

Sónia Margarida dos Santos Gonçalves Pereira

## *Pseudomonas aeruginosa* em ambiente termal Prevalência e determinantes de patogenicidade

Dissertação de Doutoramento na área científica de Ciências Farmacéuticas, especialidade de Microbiologia e Parasitologia, orientada pela Senhora Professora Doutora Olga Maria Antunes Rodrigues Carvalho Cardoso, e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2013



• U



C •

FFUC FACULDADE DE FARMÁCIA  
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Sónia Margarida dos Santos Gonçalves Pereira

# *Pseudomonas aeruginosa* em ambiente termal

## Prevalência e determinantes de patogenicidade

Dissertação de Doutoramento em Ciências Farmacêuticas, na especialidade de Microbiologia e Parasitologia,

apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

para obtenção do grau de Doutor

Orientadora: Prof. Doutora Olga Maria Antunes Rodrigues Carvalho Cardoso

Coimbra, 2013



**Ao Eduardo**

**À Filipa**

**À Luísa**

**Ao Márcio**





## Agradecimentos

Cumpro-me agradecer a todas as pessoas e instituições que direta ou indiretamente me apoiaram ao longo deste percurso pois sem elas não teria conseguido concretizar este sonho.

À Fundação para a Ciência e Tecnologia agradeço o apoio financeiro, através da bolsa de doutoramento que me atribuiu.

À CAMF agradeço a compreensão que manifestou, concedendo-me uma licença sem vencimento para a realização deste trabalho.

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, agradeço o acolhimento e a aceitação do meu projeto de doutoramento.

À Exma Senhora Professora Doutora Olga Cardoso agradeço primeiramente a pronta disponibilidade em orientar o meu trabalho de doutoramento, permitindo-me assim trabalhar com a "bactéria do meu coração". Agradeço também a orientação dedicada, paciente, atenta e calma que me facultou ao longo dos últimos quatro anos, bem como toda a confiança que sempre depositou no meu trabalho e nas minhas decisões. À Olga agradeço a amizade e toda a compreensão que sempre manifestou relativamente à minha condição de "tri-mãe". Bem-haja!

À Exma Senhora Professora Doutora Ana Cristina Rosa agradeço a enorme paciência que teve ao ensinar-me todos os mais pequenos pormenores estatísticos que constantemente perguntei e, sobretudo, o elevado empenho e alma que dedicou ao meu projeto, tornando-o seu também, duma forma por demais significativa. Agradeço ainda todas as ideias, e "arrumar de ideias" que me proporcionou, permitindo-me crescer um pouco neste mundo fascinante e desconhecido da Estatística.

À Exma Senhora Professora Doutora Leonilde Moreira, do Grupo de Investigação em Ciências Biológicas do Instituto Superior Técnico, agradeço a disponibilidade em me aceitar no seu laboratório para a realização dos ensaios de infeção aguda.

À Exma Senhora Doutora Ana Sofia Ferreira, do Grupo de Investigação em Ciências Biológicas do Instituto Superior Técnico, agradeço todos os ensinamentos práticos necessários à execução dos ensaios de infeção aguda, bem como todo o apoio que me prestou na análise dos resultados.

À Exma Senhora Professora Doutora Tice Macedo, da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, agradeço a gentileza com que prontamente aceitou em me facultar toda a sua documentação, pessoal e institucional, relativa ao termalismo.

Às Exmas Senhoras Professoras do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia agradeço a forma calorosa com que me acolheram quando cheguei a esta casa e ainda todas as conversas mais ou menos científicas e partilhas de ideias que fomos tendo.

Aos restantes Senhores Professores do piso 2 agradeço a forma simpática como sempre me acolheram.

Aos meus colegas do Laboratório de Microbiologia agradeço toda a simpatia e generosidade, todas as conversas, todas as partilhas de ideias, todos os pcs desligados e todas as placas tiradas da estufa. À Sara, em particular, agradeço todas as "viagens" que fez à Noruega para me "arranjar" uma série de artigos que não consegui obter em terras lusas.

Às colegas do Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Farmácia agradeço a simpatia com que me acolheram na sua casa, ajudando-me a torná-la também minha. À Joana e à Carla agradeço sobretudo a pronta disponibilidade em me ajudarem na realização das eletroforeses e transferências proteicas que executei ao longo do meu trabalho.

À Irene agradeço a sua boa disposição e o esforçado "portunhol", reflexo do seu empenho e entusiasmo no trabalho que desenvolvemos, e que foram por demais importantes naqueles dias, ou noites, em que, juntas, fechámos as portas da Faculdade...

Às funcionárias do piso 2, agradeço toda a colaboração no que lhes fui solicitando ao longo do meu trabalho, por mais exagerada que possa ter sido.

Ao Eduardo, à Filipa e à Luísa agradeço todos os dias da vossa vida! Que tanto preenchem a minha! Agradeço todas as alegrias que me proporcionam, bem como todas as preocupações que me trazem, pois com elas ajudam-me também a crescer como pessoa, e a ajudar-vos a vós a crescer também. Assim espero... Agradeço todos os vossos sorrisos e as vossas travessuras! E perdoem-me por todas as vezes que não tenho paciência para elas. Sem vocês nada era! Espero que num futuro mais ou menos próximo, ou distante, não sei, consigam entender todas as ausências que fui tendo ao longo dos últimos tempos, para terminar a tese, que “não sei bem o que é, mas quando a acabares já sei que vais ter mais tempo para mim”.

