation of synergism of meropenem and ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* strains isolated from intensive care unit infections. *Scand J Infect Dis* 2001; **33**: 818-21.
15. Solak S, Willke A, Ergonul O et al. In vitro activity of meropenem in combination with ciprofloxacin against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents* 2005; **25**: 181-2.
16. Pankuch GA, Lin G, Seifert H et al. Activity of meropenem with and without ciprofloxacin and colistin against *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**: 333-6.
17. Erdem I, Kucukercan M, Ceran N. In vitro activity of combination therapy with cefepime, piperacillin-tazobactam, or meropenem with ciprofloxacin against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Chemotherapy* 2003; **49**: 294-7.
18. Liang P, Zhu W, Zhang X et al. Differential display using one-base anchored oligo-dT primers. *Nucleic Acids Res* 1994; **22**: 5763-4.

19. Wada J, Kumar A, Ota K et al. Representational difference analysis of cDNA of genes expressed in embryonic kidney. *Kidney Int* 1997; **51**: 1629-38.
20. Bowler LD, Hubank M, Spratt BG. Representational difference analysis of cDNA for the detection of differential gene expression in bacteria: development using a model of iron-regulated gene expression in *Neisseria meningitidis*. *Microbiology* 1999; **145**: 3529-37.
21. Pastorian K, Hawel L, 3rd, Byus CV. Optimization of cDNA representational difference analysis for the identification of differentially expressed mRNAs. *Anal Biochem* 2000; **283**: 89-98.
22. Lisitsyn N, Wigler M. Cloning the differences between two complex genomes. *Science* 1993; **259**: 946-51.
23. Hubank M, Schatz DG. Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucleic Acids Res* 1994; **22**: 5640-8.
24. Kim S, Fung DY. Antibacterial effect of crude water-soluble arrowroot (*Puerariae radix*) tea extracts on food-borne pathogens in liquid medium. *Lett Appl Microbiol* 2004; **39**: 319-25.
25. Liao H, Zhang F, Liao X et al. Analysis of *Escherichia coli* cell damage induced by HPCD using microscopies and fluorescent staining. *Int J Food Microbiol* 2010; **144**: 169-76.
26. Santos AO, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP et al. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2008; **103**: 277-81.
27. Rossi F. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. *Clin Infect Dis* 2011; **52**: 1138-43.
28. Zavascki AP, Carvalhaes CG, Picao RC et al. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2010; **8**: 71-93.
29. Siqueira VLD, Cardoso RF, Pádua RAF et al. High genetic diversity among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. isolated in a public hospital in Brazil. *Braz J Pharm Sci* 2013; **49**: 49-56.
30. Clinical Laboratory Standards Institute. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*. CLSI document M7-A9, Wayne, PA, USA, 2012.
31. Clinical Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. CLSI document M100-S22, Wayne, PA, 2012.
32. Pillai SK, Moellering RC, Eliopoulos, G.M. Antimicrobial Combinations. In: Lorian V, ed. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. New York: Lippincott Williams & Wilkins, 2005; 365-440.
33. Odds FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother* 2003; **52**: 1.
34. Leite GGS, Baeza LC, Batista AA, et al. Genes differentially expressed by *Mycobacterium tuberculosis* after exposure to ruthenium phosphinic compound and isoniazid. *Intern J Microbiol Res* 2013; **5**.
35. Del Sal G, Manfioletti G, Schneider C. The CTAB-DNA precipitation method: a common mini-scale preparation of template DNA from phagemids, phages or plasmids suitable for sequencing. *Biotechniques* 1989; **7**: 514-20.
36. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 1997; **25**: 3389-402.
37. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; **25**: 402-8.
38. Bodi M, Garnacho J. *Pseudomonas aeruginosa*: combined treatment vs. monotherapy. *Med Intensiva* 2007; **31**: 83-7.

39. Kanellakopoulou K, Sarafis P, Galani I et al. In vitro synergism of beta-lactams with ciprofloxacin and moxifloxacin against genetically distinct multidrug-resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents* 2008; **32**: 33-9.
40. Isenberg HD, Alperstein P, France K. In vitro activity of ciprofloxacin, levofloxacin, and trovafloxacin, alone and in combination with beta-lactams, against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, and *Burkholderia cepacia*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999; **33**: 81-6.
41. Campana S, Taccetti G, Farina S et al. Antimicrobial susceptibility and synergistic activity of meropenem against Gram-negative non-fermentative bacteria isolated from cystic fibrosis patients. *J Chemother* 2003; **15**: 551-4.
42. Cappelletty DM, Rybak MJ. Comparison of methodologies for synergism testing of drug combinations against resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; **40**: 677-83.
43. Bonapace CR, White RL, Friedrich LV et al. Evaluation of antibiotic synergy against *Acinetobacter baumannii*: a comparison with Etest, time-kill, and checkerboard methods. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000; **38**: 43-50.
44. Lubasch A, Keller I, Borner K et al. Comparative pharmacokinetics of ciprofloxacin, gatifloxacin, grepafloxacin, levofloxacin, trovafloxacin, and moxifloxacin after single oral administration in healthy volunteers. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44**: 2600-3.
45. Moon YS, Chung KC, Gill MA. Pharmacokinetics of meropenem in animals, healthy volunteers, and patients. *Clin Infect Dis* 1997; **24 Suppl 2**: S249-55.
46. Beveridge TJ. Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J Bacteriol* 1999; **181**: 4725-33.
47. Bomberger JM, Maceachran DP, Coutermarsh BA et al. Long-distance delivery of bacterial virulence factors by *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane vesicles. *PLoS Pathog* 2009; **5**: e1000382.
48. Tashiro Y, Uchiyama H, Nomura N. Multifunctional membrane vesicles in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ Microbiol* 2012; **14**: 1349-62.
49. Maredia R, Devineni N, Lentz P et al. Vesiculation from *Pseudomonas aeruginosa* under SOS. *ScientificWorldJournal* 2012; **2012**: 402919.
50. Cirz RT, O'Neill BM, Hammond JA et al. Defining the *Pseudomonas aeruginosa* SOS response and its role in the global response to the antibiotic ciprofloxacin. *J Bacteriol* 2006; **188**: 7101-10.
51. Waisbren SJ, Hurley DJ, Waisbren BA. Morphological expressions of antibiotic synergism against *Pseudomonas aeruginosa* as observed by scanning electron microscopy. *Antimicrob Agents Chemother* 1980; **18**: 969-75.
52. Hayami H, Goto T, Kawahara M et al. Activities of beta-lactams, fluoroquinolones, amikacin and fosfomycin alone and in combination against *Pseudomonas aeruginosa* isolated from complicated urinary tract infections. *J Infect Chemother* 1999; **5**: 130-8.
53. Kolayli F, Karadenizli A, Savli H et al. Effect of carbapenems on the transcriptional expression of the oprD, oprM and oprN genes in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol* 2004; **53**: 915-20.
54. Juan C, Macia MD, Gutierrez O et al. Molecular mechanisms of beta-lactam resistance mediated by AmpC hyperproduction in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; **49**: 4733-8.
55. Hay T, Fraud S, Lau CH et al. Antibiotic Inducibility of the mexXY Multidrug Efflux Operon of *Pseudomonas aeruginosa*: Involvement of the MexZ Anti-Repressor ArmZ. *PLoS One* 2013; **8**: e56858.
56. Saravanamuthu SS, von Gotz F, Salunkhe P et al. Evidence for polyadenylated mRNA in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 2004; **186**: 7015-8.

57. Olsen LR, Huang B, Vetting MW et al. Structure of serine acetyltransferase in complexes with CoA and its cysteine feedback inhibitor. *Biochemistry* 2004; **43**: 6013-9.
58. Sugawara E, Steiert M, Rouhani S et al. Secondary structure of the outer membrane proteins OmpA of *Escherichia coli* and OprF of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 1996; **178**: 6067-9.
59. Bratu S, Landman D, Gupta J et al. Role of AmpD, OprF and penicillin-binding proteins in β -lactam resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Med Microbiol* 2007; **56**: 809-14.
60. Rawling EG, Brinkman FS, Hancock RE. Roles of the carboxy-terminal half of *Pseudomonas aeruginosa* major outer membrane protein OprF in cell shape, growth in low-osmolarity medium, and peptidoglycan association. *J Bacteriol* 1998; **180**: 3556-62.
61. Fito-Boncompagni L, Chapalain A, Bouffartigues E et al. Full virulence of *Pseudomonas aeruginosa* requires OprF. *Infect Immun* 2011; **79**: 1176-86.
62. Wessel AK, Liew J, Kwon T et al. Role of *Pseudomonas aeruginosa* peptidoglycan-associated outer membrane proteins in vesicle formation. *J Bacteriol* 2013; **195**: 213-9.
63. Johnson JW, Fisher JF, Mobashery S. Bacterial cell-wall recycling. *Ann N Y Acad Sci* 2013; **1277**: 54-75.
64. Lambert MP, Neuhaus FC. Factors affecting the level of alanine racemase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1972; **109**: 1156-61.
65. Bryskier A. Fluoroquinolones: mechanisms of action and resistance. *Int J Antimicrob Agents* 1993; **2**: 151-83.
66. Pearl LH. Structure and function in the uracil-DNA glycosylase superfamily. *Mutat Res* 2000; **460**: 165-81.
67. Hocquet D, Llanes C, Thouverez M et al. Evidence for induction of integron-based antibiotic resistance by the SOS response in a clinical setting. *PLoS Pathog* 2012; **8**: e1002778.
68. Dumas JL, van Delden C, Perron K et al. Analysis of antibiotic resistance gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* by quantitative real-time-PCR. *FEMS Microbiol Lett* 2006; **254**: 217-25.
69. Liu X, Li J, Wang Y et al. Green tea polyphenols function as prooxidants to inhibit *Pseudomonas aeruginosa* and induce the expression of oxidative stress-related genes. *Folia Microbiol (Praha)* 2013; **58**: 211-7.