Ao Márcio agradeço o Amor, a Compreensão e a Paciência que sempre teve ao longo destes últimos quatro árduos anos, e não só. Agradeço a confiança e o “salto no vazio” que juntos demos nesta minha aventura, e em todas as outras desventuras da nossa Vida. Que sejam sempre por uma boa causa, mesmo quando nos pareça tão difícil entendê-las.

À minha mãe agradeço todos os valores que me transmitiu e toda a confiança que em mim sempre depositou e que, seguramente, me ajudaram a ser quem sou. A sua força e perseverança são para mim um enorme testemunho de vida!

À minha irmã agradeço o apoio que sempre me deu, desde pequenina, e que também muito contribuiu para o meu percurso pessoal e académico. Agradeço a maneira comedida como sempre valoriza todos os momentos importantes das nossas vidas!

À família do Márcio, agora minha também, agradeço o carinho que me prestam, e que espero conseguir minimamente retribuir. Em particular à mãe do Márcio (porque sogra é uma palavra feia) agradeço o exemplo de amor sempre disponível!

Aos meus amigos, “família escolhida”, agradeço terem convosco um pedaço do meu coração e eu um pedaço do vosso. Agradeço todas as nossas conversas e confidências de há longos anos, e que seguramente também me ajudaram a construir-me como pessoa. Agradeço também saberem entender as ausências que eu tive nestes últimos anos. Agradeço-vos a Amizade!

À Elvira, além da amizade, em particular agradeço todas as ajudas práticas que me prestou antes e durante o doutoramento, em todos aqueles pormenores que lhe fui, e vou, recorrentemente pedindo. A sua eficiência, profissionalismo e empenho são absolutamente “remarkable”. Mais pessoas iguais fazem falta a este país!

Ao Sr Dr Vasco Jorge de Almeida agradeço o contributo para a caracterização dos tratamentos termais, incluído na Introdução do presente trabalho. Agradeço, sobretudo, a elevada consideração demonstrada através dessa importante ajuda à distância.

Ao Miguel agradeço, para além da amizade, a paciente construção do esquema incluído nos Materiais e Métodos deste trabalho.

Ao Exmo Senhor Doutor Matos Dias presto a minha mais elevada consideração e estima! Como sinto saudades dos seus constantes ensinamentos que me foi prestando ao longo de mais de dez anos, em áreas tão díspares como a geologia, a hidrologia e a economia, para além do enorme bom senso e do saber ser profissional e pessoal! Agradeço também a confiança que em mim sempre depositou! E todo o empenho que colocou para me ajudar na concretização deste sonho doutoral.

Ao Senhor Henrique Silva agradeço todos os ensinamentos técnicos de hidráulica e eletricidade que sempre me transmitiu com tanto entusiasmo e paciência. Também mais profissionais igualmente empenhados e competentes fazem falta ao nosso país!

Por último, “last but not the least”, à fotógrafa surreal, e surrealista, Fátima Roque, agradeço, entre outras coisas, a construção da capa deste trabalho (onde incluo a preciosa colaboração da sua amiga Luzia Maninha) bem como todas as pacientes orientações técnicas “across the ocean” para fazer de mim uma pseudo-fotógrafa profissional, por breves instantes, de modo a conseguir usar a fonte de energia universal para capturar a ligação, intrínseca já, entre a bactéria e a microbióloga e a água termal...

Um enorme Bem-haja a todos! É a vós que dedico este trabalho.

Ao Pai.

O trabalho contido nesta tese foi desenvolvido no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Bioengenharia do Instituto Superior Técnico – Universidade Técnica de Lisboa.

O trabalho foi financeiramente suportado pela bolsa de doutoramento SFRH/BD/46668/2008, atribuída pela Fundação para a Ciência e Tecnologia.





**Tanto Quanto**







---

## RESUMO



O termalismo é uma prática terapêutica secular, reconhecida pela Organização Mundial da Saúde, onde a medicina se une à natureza para o tratamento de diversas patologias usando água mineral natural, sujeita a critérios de qualidade microbiológica que minimizem os riscos para a saúde do utente.

*Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria patogénica oportunista cujo habitat natural é a água, incluindo ambientes oligotróficos como é o caso da água mineral natural. Esta bactéria é reconhecida pela sua elevada capacidade de adquirir resistência a antibióticos e pela diversidade de características morfológicas e fisiológicas, designadas por fatores de virulência, que lhe confere a capacidade de colonizar virtualmente todos os tecidos humanos, sendo hoje o quinto agente patogénico mais significativo à escala mundial, associado sobretudo a patologias respiratórias. Em termos ecológicos, a sua ubiquidade é assegurada por uma elevada diversidade metabólica e pela capacidade de formar biofilmes em diversas superfícies abióticas, o seu estado ecológico mais frequente.

Não havendo uma diretiva europeia específica ao setor termal, é deixado a cada estado membro a autonomia para legislar sobre o mesmo. A legislação portuguesa atual que regulamenta este setor obriga à pesquisa regular de *P. aeruginosa* na água mineral natural, mas descarta a sua presença em biofilmes presentes no interior dos equipamentos termais, de onde esta se pode libertar durante o tratamento e alcançar o utente. Esta possibilidade é particularmente preocupante quando se considera a realização de tratamentos termais destinados a patologias do foro respiratório. O presente trabalho visa estudar a prevalência, a diversidade genética, a carga virulenta e capacidade infetiva, a resistência a antibióticos e a agentes desinfetantes e o potencial de disseminação de genes de virulência e de resistência em isolados de *P. aeruginosa* planctónicos e de biofilmes presentes nos equipamentos termais associados a tratamentos respiratórios, comparando-os a isolados clínicos de *P. aeruginosa* associados a infeções respiratórias. Pretende-se assim demonstrar a necessidade de adequação da legislação atual à realidade ecológica e de saúde pública dos sistemas de distribuição e utilização da água mineral natural no setor do termalismo.

Os isolados termais planctónicos, recolhidos ao longo de 4 anos num sistema de captação e distribuição de água mineral natural de um estabelecimento termal português, distribuíram-se homogeneamente pelos diversos locais do sistema, tendo sido obtidos sobretudo no primeiro ano de amostragem. Os isolados de biofilmes recolhidos da superfície interna das peças de um exemplar de cada tipo de equipamento termal foram proporcionalmente mais prevalentes, uma vez que apenas uma pequena parte desses isolados foi preservada, representando 1/3 do total dos isolados termais obtidos. Observou-se uma elevada diversidade genética da população termal e a persistência, disseminação e diversidade ecológica de alguns clones. A caracterização fenotípica dos isolados termais e clínicos demonstrou a maior prevalência dos 12 fenótipos estudados na população termal, não se verificando o mesmo quanto ao conteúdo genético, dado que 2/3 dos 19 genes de virulência estudados se apresentaram homogeneamente distribuídos nas duas populações. Ao analisar a estrutura de relações entre os diversos fatores de virulência

foi possível observar que a população termal apresentou mais associações das características de virulência entre si, mas que estas foram mais fracas que as observadas na população clínica. Foi ainda possível demonstrar diferenças na carga virulenta dos isolados termais em função do seu local de origem, em particular os de biofilmes, o que sugere possíveis riscos diferentes para os utentes em função dos tratamentos que executam. Quanto à capacidade de causar infeção aguda em larvas de *Galleria mellonella*, determinou-se uma capacidade média semelhante entre os isolados das duas populações, no entanto, individualmente, alguns isolados termais apresentaram maior infetividade que os clínicos. Os isolados termais foram mais resistentes à desinfeção química, por cloração, e física, por emissão ultravioleta, sendo os isolados de biofilmes mais sensíveis à radiação ultravioleta que os planctónicos. Os isolados termais apresentaram-se ainda suscetíveis a todos os antibióticos testados, tendo ocorrido alguns mutantes resistentes ao imipenemo, sobretudo em isolados de biofilmes, através da diminuição da produção da porina OprD. Não se observaram plasmídeos em nenhum isolado das duas amostras estudadas e a presença de ilhas genómicas apresentou-se heterogeneamente distribuída nas duas populações. A amostra clínica evidenciou maior prevalência de integrões de classe 1 que a amostra termal, onde apenas um integrão de classe 1 foi detetado, pela primeira vez em *P. aeruginosa*, num circuito secundário da piscina terapêutica.

O presente estudo demonstrou a prevalência de *P. aeruginosa* em biofilmes dos equipamentos termais, diferenças da sua carga virulenta em função dos equipamentos que colonizam, elevada capacidade infetiva e mutacional para se adaptarem à presença de imipenemo e uma menor resistência à radiação ultravioleta que os isolados planctónicos. Considerando estes resultados, sugere-se a realização de estudos semelhantes noutros estabelecimentos termais portugueses e europeus, a fim de melhor suportar as evidências ora encontradas e com isso promover a discussão sobre a necessidade de alterar a legislação portuguesa atual. Uma discussão similar ao nível europeu deveria também ser iniciada para fomentar a criação de uma diretiva europeia comum a todos os estados membros, que regulamente esta atividade, de modo a garantir adequadamente a segurança microbiológica da prática termal europeia.



---

## ABSTRACT





Hydrotherapy is a secular therapeutic practice recognized by the World Health Organization, where medicine meets nature to treat several diseases through the use of natural mineral water, which is subjected to microbiological quality criteria that ensure the health of hydrotherapy users.

*Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen with the water as its natural habitat, including oligotrophic waters like natural mineral water. This bacterium is known for its high ability to acquire antibiotic resistance and for the diversity of morphological and physiological characteristics, called virulence factors, that allows it to virtually colonize all human tissues, being now the fifth most frequent pathogen worldwide, especially associated with respiratory diseases. In ecological terms, its ubiquity is ensured by a high metabolic diversity and ability to form biofilms on various abiotic surfaces, its most frequent ecological status.

The absence of a European directive specific to hydrotherapy sector leaves each state member the autonomy to legislate on it. The current Portuguese legislation controlling hydrotherapy activity requires the regular survey of *P. aeruginosa* in the natural mineral water used in *thermae* facilities, but neglects its presence in biofilms inside the treatment equipments, from where they can loosen up during treatment and reach the users. This possibility is of high concern when considering inhalation treatments used to cure or improve respiratory conditions. Present work aimed to study the prevalence, genetic diversity, virulence load and infective ability, resistance to antibiotics and disinfectants and spread potential of virulence and resistance genes in planktonic and biofilm *P. aeruginosa* isolates, and to compare them to clinical isolates collected from respiratory infections. With this we intend to demonstrate the need of a revision in the current Portuguese legislation of hydrotherapy activity, so that it may be more adjusted to the ecological reality and public health assurance of the natural mineral water distribution and usage system of the *thermae* facilities.