Table 1 – Primer sequences used for real-time PCR analyses

Primer	Primer sequence (5' - 3')	GenBank Accession number or Reference
OprF	F - GCGGCTCGATCGGTTACTT R - CGTCATGGTACTCACCGTAGGA	NP_250468.1
Serine acetyltransferase	F - CCGTTCGCTCGCCACTAC R - AAACATCTAAGTACCCTGAGGAAAAGA	ZP_15787657.1
Hydrolase	F - CGAAATTCTTGGTCGGGTAA R - AGCGCCGCCATCGTTA	ZP_10486838.1
Alanine racemase	F - CGGATCGGGTGGTTCTGTAT R - GAGCCCCGGAGTACCTTTTATC	ZP_01680398.1
Uracil-DNA glycosylase	F - CAGCCCCAGGATGTGATGA R - TCATATCGACGGCGGTGTT	ZP_01682025.1
Hypothetical protein I	F - TACCCAGAAGTGCCGAGCAT R - CCTTTTTCACGACGGACGTT	ZP_22178892.1
Hypothetical protein II	F - TTACGGCCAGGGCTACACA R - CGGCTTGGCAACCCTTT	ZP_07663463.1
Hypothetical protein III	F - GGATTAGCCCTTAAGCTTCATTGA R - CACTATGGCCGCACTTTCCA	YP_001949471.1
<i>rpsL</i>	F - GCAAGCGCATGGTCGACAAGA R - CGCTGTGCTCTTGCAGGTTGTGA	Dumas et al. ⁶⁸
<i>ampC</i>	F - CGGCTCGGTGAGCAAGACCTTC R - AGTCGCGGATCTGTGCCTGGTC	Dumas et al. ⁶⁸
<i>mexA</i>	F - CGACCAGGCCGTGAGCAAGCAGC R - GGAGACCTTCGCCGCGTTGTCGC	Dumas et al. ⁶⁸
<i>oprD</i>	F - ATCTACCGCACAAACGATGAAGG R - GCCGAAGCCGATATAATCAAACG	Dumas et al. ⁶⁸
<i>lexA</i>	F GGATCAATCCCGCCTTCTTC R - AAGCGTTTCACCGTGACCTC	Liu et al. ⁶⁹

F, forward. R, reverse.

Table 2 Source and antimicrobial resistance profile of the *Pseudomonas aeruginosa* isolates tested.

Isolate	Biological Source	Hospital Ward	Antimicrobial resistance profile
596	Blood	Surgical clinic	AMK, ATM, CAZ, FEP, CIP, GEN, IPM, LVX, MEM, TZP, TOB.
603	Traqueal aspirate	ICU adult	ATM, CAZ, FEP, CIP, GEN, IPM, LVX, MEM, TOB.
632	Traqueal aspirate	ICU adult	AMK, ATM, CAZ, FEP, GEN, IPM, LVX, MEM, TOB.
751	Urine	Medical clinic	ATM, CAZ, CIP, FEP, GEN, IPM, LVX, MEM, TOB.
754	Cateter tip	ICU adult	AMK, ATM, CAZ, FEP, CIP, GEN, LVX, TOB.
756	Traqueal aspirate	ICU adult	ATM, CAZ, FEP, CIP, IPM, LVX, MEM, TOB.
758	Surgical wound	Surgical clinic	AMK, ATM, CAZ, FEP, CIP, GEN, LVX, TOB.
765	Urine	Medical clinic	AMK, ATM, CAZ, FEP, CIP, GEN, LVX, TOB.
766	Urine	Medical clinic	ATM, CAZ, FEP, IPM, LVX, MEM, TZP, TOB.
783	Urine	Medical clinic	ATM, CAZ, FEP, CIP, LVX, TOB.
784	Urine	Medical clinic	AMK, ATM, CAZ, FEP, GEN, IPM, LVX, MEM, TOB.
780	Surgical wound	Surgical clinic	AMK, ATM, CAZ, FEP, CIP, GEN, IPM, LVX, TOB.
787	Traqueal aspirate	ICU adult	AMK, CAZ, FEP, CIP, GEN, LVX, TOB.
790	Urine	Medical clinic	ATM, CAZ, FEP, CIP, GEN, IPM, LVX, MEM, TZP, TOB.
803	Urine	Surgical clinic	AMK, ATM, CAZ, FEP, GEN, LVX, MEM, TOB.
805	Traqueal aspirate	ICU adult	AMK, ATM, CIP, GEN, IPM, LVX, MEM, TOB.
819	Surgical wound	Medical clinic	AMK, CAZ, FEP, CIP, GEN, LVX, TOB.
884	Blood	Medical clinic	AMK, ATM, CAZ, FEP, CIP, GEN, LVX, TOB.
907	Urine	Surgical clinic	AMK, ATM, CAZ, FEP, CIP, GEN, LVX, TOB
909	Surgical wound	Surgical clinic	AMK, ATM, CAZ, FEP, CIP, GEN, LVX, TOB
915	Traqueal aspirate	ICU adult	ATM, CAZ, FEP, IPM, MEM, TOB.

Continued on following Page

Table 2-Continued

Isolate	Biological Source	Hospital Ward	Antimicrobial resistance profile
921	Traqueal aspirate	ICU adult	AMK, ATM, CAZ, FEP, CIP, GEN, IPM, LVX, MEM, TOB.
952	Urine	ICU adult	AMK, CAZ, FEP, CIP, GEN, LVX, TOB.
1001	Urine	Medical clinic	AMK, FEP, CIP, GEN, LVX, TOB.
1004	Urine	Surgical clinic	AMK, FEP, CIP, GEN, LVX, TZP, TOB.
1018	Urine	Surgical clinic	AMK, CAZ, FEP, CIP, GEN, LVX, TOB.
1020	Traqueal aspirate	ICU adult	AMK, FEP, CIP, GEN, IPM, LVX, MEM, TZP, TOB.
1037	Urine	Medical clinic	AMK, CAZ, FEP, CIP, GEN, LVX, TOB.
1038	Traqueal aspirate	ICU adult	AMK, ATM, CAZ, FEP, CIP, GEN, LVX, TOB.
1048	Traqueal aspirate	ICU adult	ATM, CAZ, FEP, CIP, LVX, TOB.
1071	Urine	ICU adult	AMK, FEP, CIP, GEN, IPM, LVX, MEM, TOB.
1072	Urine	Surgical clinic	FEP, CIP, GEN, IPM, LVX, MEM, TOB.

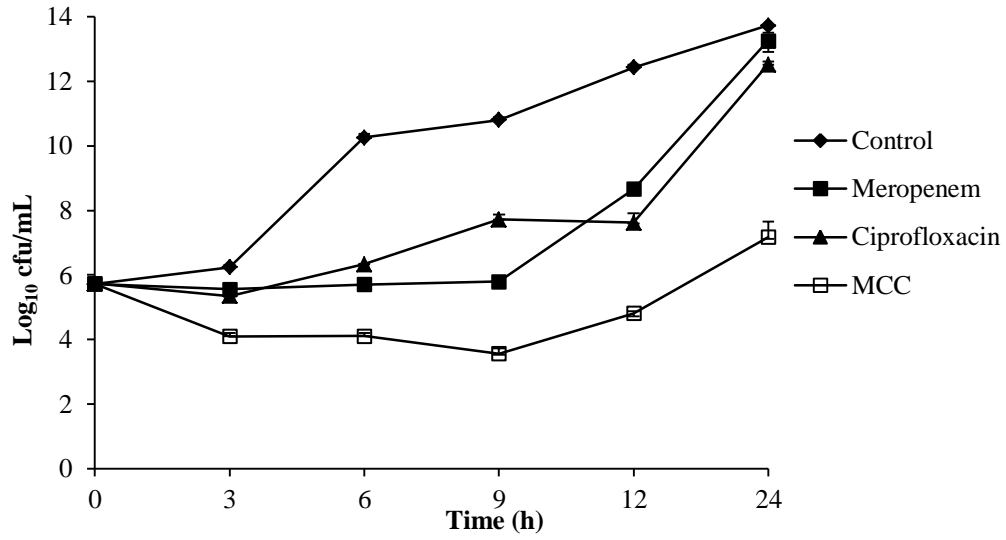
AMK, amikacin; ATM, aztreonam; CAZ, ceftazidime; CIP, ciprofloxacin; FEP, cefepime; GEN, gentamicin; IPM, imipenem; LVX, levofloxacin; MEM, Meropenem; TOB, tobramycin; TZP, piperacillin/tazobactam; ICU, intensive care unit.

Table 3. MIC, checkerboard and time-kill curve results of the *Pseudomonas aeruginosa* isolates tested.

Isolate	MIC (mg/L)		Checkerboard results		Time-Kill curve ^a
	Ciprofloxacin	Meropenem	FICI	Interpretation	Time (h) decreased $\geq 2 \log_{10}$ CFU/mL compared with the most active single antibiotic
596	32	16	0.75	NI	6-24*
603	32	16	0.50	S	9-12
632	1	16	0.65	NI	6-24*
751	32	8	1.00	NI	6-24**
754	64	4	2.00	NI	9-24*
756	32	64	0.37	S	24
758	32	0.25	1.00	NI	12
765	64	2	2.00	NI	12
766	0.5	64	1.00	NI	9-24*
783	32	1	0.75	NI	12-24
784	1	128	0.65	NI	12
780	16	4	0.50	S	12-24*
787	512	2	0.75	NI	12
790	32	32	1.00	NI	12
803	0.5	32	0.75	NI	6-24*
805	16	16	0.50	S	9
819	32	4	1.00	NI	12
884	512	2	1.00	NI	12-24
907	8	2	1.00	NI	9-24*
909	512	2	1.00	NI	24
915	0.25	32	0.63	NI	9-12
921	32	16	0.75	NI	12
952	16	4	1.00	NI	12
1001	16	2	0.50	S	6-24*
1004	32	4	0.75	NI	No decreased
1018	32	4	0.31	S	6-24**
1020	512	32	0.19	S	6-24**
1037	32	2	0.75	NI	12-24
1038	16	2	2.00	NI	9-24*
1048	32	2	0.75	NI	9-24
1071	32	32	0.19	S	6-24**
1072	16	32	0.75	NI	6-12

^a at 0.5 x MIC of meropenem, ciprofloxacin alone and in combination (MCC); *Synergistic activity; **Synergistic and bactericidal activity; FICI, fractional inhibitory concentration index; NI, no interaction; S, synergism.

(a)



(b)

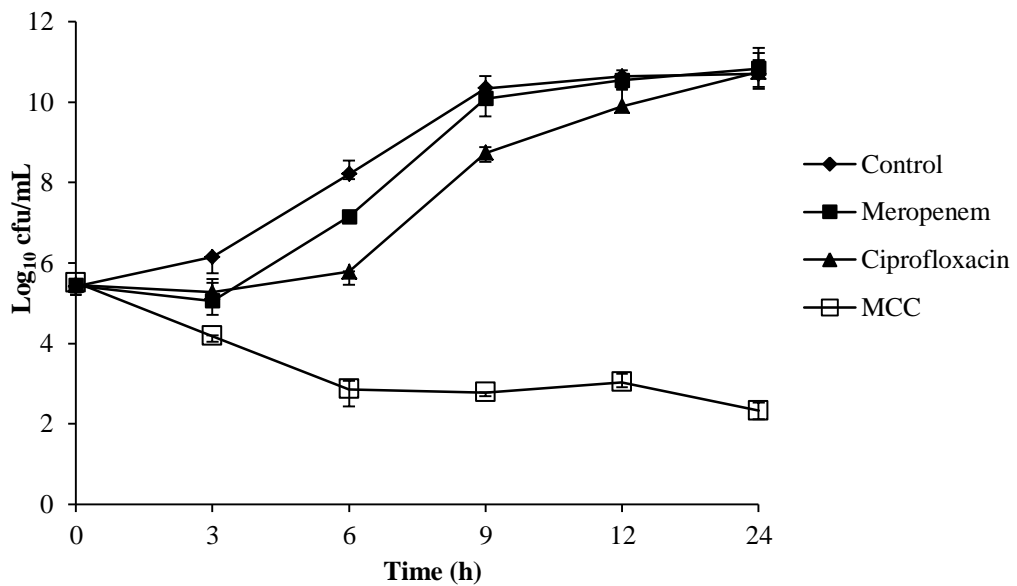


Figure 1. Time-kill curve using 0.5 x MIC of meropenem and ciprofloxacin alone and in combination (MCC) for ATCC 27853 (a) and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate - 1071-MRPA (b). Each data point represents the mean number of viable bacterial counts for duplicate experiments and error bars represent the standard deviation.

Table 4 Percentage multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate changed cells, including outer membrane vesicles (OMV), after 3 and 12 h incubation with and without 0.5 x MIC of meropenem, ciprofloxacin alone and in combination (MCC) by transmission electron microscopy (TEM).

Antimicrobial treatment	% changes cells by TEM (% OMV)	
	3 h	12 h
No antimicrobial (Control)	6.8 (0.3)	7.4 (1.1)
Meropenem	22.0 ^a (6.9 ^a)	68.5 ^a (11.8 ^a)
Ciprofloxacin	23.5 ^a (19.2 ^a)	46.9 ^a (14.8 ^a)
MCC	32.0 ^c (4.2 ^c)	92.7 ^c (2.6 ^b)

^a $p < 0.01$ compared to control. ^b $p < 0.01$ compared to meropenem and ciprofloxacin alone; ^c $p < 0.01$ compared to control, meropenem and ciprofloxacin alone