Planktonic *thermae* isolates, collected over four years in a natural mineral water adduction and distribution system, were homogeneously distributed through the various locations in the system, being obtained mainly in the first year of sampling. The biofilm isolates, collected from the inner parts of one of each treatment equipment type present in the *thermae* facility, were proportionally more prevalent, since only one small part of these isolates were preserved, representing 1/3 of total *P. aeruginosa thermae* isolates obtained for the study. We observed a high genetic diversity of *thermae P. aeruginosa* population, as well as time persistence, spread and ecological diversity of some clones. The 12 studied phenotypic features were more prevalent in *thermae* population. This was not observed when considering the genetic virulence pool of the isolates, since 2/3 of the 19 studied virulence genes were homogeneously distributed in both populations. *Thermae* isolates presented more associations of the virulence features with each other, but those associations were weaker than the ones observed in the clinical isolates. We also demonstrated a heterogeneous virulence pool according to location in the *thermae* isolates, particularly in the biofilm isolates, suggesting different potential risks to the users according to the treatments they perform. Infective ability, tested on *Galleria mellonella* larvae model, was similar, on average, in *thermae* and clinical isolates. However,

individually some *thermae* isolates showed higher infective ability than the clinical ones. *Thermae* isolates were more resistant to chemical and physical disinfection, by chlorination and ultraviolet radiation, respectively. Biofilm isolates were more sensitive to ultraviolet light than the planktonic. The majority of the *thermae* isolates were susceptible to all tested antibiotics. Imipenem resistance mutation was detected in some isolates, mainly from biofilms, by diminished production of porin OprD. Plasmids were not observed in any of the studied samples and genomic islands were heterogeneously distributed between them. Clinical isolates had a higher prevalence of class 1 integrons than the *thermae* sample, where only one class 1 integron was detected, for the first time in *P. aeruginosa*, in one planktonic isolate of the secondary circuit of the therapy pool.

Present study demonstrated that *P. aeruginosa* is more prevalent in the treatment equipments biofilms than in planktonic forms in the *thermae* system and differences in the virulence load of biofilm isolates according to the treatment equipments that they are colonizing. We also observed high infective ability and mutation capacity to adapt to imipenem in these isolates and a lower resistance to ultraviolet radiation when compared to planktonic isolates. According to these results, we suggest that similar studies in other Portuguese and European *thermae* should be carried out, to confirm the evidence now found and to promote the necessary discussion to amend the current Portuguese law. A similar discussion, at European level, should also be initiated to promote the creation of a European policy common to all state members, to regulate this health-care activity, in order to properly ensure the microbiological safety of the European hydrotherapy practice.



---

## **ACRÓNIMOS E ABREVIATURAS**



ACM – análise de correspondências múltiplas  
ADN – ácido desoxirribonucleico  
ADP – adenosina-difosfato  
AHL – acil-homoserinas-lactonas  
AMP – adenosina-mono-fosfato  
AMK – amicacina  
AMN – água mineral natural  
ARN – ácido ribonucleico  
ATCC – American Type Culture Collection  
AZT – aztreonamo  
BLAST – Basic local alignment search tool  
BSA – albumina bovina sérica  
CAZ – ceftazidima  
CDC – Center for Disease Control and Prevention  
CIP – ciprofloxacina  
CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute  
CMI – concentração mínima inibitória  
DGEG – Direção Geral de Energia e Geologia  
DGS – Direção Geral da Saúde  
DL – Decreto-Lei  
DO – densidade ótica  
DR – Decreto regulamentar  
EARS – European antimicrobial resistance surveillance network  
ECDC – European Centre for Disease Prevention and Control  
EDTA – ácido etineldiaminotetracético  
EGM – elemento genético móvel  
ESBL – beta-lactamases de espectro alargado  
ESCMID – European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases  
EUA – Estados Unidos da América  
FEP – cefepima  
FV – fator(es) de virulência  
GTP – guanosina-trifosfato  
IC – intervalo de confiança  
IDSA – Infectious Diseases Society of America  
IP – imipenemo  
LB – meio de cultura Luria-Bertani  
LD<sub>50</sub> – dose letal para 50% de indivíduos testados  
LPS - lipopolissacarídeo  
MBL – metalo-beta-lactamases  
MDR – multirresistente ou multirresistência  
MH – meio de cultura Müller Hinton  
MLST – multilocus sequence typing  
MP – meropenemo  
MYSTIC – Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection