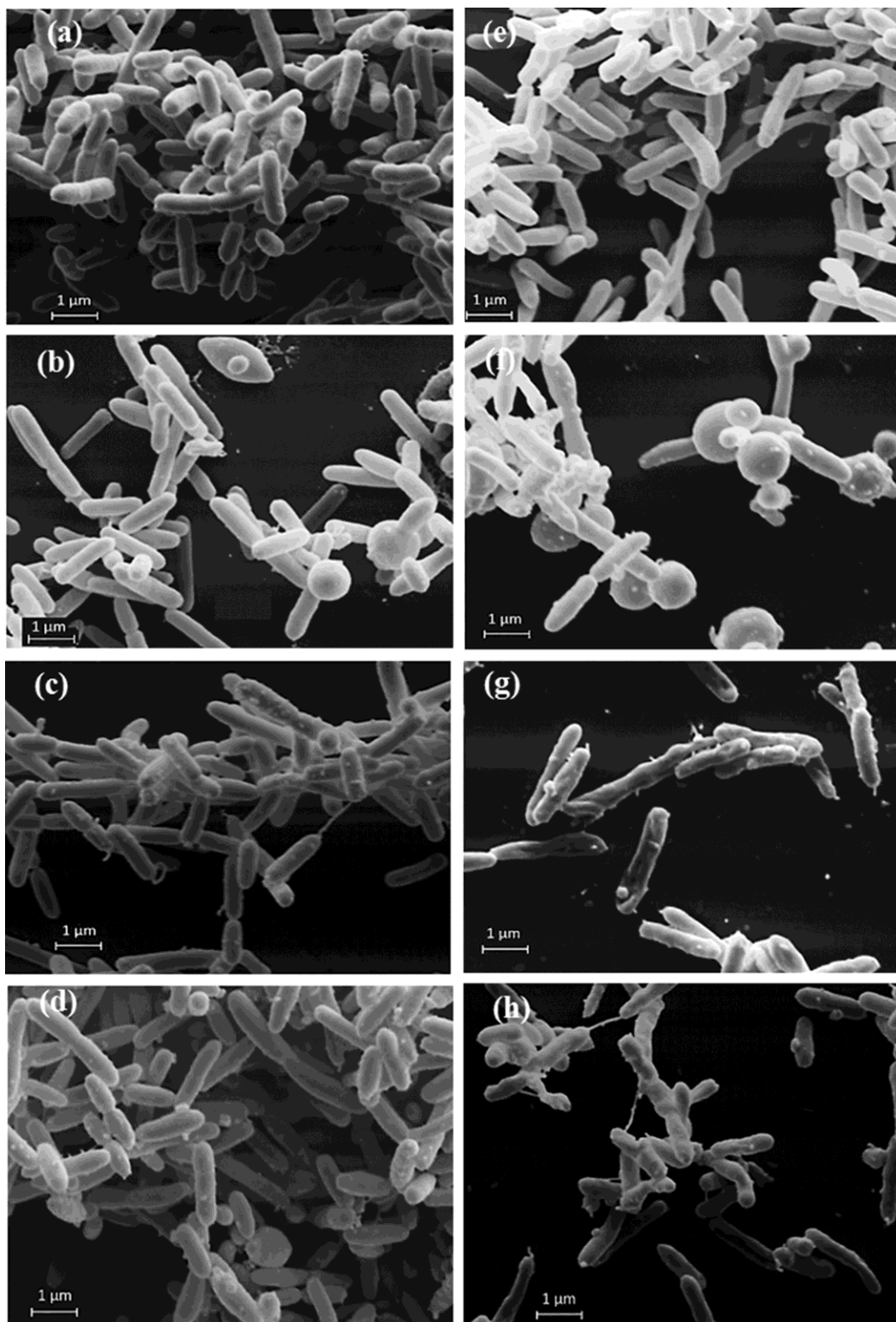


Figure 2. - Scanning electron micrograph of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate incubated at $3\pm 2^{\circ}\text{C}$ in CAMHB for 3 h (a – d) and 12 h (e – h), with subinhibitory concentration ($0.5 \times \text{MIC}$) of meropenem (b and f); ciprofloxacin (c and inset; and g) and MCC (d and h). *P. aeruginosa* in CAMHB without antibiotic, incubated for 3 h (a) and 12 h (e) at $35\pm 2^{\circ}\text{C}$. Inset magnification = 20,000x

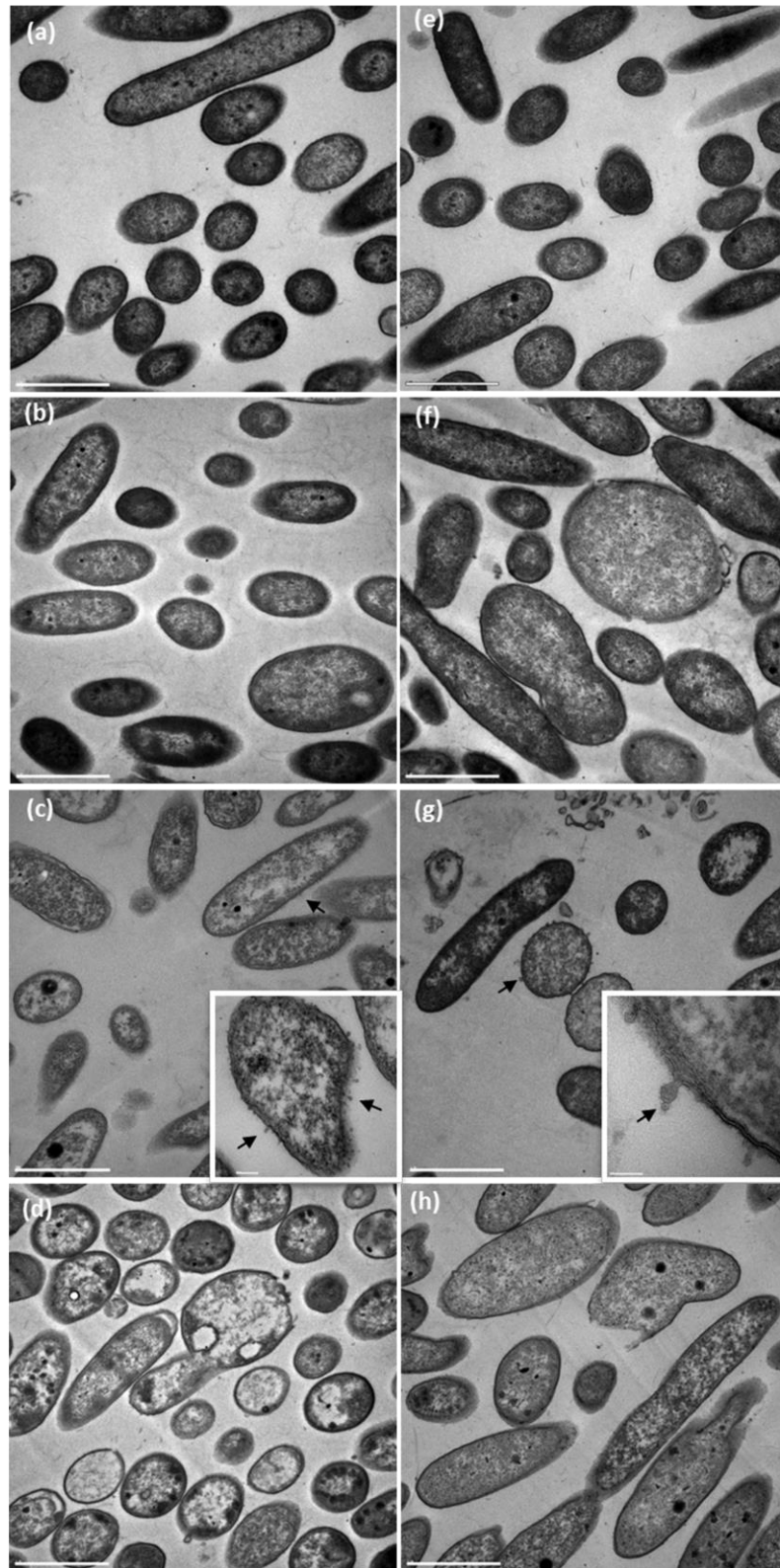


Figure 3. - Transmission electron micrograph of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate incubated at $35\pm 2^\circ\text{C}$ in CAMHB for 3 h (a – d) and 12 h (e – h), with subinhibitory concentration ($0.5 \times \text{MIC}$) of meropenem (b, f and inset); ciprofloxacin (c and inset; g and inset) and MCC (d and h). *P. aeruginosa* in CAMHB without antibiotic, incubated for 3 h (a) and 12 h (e) at $35\pm 2^\circ\text{C}$; a-h bar = $1 \mu\text{m}$, c inset bar = 200 nm , g inset bar = 50 nm . The arrows indicate outer membrane vesicles.

Table 5. Expressed sequence tags (ESTs) of multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate cultured in the presence of 0.5 x MIC meropenem, ciprofloxacin alone and in combination (MCC).

Antimicrobial treatment	Gene product	Organism Best hit/accession number ^a	E-value	Redundancy
Meropenem (RDA1)	serine acetyltransferase	<i>Vibrio cholerae</i> / ZP_15787657.1	3e-10	26
	OprF	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NP_250468.1	3e-10	22
	hypothetical protein (Hyp I)	<i>Escherichia coli</i> / ZP_22178892.1	8e-11	18
	hypothetical protein	uncultured <i>Chromatiales</i> <i>bacterium</i> / ADI18284.1	2e-11	10
	hypothetical protein	uncultured gamma <i>Proteobacterium</i> / ADI16715.1	3e-13	9
	hypothetical protein	- ^b	-	6
Ciprofloxacin (RDA2)	cell wall-associated hydrolase	<i>Enterobacter radicincitans</i> / ZP_10486838.1	7e-08	19
	Alanine racemase	<i>Vibrio cholerae</i> / ZP_01680398.1	4e-06	16
	Uracil-DNA glycosylase	<i>Vibrio cholerae</i> / ZP_01682025.1	2e-06	12
	hypothetical protein (Hyp III)	<i>Burkholderia multivorans</i> / YP_001949471.1	3e-08	11
	hypothetical protein	<i>Escherichia coli</i> / ZP_22178892.1	2e-15	10
	Conserved hypothetical protein	<i>Escherichia</i> sp/ ZP_04532941.1	3e-06	8
	hypothetical protein	- ^b	-	6
hypothetical protein	- ^b	-	4	

Continued on following Page

Table 5-Continued

Antimicrobial	Gene product	Organism Best hit/accession number ^a	E-value	Redundancy
	conserved hypothetical protein (Hyp II)	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> /ZP_07663463.1	4e-36	19
	alanine racemase	<i>Vibrio cholerae</i> /ZP_01680398.1	2e-23	15
	conserved hypothetical protein	<i>Escherichia</i> sp. /ZP_04532941.1	1e-05	12
	Glycosyl transferase	<i>Rhodospirillum photometricum</i> /YP_005415586.1	1e-26	10
MCC (RDA3)	uracil-DNA glycosylase	<i>Vibrio cholerae</i> /ZP_01682025.1	3e-35	8
	cell wall-associated hydrolase	<i>Vibrio cholerae</i> /EHH98088.1	1e-06	8
	hypothetical protein	<i>Salmonella enterica</i> subsp. enterica serovar Choleraesuis st/ AAX64155.1	1e-22	8
	hypothetical protein	<i>Clostridium bartlettii</i> /ZP_02210961.1	6e-21	6
	hypothetical protein	<i>Vibrio scophthalmi</i> /ZP_08745892	5e-13	3

^a Accession number at GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>); ^bNo matched.

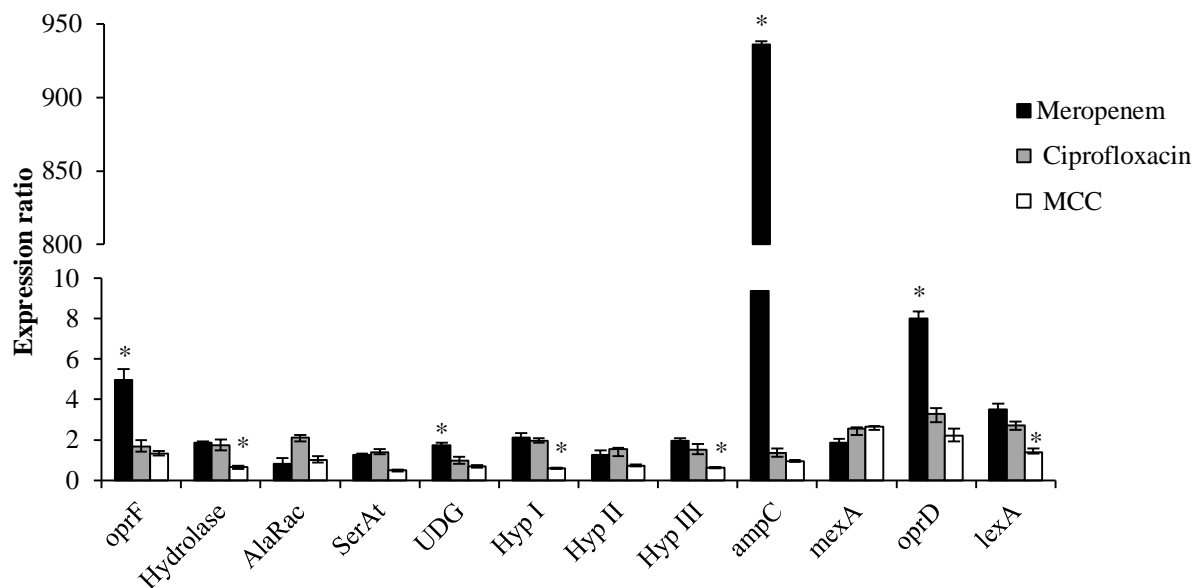


Figure 4. Transcript levels of differentially expressed genes from multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate (1071-MRPA) exposed to 0.5 x MIC of meropenem and ciprofloxacin alone, and in combination (MCC), normalized to 1071-MRPA grown in culture medium antimicrobial free. * $p < 0.01$ compared to other two treatment. AlaRac, Alanine racemase gene; SerAt, Serine acetyltransferase gene; UDG, Uracil-DNA glycosylase gene; Hyp I, Hyp I and Hyp III, hypothetical proteins genes.

CAPÍTULO III

3.1 CONCLUSÕES

- Este estudo mostrou que isolados de *P. aeruginosa* apresentaram alta diversidade genética, sugerindo que a transmissão cruzada não é frequente no hospital estudado;
- RDA demonstrou ser uma técnica útil para a detecção de genes diferencialmente expressos por *P. aeruginosa* exposta a uma combinação de antimicrobianos;
- MCC pode ser uma alternativa para o tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa* multirresistentes;
- Os efeitos de MCC sobre a estrutura bacteriana sugerem uma somatória dos efeitos das drogas usadas isoladamente, com exceção da diminuição da produção de vesículas de membrana externa (OMVs);
- A diminuição da produção de OMVs e da expressão de genes relacionados à resposta aos antimicrobianos (resposta SOS) por *P. aeruginosa* exposta à MCC, poderia contribuir para diminuir os efeitos citotóxicos decorrentes do tratamento de infecções por esta bactéria.

3.2 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Confirmar a ação de MCC na diminuição da resposta SOS bacteriana, pesquisando outros genes relacionados a este tipo de resposta;
- Avaliar a ação de MCC sobre a morfologia e estrutura de *P. aeruginosa* usando técnicas de imunocitoquímica associada à microscopia eletrônica;
- Empregar a técnica de RDA para avaliar outras associações antimicrobianas, utilizando *P. aeruginosa* e outras espécies bacterianas;

- Fazer testes *in vitro* e *in vivo* para confirmar a hipótese da diminuição da citotoxicidade no tratamento usando MCC quando comparado ao meropenem e ciprofloxacino sozinhos.
- Consolidar o grupo de pesquisa existente no Laboratório de Bacteriologia Médica da Universidade Estadual de Maringá, para trabalhos na linha de pesquisa relacionada a opções terapêuticas alternativas em bactérias resistentes.

4. ANEXO METODOLOGIA

4.1 Amostras bacterianas

Foram incluídas neste estudo 75 isolados de *P. aeruginosa* e 94 de *Acinetobacter* spp. provenientes de culturas rotineiras de diversos espécimes clínicos, de pacientes internados em hospital público universitário da região noroeste do Paraná - Brasil, no período compreendido entre janeiro de 2007 e julho de 2009. Apenas um isolado de cada paciente foi estocado em caldo triptona de soja (TSB - Difco-Becton Dickinson, Sparks, EUA) com 15% de glicerol (Merck – Darmstadt, Alemanha) a - 80°C, na bacterioteca do Laboratório de Bacteriologia Médica da Universidade Estadual de Maringá até o momento dos testes. Trinta e dois isolados de *P. aeruginosa*, geneticamente distintos, MDR e resistente a pelo menos um dos dois antimicrobianos estudados (meropenem e ciprofloxacino) foram selecionados para os testes de atividades antimicrobianas e avaliação do sinergismo. *P. aeruginosa* ATCC 27853 foi utilizada como controle. Um isolado de *P. aeruginosa* MDR, para o qual a combinação antimicrobiana se mostrou sinérgica, foi selecionado para os testes de expressão gênica e microscopia eletrônica.

4.2 Identificação bioquímica e teste de sensibilidade aos antibacterianos

A identificação de todos os isolados bacterianos e os testes de sensibilidade aos antibacterianos (TSA) foram realizados utilizando o sistema automatizado AUTO-SCAN-4 (Siemens Microscan, Deerfield, IL, EUA), exceto polimixina B para *P. aeruginosa* que foi testada por disco-difusão (BAUER et al., 1966). A interpretação dos resultados do TSA foi realizada conforme recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI* (CLSI, 2007 a 2009).

4.3 Detecção Fenotípica de Metallo-β-Lactamase (MBL)

Isolados de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. que se mostraram resistentes à ceftazidima foram avaliados quanto a presença de MBL conforme descrito por Arakawa *et al.* (2000) com algumas modificações. Foram empregados discos (em branco) impregnados com 3 µL de uma solução a 100 mM de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA, Invitrogen, Carlsbad, EUA) e 5µL de ácido 2-mercaptopropiônico (2-MPA, Acros, Nova Jersey, EUA). A suspensão bacteriana padronizada de acordo com a escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ Unidades Formadoras de Colônias - UFC/mL) foi semeada uniformemente em placa contendo Mueller-Hinton agar (MHA - Difco-Becton Dickinson). Discos comerciais contendo ceftazidima (30 µg), meropenem (10 µg) e imipenem (10 µg) (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) foram colocados a uma distância de 1 cm do disco impregnado com EDTA e a 2,5 cm do disco com 2-MPA. O teste foi considerado positivo quando houve aparecimento de uma distorção no halo de inibição de crescimento bacteriano entre os discos de β-lactâmicos e EDTA ou 2-MPA.

4.4 Extração de DNA para genotipagem

DNA genômico foi extraído de um crescimento bacteriano *overnight* em MHA (Difco-Becton Dickinson) diluído em água deionizada e purificado pelo sistema MilliQ (EMD Millipore Corporation, Billerica, EUA), de acordo com Swanenburg *et al.* (1998), empregando aquecimento a 100°C por 5 min. Após purificação com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25/24/1) o DNA foi precipitado com etanol absoluto gelado, lavado com etanol 70% por duas vezes, seco em temperatura ambiente e solubilizado em 100 µL de tampão TE (Tris-HCl 10mM; EDTA 1mM, pH 8,0). Qualidade e quantidade do DNA foram determinadas espectrofotometricamente a 260 e 280 nm.