NCBI – National Center for Biotechnological Information  
NCTC – National Collection of Type Cultures  
NPPC – *p*-nitrofenilfosforilcolina  
OR – *odds ratio*  
ORF – open reading frames  
ORL – otorrinolaringologia ou otorrinolaringológico  
OXA – oxacilinase  
PAO1 – *Pseudomonas aeruginosa* 1  
PAGI – *Pseudomonas aeruginosa* genomic Island  
PAPI – *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity Island  
pb – pares de bases  
PB – tampão fosfato  
PBS – tampão fosfato salino  
PCR – polymerase chain reaction  
PDR – pan-resistente ou pan-resistência  
PFGE – Pulsed-field gel electrophoresis  
PIP – piperacilina  
ppm – partes por milhão  
QRDR – região determinante para a resistência às quinolonas  
QS – *quorum sensing*  
RAPD – random amplified polymorphic DNA  
RLM – análise de regressão logística múltipla  
RND – resistência-nodulação-divisão  
rpm – rotações por minuto  
SIDA – síndrome de imunodeficiência adquirida  
SDS – sodium dodecyl sulfate  
SDS-PAGE – sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis  
T1SS – sistema secretório do tipo I  
T2SS – sistema secretório do tipo II  
T3SS – sistema secretório do tipo III  
T5aSS – sistema secretório do tipo Va  
T5bSS – sistema secretório do tipo Vb  
T6SS – sistema secretório do tipo VI  
TE – tampão Tris-HCl-EDTA  
TBE – tampão Tris-borato-EDTA  
TCS – two component systems  
TGH – transferência genética horizontal  
TS – meio de cultura líquido Trypticase de soja  
TSA – meio de cultura sólido Trypticase de soja  
UCI – Unidade(s) de cuidados intensivos  
UFC – unidades formadoras de colônias  
UPGMA – unweighted pair group method with arithmetic mean  
UV – radiação ultravioleta  
XDR – extensamente-resistente ou resistência-extensa



---

## ÍNDICES





# ÍNDICE GERAL

<b>I. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>I</b>
0. Infecção: quem e como .....	3
1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> : formidável bactéria, perigosa ameaça.....	7
1.1. Aspectos históricos, filogenéticos e biológicos .....	7
1.2. Epidemiologia.....	9
1.3. Virulência.....	12
1.3.1. Tipos de fatores de virulência.....	13
1.3.1.1. Componentes de superfície da parede celular .....	13
1.3.1.1.1. Flagelos e <i>pili</i> .....	14
1.3.1.1.2. Lipopolissacarídeo.....	14
1.3.1.1.3. Alginato.....	14
1.3.1.1.4. Sistemas secretórios .....	15
1.3.1.2. Fatores de virulência segregados .....	16
1.3.1.2.1. Lectinas .....	17
1.3.1.2.2. Toxinas.....	17
1.3.1.2.3. Proteases .....	17
1.3.1.2.4. Lipases .....	18
1.3.1.2.5. Ramnolípidos.....	19
1.3.1.2.6. Hemolisinas .....	19
1.3.1.2.7. Pigmentos.....	19
1.3.1.2.8. Sideróforos .....	20
1.3.1.2.9. Proteínas T3SS efetoras .....	21
1.3.1.3. Outros fatores de virulência, <i>sensu lato</i> .....	22
1.3.1.3.1. Biofilmes.....	22
1.3.1.3.2. <i>Quorum sensing</i> .....	24
1.4. Resistência a antibióticos.....	25
1.4.1. Epidemiologia da resistência antibiótica.....	26
1.4.2. Mecanismos de resistência .....	29
1.4.2.1. Diminuição da permeabilidade da parede celular.....	29
1.4.2.1.1. Diminuição da produção da porina OprD .....	30
1.4.2.1.2. Produção de bombas de efluxo .....	30
1.4.2.2. Produção de enzimas inativadoras de antibióticos.....	31
1.4.2.2.1. Beta-lactamases.....	32
1.4.2.2.2. Enzimas modificadoras de aminoglicosídeos.....	33
1.4.2.3. Modificações dos alvos bacterianos.....	33

1.5. Disseminação de fatores de virulência e resistência a antibióticos.....	34
1.5.1. Ilhas genómicas .....	34
1.5.2. Integrões .....	35
1.5.3. Transposões e sequências de inserção.....	35
1.5.4. Bacteriófagos .....	36
1.5.5. Plasmídeos.....	36
2. Termalismo: <i>Sanum per aquam</i> .....	39
2.1. História do termalismo europeu e nacional .....	39
2.2. Terapia termal: princípios, indicações e contra-indicações .....	41
2.3. Principais técnicas termais.....	44
2.4. Caracterização do termalismo europeu e nacional .....	46
2.5. Normas europeias e legislação portuguesa associada ao termalismo.....	49
2.5.1. Segurança microbiológica nos estabelecimentos termais.....	51
3. Objetivos do presente trabalho.....	53

## **II. MATERIAIS E MÉTODOS ..... 55**

0. Breve caracterização técnica do estabelecimento termal.....	57
1. Origem, identificação, isolamento e preservação dos isolados .....	59
2. Seleção de amostras e estudos de diversidade genética .....	61
2.1. Seleção das amostras para estudo .....	61
2.2. Genotipagem das amostras .....	61
2.2.1. Amplificação aleatória de ADN polimórfico (RAPD) .....	61
2.2.1.1. Separação eletroforética dos produtos de RAPD.....	62
2.2.1.2. Análise e interpretação dos perfis eletroforéticos de RAPD.....	62
2.2.2. Eletroforese em campo pulsado (PFGE).....	62
2.2.2.1. Preparação dos discos.....	63
2.2.2.2. Digestão enzimática do ADN.....	63
2.2.2.3. Preparação do gel para separação eletroforética dos fragmentos de ADN .....	64
2.2.2.4. Separação dos fragmentos digeridos de ADN por eletroforese em campo pulsado.....	64
2.2.2.5. Análise e interpretação dos perfis eletroforéticos de PFGE.....	64
3. Pesquisa de fatores de virulência.....	65
3.1. Pesquisa fenotípica de fatores de virulência .....	65
3.1.1. Componentes da superfície celular .....	65
3.1.1.1. Mobilidade .....	65
3.1.2. Fatores de virulência segregados .....	66
3.1.2.1. Pesquisa de proteases .....	66
3.1.2.1.1. Atividade elastolítica.....	66