4.5 Genotipagem por ERIC-PCR

DNA genômico extraído dos isolados de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. foi usado para a realização da PCR com os iniciadores ERIC1R (5'ATGTAAGCTCCTGGGGATTCAC3') e ERIC2 (5'AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG3'), como descrito por Szczuka e Kaznowski (2004), em um volume final de 25µL. A amplificação foi realizada em termociclador Techne TC-512 (Techne – Cambridge, Reino Unido), utilizando um ciclo inicial de 7 min a 95°C; 40 ciclos cada um com 30 seg a 90°C e 1 min a 52°C e extensão final por 8 min a 72°C. Após, os produtos da PCR foram submetidos à separação eletroforética em gel de agarose 2,0% (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Suécia), contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio, em tampão TBE (Tris-HCl 0,45 mM, ácido bórico 0,45 mM e EDTA 2,5 mM pH 8,0), a 100 V por 2 h, visualizados sob luz ultravioleta e fotodocumentados com o sistema digital Power Shot S215 (Cannon, Nova York, EUA). Um marcador de peso molecular de 100 pares de base foi usado como padrão de peso molecular para análise do perfil de bandas.

Os perfis de múltiplas bandas dos isolados de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. foram avaliados visualmente e analisados para o polimorfismo baseados na presença ou ausência de bandas. A análise dos perfis de bandas nos géis de agarose foi realizada utilizando o software BioNumerics (*version 4.45; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium*). O Dendrograma foi construído e a distância filogenética foi determinada segundo Sneath e Sokal (1973), empregando UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*).

4.6 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

CIM de meropenem (lote 09405C-1, AstraZeneca, Cotia, Brasil) e ciprofloxacino (lote 0001396108, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) foram determinadas pelo método de microdiluição em caldo usando MHB com ajuste de cátions (CAMHB, Difco Laboratories, Sparks, MD, EUA) (CLSI, 2012). Os isolados foram reativados em TSB (Difco Laboratories) por 2-6 h a 35±2°C, seguido de plaqueamento em Tryptic Soy Agar (TSA - Difco Laboratories) por até 24 h a 35±2°C. O inóculo foi preparado pela comparação com a escala

0,5 de McFarland e diluído até a concentração final de aproximadamente $5,0 \times 10^5$ UFC/mL. Os antimicrobianos foram testados em concentrações variando de 0,06 a 1024 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Após 18 h de incubação a concentração com nenhum crescimento visível foi considerada como CIM. A categorização de susceptibilidade foi feita com base nos pontos de corte preconizados pelo CLSI (2013). Os ensaios foram feitos em triplicata e repetidos em dias diferentes.

4.7 Avaliação da atividade antimicrobiana de MCC por *checkerboard*

Meropenem e ciprofloxacino foram testados sozinhos e em combinação (MCC) em concentrações até 4 x acima e abaixo da CIM das drogas testadas sozinhas, utilizando diluição tipo *checkerboard* (PILLAI; MOELLERING; ELIPOULOS, 2005) em CAMHB, conforme o esquema abaixo.

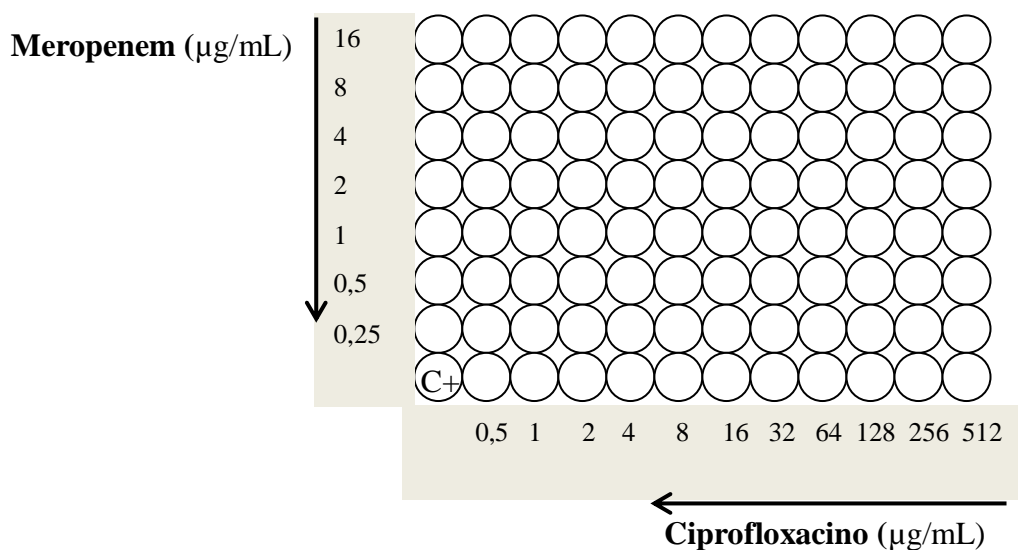


Figura A1. Esquema representativo da diluição dos antimicrobianos (meropenem e ciprofloxacino) segundo metodologia *checkerboard* (PILLAI; MOELLERING; ELIPOULOS, 2005).

A concentração do inóculo final dos 32 isolados de *P. aeruginosa* estudados foi de aproximadamente $5,0 \times 10^5$ UFC/mL. As placas foram incubadas por 18 h a 35°C . Todos os ensaios foram feitos em triplicata. O índice da concentração inibitória fracional (FICI) foi calculado pela fórmula: $\text{FIC}_A + \text{FIC}_B = \text{FICI}$, onde $\text{FIC}_A = \text{CIM}$ do antimicrobiano A em

combinação/CIM do antimicrobiano A sozinho. $FIC_B = CIM$ do antimicrobiano B em combinação/CIM do antimicrobiano B sozinho. Sinergismo foi definido como um $FICI \leq 0,5$, nenhuma alteração quando o $FICI > 0,5$ e ≤ 4 e antagonismo com $FICI > 4$ (ODDS, 2003).

4.8 Avaliação da atividade antimicrobiana de MCC por curva de tempo de morte

Todos os 32 isolados de *P.aeruginosa* foram testados por curva de tempo de morte para concentrações subinibitórias (0,5 e 0,25 x CIM) de meropenem, ciprofloxacino e MCC em CAMHB. Os testes foram realizados em duplicata e um tubo controle sem antibiótico foi incluído em todos os testes. Tubos com e sem antibióticos sozinhos e combinados foram inoculados com 10^5 UFC/mL (inóculo final) de cada isolado e foram incubados sob agitação a 37°C. Alíquotas de 0,1 mL foram retiradas de cada tubo a 0, 3, 6, 9, 12 e 24 h e, para evitar o carreamento de antibiótico, foram diluídas serialmente em salina estéril (10^{-1} a 10^{-7}). Imediatamente após, 20 μ L de cada diluição foram semeados em placas de TSA (Difco) em triplicata. A contagem das colônias foi realizada entre 18 e 24 h de incubação e a média dos resultados foram plotados como \log_{10} UFC/mL x tempo (h). Sinergismo foi definido como uma diminuição $\geq 10^2$ UFC/mL na contagem de viáveis nos tubos com MCC na 24^a h de incubação, comparados com a contagem nos tubos com o antibiótico sozinho mais ativo e com o número de viáveis na presença da combinação sendo $\geq 2\text{-}\log_{10}$ UFC/mL abaixo do inóculo inicial (PILLAI; MOELLERING; ELIPOULOS, 2005). Atividade bactericida foi definida como uma diminuição na contagem de colônias $\geq 3\text{-}\log_{10}$ UFC/mL do inóculo inicial na 24^a hora de incubação (LIM et al., 2011).

4.9 Microscopia electronica de varredura (MEV) e transmissão (TEM)

Um isolado clinico multirresistente (1071-MRPA) para o qual MCC apresentou uma ação sinérgica, foi selecionado para os estudos com microscopia eletrônica. O isolado 1071-MRPA tratado com 0,5 x CIM de meropenem, ciprofloxacino e MCC por 3 e 12 h, foi fixado em glutaraldeído 2,5 % (Sigma-Aldrich) em tampão cacodilato (EMS - Electron Microscopy

Science, Hatfield, PA, EUA) por no mínimo 2 h a 4°C. Para descartar qualquer possibilidade de contaminação durante a manipulação, antes da fixação, alíquotas (0,1 mL) de todas as amostras foram diluídas serialmente (para retirada do antimicrobiano) e semeadas em TSA. Todos os experimentos foram feitos em duplicata em dias diferentes. Para a MEV, aproximadamente 30 µL das células bacterianas fixadas e lavadas 3x em tampão cacodilato 0,1 M foram depositadas sobre um suporte de vidro (recortes de lamínulas) coberto com poli-L-lisina (Sigma). Após 1 h as lamínulas foram lavadas 3x em tampão cacodilato 0,1 M e submetidas à desidratação por gradiente de etanol de 50 a 100% e ponto crítico de secagem utilizando CO₂. As amostras totalmente desidratadas foram metalizadas sob vácuo (metalizador Shimadzu IC50, Kyoto, Japão) e visualizadas em microscópio eletrônico de varredura (Shimadzu SS-550). Para cada amostra aproximadamente 30 a 50 campos microscópicos foram selecionados randomicamente e fotografados.

Para MET as células fixadas em glutaraldeído foram lavadas 3 x com tampão cacodilato 0,1 M e fixadas em tetróxido de ósmio 2,0% (EMS) e ferrocianeto de potássio 2,0% (Merck) por 2 h a temperatura ambiente. A desidratação foi realizada em acetona (gradientes de 50 a 100%), sendo que no gradiente de 70%, aproximadamente 0,5 mL de ágar a 1% foi adicionado às amostras. Após a desidratação as amostras foram incluídas em resina EMBED (EMS) que foi polimerizada a 60°C por 72 h. Cortes ultrafinos (60 nm) foram realizados em ultramicrótom (RMC, modelo MTX-L, Boeckeler Instruments, Tucson, EUA) e recolhidos em grades de cobre (Diâmetro de 3,05 mm e 200 linhas por polegada quadrada). As grades com os cortes foram contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo (EMS) e observadas em microscópio JEM-1400 (JEOL Ltd, Tokio, Japão), operado a 80 kV. Em média 200 campos foram fotografados e 2000 células avaliadas para cada amostra.

4.10 Reação de cDNA-RDA

4.10.1 Extração de RNA e síntese de cDNA

Todo procedimento envolvendo RNA foi realizado em condições livres de RNases. Colônias do isolado 1071-MRPA, crescidas em TSA a 35°C/18 h, foram transferidas para 4

Erlenmeyers contendo 30 mL de CAMHB e incubadas a 35°C até uma densidade ótica (600 nm) igual a aproximadamente 0,4. Meropenem, ciprofloxacino e MCC foram adicionados a uma concentração final de 16 µg/mL, correspondente a 0,5 x CIM de cada antimicrobiano sozinho e estes tratamentos foram referidos como Tester (T1, T2 e T3, respectivamente). Um *Erlenmeyer* sem antimicrobiano usado como controle foi referido como Driver (D). Todos os frascos foram incubados a 35°C em agitação. Após 60 min da adição dos antimicrobianos todo crescimento bacteriano foi centrifugado a 4700 rpm e as células bacterianas foram lavadas 2 vezes com água milliQ tratada com 0,01% de DEPC (Diethyl-pyrocabonate, Acros Organics, Fair Lawn, EUA). RNA total foi extraído utilizando o kit comercial RNeasy (Qiagen Biotechnology, Valencia, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A concentração do RNA foi determinada em fluorímetro Qubit 2.0 (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e a integridade avaliada por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 1X (Tris-base 90 mM, ácido bórico 90 mM e EDTA 2 mM pH 8,0), corado com brometo de etídio e observado à luz ultra-violeta.

Para eliminação de provável DNA contaminante, 1 µL de RNA total (aproximadamente 1 µg RNA) foi misturado com 1 µL de DNase I por 30 min a 35°C. Após a inativação da DNase (65°C por 10 min na presença de EDTA), o RNA foi submetido a uma PCR convencional, usando primer ERIC1R e ERIC2 (descritos acima) e posterior eletroforese em gel de agarose 1%, para assegurar a total remoção do DNA. A síntese da primeira fita do cDNA foi imediatamente realizada, empregando RT Superscript III (Invitrogen). Para isso, foram utilizados 1µg do RNA total livre de DNA e 0,8 µM de primer oligodT: 5'AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACT₃₀N₁N₃', onde N = A, C, G ou T e N₁ = A, G ou C (Integrated DNA Technologies, Coralville, USA) e random primer (Invitrogen). As reações foram realizadas na presença de DTT (ditrioteitol) e RNase out e a mistura total foi incubada a 25°C por 5 min, 37°C por 60 min e 70°C por 15 min.

Na sequência a segunda fita de cDNA foi sintetizada usando random primer e *Platinum® Taq DNAPolymerase High Fidelity (Taq Hi-Fi - Invitrogen)*. A termociclagem utilizada foi: 95°C por 1 min; 40 ciclos de 95°C/15 min; 25°C/30 min e 68°C/5 min com uma extensão final de 68°C/10 min.

4.10.2 Digestão com enzima de restrição e ligação dos adaptadores

Aproximadamente 1 µg de cDNA de T1, T2, T3 e D foram digeridos com a enzima de restrição *Sau3AI* (Promega Corporation, Madison, EUA) por 3 h a 37°C. Após a inativação da enzima (15 min a 65°C) o produto de restrição foi purificado (Kit QIAquick – Qiagen) e quantificado (Qubit). Aproximadamente 250 ng de cada Tester (T1, T2 e T3) foram ligados aos adaptadores RBam24 (5'AGCACTCTCCAGCCTCTCTCACCG3') e RBam 12 (5'GATCCTCGGTGA3') (500 pmol/µL) (Integrated DNA Technologies). As condições térmicas para a reação de hibridação dos adaptadores foram: 55°C/20 min; 55°C/10 min; 53°C/1 min; 52°C/1 min; 50°C/1 min; 45°C/5 min; 40°C/5 min; 30°C/5 min; 25°C/5 min; 20°C/3 min; 15°C/5 min; 10°C/5 min; 4°C/30 min. Após a hibridação a enzima T4-ligase (Invitrogen) foi adicionada e a reação de ligação foi realizada a 22°C por 18h.

Para confirmar a ligação do primeiro par de adaptadores uma PCR foi realizada utilizando como iniciador o adaptador RBam24.

4.10.3 Primeira Subtração e enriquecimento cinético

Para a primeira reação de subtração inicialmente o Tester de cada condição de tratamento (T1, T2 e T3) foi misturado com um Driver (D), sem tratamento, na proporção 1:10. A mistura foi acrescida de acetato de amônia 7,5 M e etanol absoluto e incubada a -20°C por no mínimo 3 h, centrifugada a 30.000g/30 min e lavada com etanol absoluto. O precipitado foi ressuspensão em 4 µL de tampão EE (EPPS 30 mM (Sigma) e EDTA 3 mM), aquecido a 95°C/2 min, transferido para um tubo contendo 1,5 µL de NaCl 5 M, coberto com óleo mineral, incubado novamente a 95°C por mais 3 min e a 67°C por 24 h. O produto da subtração foi submetido a uma PCR usando *Taq* Hi-Fi (Invitrogen) e o adaptador RBam24 como iniciador. O produto final da PCR foi purificado, digerido com a *Sau3AI* (Promega) e novamente purificado.

Uma segunda subtração foi feita usando os adaptadores NBam12 (5'GATCCTCCCTCG3') e NBam24 (5'AGGCAACTGTGCTATCCGAGGGAG3') que foram hibridados e ligados aos produtos da primeira amplificação, nas mesmas condições da

primeira reação. A segunda subtração foi realizada da mesma maneira que a primeira, exceto pela proporção de tester/driver que foi de 1:20.

A terceira subtração foi realizada usando os adaptadores JBam24 (5'ACCGACGTCGACTATCCATGAACG3') e JBam 12 (5'GATCCGTTCATG3'), nas mesmas condições que as anteriores, com diferença na proporção tester/driver, que desta vez foi de 1:10. Um experimento reverso foi realizado nas mesmas condições descritas acima, apenas invertendo-se o Driver com o Tester, sendo neste caso o Driver ligado aos adaptadores e o Tester usado como Driver (controle).

4.11 Clonagem dos produtos de RDA

Os produtos finais das PCRs (RDA1, RDA2 e RDA3) foram ligados ao vetor de clonagem pGEM-T-Easy vector (Promega) na proporção 1:5 (vetor/inserto) e incubação a temperatura ambiente por 2 h. Para a transformação foram utilizadas células competentes de *Escherichia coli* DH5- α (Invitrogen) e choque térmico (2 min a 42°C e 2 min no gelo). As células foram então cultivadas em meio SOC (SAMBROOK; RUSSEL, 2001) por 1 h a 37°C e agitação.

A suspensão bacteriana foi inoculada em LBA (Luria Bertani ágar), acrescido de 100 μ g/mL de ampicilina, IPTG (Isopropil-tio- β -D-galactopiranosídeo) e Xgal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -galactopiranosídeo). As placas foram incubadas por 18 h a 37°C para a seleção dos clones recombinantes.