3.1.2.1.2. Atividade proteolítica .....	66
3.1.2.2. Pesquisa de lipases.....	66
3.1.2.3. Pesquisa de ramnolípidos .....	67
3.1.2.4 Pesquisa de hemolisinas.....	67
3.1.2.4.1. Degradação de lecitina .....	67
3.1.2.4.2. Pesquisa semi-quantitativa de fosfolipase C.....	67
3.1.2.5. Pesquisa de pigmentos: piocianina .....	68
3.1.2.6. Pesquisa semi-quantitativa de sideróforos: pioverdina .....	68
3.1.3. Outras características com influência na virulência.....	69
3.1.3.1. Pesquisa semi-quantitativa da produção de biofilmes.....	69
3.2. Pesquisa genotípica de fatores de virulência .....	70
3.2.1. Extração de ADN.....	70
3.2.2. Reação de polimerização em cadeia (PCR).....	70
3.2.3. Separação eletroforética dos produtos de amplificação.....	72
3.2.4. Análise e interpretação dos resultados .....	72
3.2.5. Purificação e concentração dos produtos de amplificação para sequenciação .....	72
3.2.6. Análise e interpretação dos resultados da sequenciação .....	72
4. Estudos de infecção aguda .....	73
4.1. Seleção das amostras para estudo.....	73
4.2. Ensaios de infecção aguda em larvas de <i>Galleria mellonella</i> .....	73
4.2.1. Determinação da concentração celular das suspensões bacterianas.....	73
4.2.2. Injeção das larvas .....	73
4.2.3. Determinação da dose letal para 50% das larvas testadas (LD <sub>50</sub> ) .....	74
5. Ensaios de resistência à desinfecção.....	75
5.1. Ensaios de resistência à desinfecção química por hipoclorito de sódio.....	75
5.2. Ensaios de resistência à desinfecção física por radiação ultravioleta.....	76
6. Determinação da suscetibilidade a antibióticos .....	77
6.1. Método de difusão em disco.....	77
6.2. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI).....	77
6.3. Pesquisa da diminuição da expressão da porina OprD.....	78
6.3.1. Extração das membranas externas da parede celular .....	78
6.3.2. Separação eletroforética das proteínas da membrana externa por SDS-PAGE.....	79
6.3.2.1. Quantificação proteica e desnaturação das amostras.....	79
6.3.2.2. Separação eletroforética das amostras.....	80
6.3.2.3. Revelação dos géis e interpretação dos resultados .....	80
7. Pesquisa de elementos genéticos móveis .....	81
7.1. Pesquisa genotípica de ilhas genómicas .....	81
7.2. Pesquisa genotípica de integrões .....	81

7.3. Pesquisa de plasmídeos .....	82
7.3.1. Extração e detecção de plasmídeos pelo método de Crosa <i>et al.</i> (1994).....	82
7.3.2. Detecção de plasmídeos pelo método de Barton <i>et al.</i> (1995) .....	83
8. Análise estatística .....	85

### **III. RESULTADOS ..... 87**

1. Descrição e diversidade genética das amostras em estudo.....	89
1.1. Amostra termal .....	89
1.1.1. Prevalência e distribuição dos isolados termais.....	89
1.1.2. Diversidade genética da população termal .....	90
1.1.2.1. Diversidade genética estudada por RAPD .....	90
1.1.2.2. Diversidade genética estudada por PFGE .....	92
1.2. Amostra clínica.....	95
1.2.1. Prevalência e distribuição dos isolados clínicos.....	95
1.2.2. Diversidade genética da população clínica .....	95
2. Fatores de virulência .....	99
2.1. Seleção das amostras para estudo .....	99
2.2. Fenótipos associados à virulência.....	99
2.2.1. Distribuição e prevalência .....	99
2.2.1.1. Entre amostras e entre populações.....	99
2.2.1.2. Intra-amostras e intra-populações.....	101
2.2.2. Relações globais entre os fenótipos de virulência .....	103
2.2.2.1. Amostra termal e inferência para a população termal .....	103
2.2.2.2. Amostra clínica e inferência para a população clínica .....	104
2.3. Genes associados à virulência.....	107
2.3.1. Distribuição e prevalência .....	107
2.3.1.1. Entre amostras e entre populações.....	107
2.3.1.2. Intra-amostras e intra-populações.....	108
2.3.2. Relações globais entre os genes associados à virulência .....	109
2.3.2.1. Amostra termal e inferência para a população termal .....	109
2.3.2.2. Amostra clínica e inferência para a população clínica .....	112
3. Capacidade de causar infecção aguda .....	115
4. Resistência à desinfecção .....	117
4.1. Resistência à desinfecção química por hipoclorito de sódio.....	117
4.2. Resistência à desinfecção física por radiação ultravioleta.....	118
5. Resistência a antibióticos.....	121
5.1. Resistência a antibióticos na amostra termal inicial .....	121