4.12 Extração de DNA Plasmidial

As colônias selecionadas foram inoculadas em caldo LB com 5 mg/L de ampicilina e incubadas por 20 h a 37°C, em agitação. Após este período 750 μ L do cultivo foi adicionado de 15% de glicerol e estocado a -20°C. O restante do cultivo foi utilizado para a extração do DNA plasmidial pelo método CTAB segundo Del Sal; Manfioletti e Schneider (2001). Resumidamente, a lise celular foi feita empregando solução STET (Sacarose 8%; EDTA 50

mM; Triton X-100 0,1%; Tris 50 mM, pH 8,0), lisozima e aquecimento a 100°C por 1 min. Após centrifugação o sobrenadante foi precipitado com o detergente catiônico brometo de cetil-trimetil amônio (CTAB - *cetyltrimethylammonium bromide*) e após nova centrifugação o sedimento foi seco, ressuspensão em NaCl 1,2 M, agitado em vórtex e aquecido a 37°C/10 min. O DNA foi precipitado com etanol absoluto, lavado com etanol 70%, seco a temperatura ambiente e ressuspensão em tampão TE (Tris-HCl 10 mM em pH 8,0 e EDTA 1 mM) adicionado de RNase (Invitrogen) a uma concentração final de 0,05 mg/mL.

4.13 Sequenciamento

O Sequenciamento foi realizado em MegaBACE 1000 DNA sequencer (GE Healthcare Life Science, USA) segundo Sanger; Nicklen e Coulson (1977). Iniciadores universais M13 (Promega) e kits *DYEnamic ET Dye DYE terminator Cycle Sequencing* (GE Healthcare Life Science) foram empregados. A sequência nucleotídica foi determinada pela incorporação de dideoxynucleotídeos (ddNTP) terminadores e foram avaliadas automaticamente através dos cromatogramas gerados pelo software MegaBACE 100 sequencer e convertidos.

Expressed sequence tags (ESTs) foram analisadas usando os programas Phred, Crossmatch e CAP3 (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>). Sequências com pelo menos 100 nucleotídeos e qualidade Phred maior ou igual a 20 foram consideradas para análise. ESTs foram agrupadas em clusters, representadas por *contigs* e *singlets*. As sequências foram comparadas com dados do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) do National Center for Biotechnology Information (NCBI) usando algoritmos do BLASTX e como ponto de corte E-value $\geq 10^{-5}$.

4.14 PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

qPCR foi realizado para confirmar e quantificar os níveis de transcritos de alguns dos genes diferencialmente expressos detectados pela técnica de RDA. Adicionalmente foram

quantificados alguns genes relacionados à resistência de *P. aeruginosa* ao meropenem e ciprofloxacino, além de um gene regulador da resposta SOS. A quantificação foi feita a partir do cDNA primeira fita de T1, T2, T3 e D, obtidos como descrito para a técnica de RDA. Os iniciadores empregados foram desenhados utilizando o software Primer Express (Versão 3.0, Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), com exceção dos genes relacionados à resistência e resposta SOS, que foram desenhados conforme descrito na literatura (Tabela A1). A eficiência dos iniciadores foi testada por curva padrão utilizando diluição seriada na razão 10 do cDNA de 1071-MRPA. Foram empregadas concentrações dos iniciadores que providenciaram uma eficiência de amplificação variando entre 90 e 110% para todos os experimentos. A técnica foi desenvolvida em um sistema StepOnePlus™ real time PCR (Version 2, Applied Biosystems) utilizando SYBR® *Selected Master Mix* (Applied Biosystems). A reação foi realizada com 1 µl de cDNA e 400 nM de cada iniciador em um volume final de 10 µl. A ciclagem térmica para PCR foi: 95°C/10 min e 40 ciclos de 95°C/15 seg, 60°C/20 seg e 72°C/20 seg. Em todas as análises, reações contendo todos os reagentes exceto o cDNA foram incluídas como controles negativos e curvas de melting foram realizadas no final de cada reação, para confirmar a presença de um único produto de PCR. Todas as análises foram feitas em triplicata com duplicata biológica. O gene ribossomal *rpsL*, considerado endógeno para *P. aeruginosa*, foi empregado para normalização de todas as reações e o cDNA de 1071-MRPA sem contato com antibiótico (Driver – D) foi usado como referência para os cálculos do $2^{-\Delta\Delta CT}$. Os genes foram considerados como super-expressos quando transcritos em concentrações 2x maior que o gene de referência.

TabelaA1 – Iniciadores empregados na técnica de qPCR

Iniciador	Sequência (5' - 3')	Número acesso no GenBank ou referencia
OprF	F - GCGGCTCGATCGGTTACTT R - CGTCATGGTACTCACCGTAGGA	NP_250468.1
serine acetyltransferase hydrolase	F - CCGTTCGCTCGCCACTAC R - AAACATCTAAGTACCCTGAGGAAAAGA	ZP_15787657.1
	F -CGAAATTCCTTGGTCGGGTAA R - AGCGCCGCCATCGTTA	ZP_10486838.1
Alanine racemase	F - CGGATCGGGTGGTTCTGTAT R - GAGCCCCGGAGTACCTTTTATC	ZP_01680398.1
uracil-DNA glycosylase	F - CAGCCCCAGGATGTGATGA R - TCATATCGACGGCGGTGTT	ZP_01682025.1
hypothetical protein I	F - TACCCAGAAGTGCCGAGCAT R - CCTTTTTACGACGGACGTT	ZP_22178892.1
hypothetical protein II	F - TTACGGCCAGGGCTACACA R - CGGCTTGGCAACCCTTT	ZP_07663463.1
hypothetical protein III	F - GGATTAGCCCTTAAGCTTCATTGA R - CACTATGGCCGCACTTTCCA	YP_001949471.1
rpsL	F - GCAAGCGCATGGTTCGACAAGA R - CGCTGTGCTCTTGCAGGTTGTGA	Dumas et al., 2006
ampC	F - CGGCTCGGTGAGCAAGACCTTC R - AGTCGCGGATCTGTGCCTGGTC	Dumas et al., 2006
mexA	F - CGACCAGGCCGTGAGCAAGCAGC R - GGAGACCTTCGCCGCGTTGTCGC	Dumas et al., 2006
oprD	F -ATCTACCGCACAAACGATGAAGG R - GCCGAAGCCGATATAATCAAACG	Dumas et al., 2006
lexA	F GGATCAATCCCGCCTTCTTC R - AAGCGTTTCACCGTGACCTC	Liu et al., 2013

F, *forward* R, *reverso*

REFERÊNCIAS

- ARAKAWA, Y. et al. Convenient test for screening metallo-beta-lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v.38, n.1, p.40-43, 2000.
- BAUER, A.W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, Philadelphia, v. 45, n. 4, p. 493-6, 1966.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**: Seventeenth Informational Supplement. Document M100-S-17, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, 2007. 177 p.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**: Eighteenth Informational Supplement. Document M100-S-18. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, 2008. 181 p.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**: Nineteenth Informational Supplement. Document M100-S19. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, 2009. 149 p.
- CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**. Approved Standard Ninth Edition. Document M7-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, USA, 2012.65p.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility**. Twenty-third Informational Supplement. document M100-S23. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, USA, 2013. 199p.
- DEL SAL G, MANFIOLETTI G, SCHNEIDER C. The CTAB-DNA precipitation method: a common mini-scale preparation of template DNA from phagemids, phages or plasmids suitable for sequencing. **Biotechniques**, London, v. 7, p. 514-20, 1989
- DUMAS, J.L. et al. Analysis of antibiotic resistance gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* by quantitative real-time-PCR. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 254, p. 217-25, 2006.
- LIM, T.P. et al. Effective antibiotics in combination against extreme drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with decreased susceptibility to polymyxin B. **PLoS One**, San Francisco, v.6, n. 12, p. e28177, 2011.
- LIU X, et al. Green tea polyphenols function as prooxidants to inhibit *Pseudomonas aeruginosa* and induce the expression of oxidative stress-related genes. **Folia Microbiologica**, New York, v. 58, p. 211-7, 2013

PILLAI, S.K, MOELLERING JR, R.C.; ELIOPOULOS, G.M. Antimicrobial Combinations. In Lorian V (ed.), **Antibiotics in Laboratory Medicine**, Fifth edition ed. Lippincott Williams & Wilkins: New York, p. 365-440, 2005.

ODDS FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 52, p. 1, 2003.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning: a Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory, 2001, 86p.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, Washington, DC, v 74, n 12, p.:5463-7, 1977.

SNEATH, P.H.A., SOKAL, R.R. **Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification**. San Francisco: Freeman, 1973. 573 p.

SWANENBURG, M. et al. Validation of ERIC PCR as a tool in epidemiologic research of *Salmonella* in slaughter pigs. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.21, p.141-144, 1998.

SZCZUKA, E.; KAZNOWSKI, A. Typing of Clinical and Environmental *Aeromonas* sp. Strains by Random Amplified Polymorphic DNA PCR, Repetitive Extragenic Palindromic PCR, and Enterobacterial repetitive intergenic Consensus Sequence PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v.42, n.1, p.220-228, 2004.