5.1.1. Mutantes resistentes ao IP .....	122
5.1.1.1. Diminuição da expressão da porina OprD .....	122
5.1.1.2. Diversidade genética dos mutantes IP-resistentes e respectivos isolados-mãe .....	123
5.1.1.3. Perfil de virulência dos mutantes IP-resistentes e respectivos isolados-mãe .....	123
5.2. Resistência a antibióticos na amostra clínica inicial .....	124
5.2.1. Prevalência e distribuição .....	124
5.2.2. Relações globais do comportamento dos isolados clínicos à presença de antibióticos .....	125
5.2.3. Previsão da resistência a antibióticos em função dos fatores de virulência .....	126
6. Elementos de mobilidade genética .....	128
6.1. Ilhas genômicas .....	128
6.1.1. Distribuição e prevalência .....	128
6.1.1.1. Entre amostras e entre populações .....	128
6.1.1.2. Intra-amostras e intra-populações .....	129
6.2. Integrrões .....	130
6.2.1. Distribuição, prevalência e similaridade .....	130
6.3. Plasmídeos .....	131
<b>IV. DISCUSSÃO .....</b>	<b>133</b>
1. Distribuição, persistência e diversidade genética de <i>P. aeruginosa</i> .....	137
2. Virulência e infecção .....	139
3. Desinfecção e antibióticos .....	149
3.1. Fatores de virulência como previsores da resistência a antibióticos .....	153
4. Mobilidade genética .....	155
5. Considerações finais .....	157
<b>V. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>159</b>



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Representação gráfica da teoria do dano-resposta.....	4
<b>Figura 2</b> – Esquema dos 5 sistemas secretórios em <i>P. aeruginosa</i> e modo de ação de cada um deles.....	16
<b>Figura 3</b> – Esquema representativo da formação e desenvolvimento de um biofilme de <i>P. aeruginosa</i> .....	23
<b>Figura 4</b> – Evolução ao longo de 41 anos da taxa de procura de terapêutica termal para os 3 principais grupos de doenças tratadas nos estabelecimentos termais portugueses.....	43
<b>Figura 5</b> – Exemplos de equipamentos e tratamentos termais.....	45
<b>Figura 6</b> – Evolução da frequência termal no decénio 2002 a 2011.....	46
<b>Figura 7</b> – Distribuição geográfica e classificação das águas minerais naturais em Portugal quanto à sua utilização económica.....	47
<b>Figura 8</b> – Distribuição dos utentes termais por sexo, em 2006.....	48
<b>Figura 9</b> – Distribuição dos utentes termais por faixa etária, em 2006.....	48
<b>Figura 10</b> – Distribuição percentual da procura do termalismo em função das patologias a tratar, em 2006.....	48
<b>Figura 11</b> – Representação esquemática do sistema de adução e distribuição da água mineral natural do estabelecimento termal.....	58
<b>Figura 12</b> – Proporção percentual da distribuição de <i>P. aeruginosa</i> pelo sistema de adução e distribuição da água mineral natural.....	90
<b>Figura 13</b> – Dendrograma formado a partir da análise automática dos padrões eletroforéticos obtidos através de PFGE nos 77 isolados termais de <i>P.aeruginosa</i> selecionados.....	92
<b>Figura 14</b> – Proporção percentual da distribuição de <i>P. aeruginosa</i> em função dos produtos biológicos de colheita.....	95
<b>Figura 15</b> – Dendrograma formado a partir da análise automática dos padrões eletroforéticos obtidos através de PFGE nos 76 isolados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> selecionados.....	96
<b>Figura 16</b> – Frequência relativa (%) dos fenótipos de virulência (a – nominais; b – ordinais) nas duas amostras de <i>P. aeruginosa</i> .....	100
<b>Figura 17</b> – Frequência relativa (%) dos fenótipos de virulência (a – nominais; b – ordinais) nas duas subamostras de isolados termais (esquerda) e clínicos (direita) de <i>P. aeruginosa</i> .....	101
<b>Figura 18</b> – Mapa percetual da ACM dos fenótipos de virulência da amostra termal de <i>P. aeruginosa</i> .....	103
<b>Figura 19</b> – Mapas percetuais da ACM dos fenótipos de virulência da amostra clínica de <i>P. aeruginosa</i> .....	105



<b>Figura 20</b> – Frequência relativa (%) dos genes associados a virulência nas duas amostras de <i>P. aeruginosa</i> . .....	107
<b>Figura 21</b> – Frequência relativa (%) dos genes associados a virulência nas duas subamostras de isolados termais (esquerda) e clínicos (direita) de <i>P. aeruginosa</i> . .....	108
<b>Figura 22</b> – Mapas perceptuais da ACM dos genes associados a virulência da amostra termal de <i>P. aeruginosa</i> . ...	110
<b>Figura 23</b> – Mapas perceptuais da ACM dos genes associados a virulência da amostra clínica de <i>P. aeruginosa</i> . ...	113
<b>Figura 24</b> – Frequência relativa (%) do crescimento às 24 e 48 horas de incubação dos isolados termais (esquerda) e clínicos (direita) de <i>P. aeruginosa</i> após incidência de UV durante 30 segundos e 1 minuto. ....	118
<b>Figura 25</b> – Frequência relativa (%) do crescimento às 24 e 48 horas de incubação dos isolados termais de <i>P. aeruginosa</i> em função dos seus locais de origem após incidência de UV durante 30 segundos e 1 minuto. ....	119
<b>Figura 26</b> – Frequência relativa (%) do crescimento às 24 e 48 horas de incubação dos isolados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> em função dos seus locais de origem após incidência de UV durante 30 segundos e 1 minuto. ....	119
<b>Figura 27</b> – Exemplo de eletroforese SDS-PAGE das proteínas da membrana externa da parede celular de isolados-mãe de <i>P. aeruginosa</i> e respectivos mutantes resistentes a IP. ....	122
<b>Figura 28</b> – Exemplo de eletroforese de produtos de PCR-RAPD de isolados-mãe de <i>P. aeruginosa</i> e respectivos mutantes resistentes a IP. ....	123
<b>Figura 29</b> – Frequência relativa (%) da resistência aos diferentes antibióticos testados na amostra clínica de <i>P. aeruginosa</i> . ....	124
<b>Figura 30</b> – Proporção percentual do perfil de resistência por isolado na amostra clínica de <i>P. aeruginosa</i> . ....	125
<b>Figura 31</b> – Mapa perceptual da ACM do comportamento dos isolados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> à presença dos antibióticos. ....	125
<b>Figura 32</b> – Frequência relativa (%) dos genes representativos de PAGI1 ( <i>orf3</i> , <i>orf18</i> e <i>orf42</i> ), PAGI2 ( <i>c22</i> e <i>c105</i> ) e PAGI3 ( <i>sg8</i> e <i>sg100</i> ) nas duas amostras de <i>P. aeruginosa</i> . ....	128
<b>Figura 33</b> – Frequência relativa (%) dos genes representativos de PAGI1 ( <i>orf3</i> , <i>orf18</i> e <i>orf42</i> ), PAGI2 ( <i>c22</i> e <i>c105</i> ) e PAGI3 ( <i>sg8</i> e <i>sg100</i> ) nas duas subamostras de isolados termais (esquerda) e clínicos (direita) de <i>P. aeruginosa</i> . ....	129

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Principais mecanismos de resistência presentes em <i>P. aeruginosa</i> .....	29
<b>Tabela 2</b> – Fatores e efeitos da hidroterapia e da crenoterapia, bem como do ambiente termal. ....	41
<b>Tabela 3</b> – Indicações da terapêutica termal.....	42
<b>Tabela 4</b> – Tipos de equipamentos termais existentes no estabelecimento termal amostrado. ....	57
<b>Tabela 5</b> – <i>Primers</i> utilizados na pesquisa genotípica de fatores de virulência. ....	71
<b>Tabela 6</b> – <i>Primers</i> utilizados na pesquisa genotípica de ilhas genômicas. ....	81
<b>Tabela 7</b> – <i>Primers</i> utilizados na pesquisa genotípica de integrases.....	82
<b>Tabela 8</b> – Coleção de isolados de <i>P. aeruginosa</i> de origem termal preservados para o estudo. ....	89
<b>Tabela 9</b> – Identificação, data de colheita e perfil de RAPD dos 40 isolados termais de <i>P. aeruginosa</i> selecionados. ....	91
<b>Tabela 10</b> – Identificação, data de colheita e perfil de PFGE dos 77 isolados termais de <i>P. aeruginosa</i> selecionados. ....	93
<b>Tabela 11</b> – Identificação, data de colheita e perfil de PFGE dos 76 isolados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> selecionados. ....	97
<b>Tabela 12</b> – P-valor dos testes do qui-quadrado que demonstraram uma distribuição heterogênea estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) dos fenótipos de virulência nas duas populações de <i>P. aeruginosa</i> . ....	101
<b>Tabela 13</b> – P-valor dos testes do qui-quadrado de independência que demonstraram associações estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os fenótipos de virulência e respectivos valores do coeficiente Phi, na população clínica de <i>P. aeruginosa</i> . ....	104
<b>Tabela 14</b> – P-valor dos testes do qui-quadrado que demonstraram uma distribuição heterogênea estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) dos genes associados a virulência nas duas populações de <i>P. aeruginosa</i> . ....	108
<b>Tabela 15</b> – P-valor dos testes do qui-quadrado de independência que demonstraram associações estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os genes associados a virulência e respectivo valor do coeficiente Phi, na população termal de <i>P. aeruginosa</i> . ....	109
<b>Tabela 16</b> – P-valor dos testes do qui-quadrado de independência que demonstraram associações estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os genes associados a virulência e respectivo valor do coeficiente Phi, na população clínica de <i>P. aeruginosa</i> . ....	112
<b>Tabela 17</b> – LD <sub>50</sub> dos isolados termais e clínicos de <i>P. aeruginosa</i> . ....	115

<b>Tabela 18</b> – Número de isolados das amostras termal e clínica de <i>P. aeruginosa</i> que apresentaram uma concentração mínima inibitória de 1% (v/v), 0,5% (v/v) ou 0,25% (v/v) de hipoclorito de sódio.....	117
<b>Tabela 19</b> – CMI (em mg/l) dos antibióticos testados nos isolados de <i>P. aeruginosa</i> e respetivos mutantes.....	121
<b>Tabela 20</b> – Resultados dos modelos de regressão logística para o comportamento (resistência vs suscetibilidade) dos isolados clínicos de <i>P. aeruginosa</i> face aos diferentes antibióticos, em função dos fatores de virulência estatisticamente significativos. ....	126
<b>Tabela 21</b> – Identificação dos integrões de classe 1 detetados nos isolados clínicos, e no isolado termal, de <i>P. aeruginosa</i> e respetivas cassetes de genes.....	130





## **CAPÍTULO I**

---



## **INTRODUÇÃO**





## 0. Infecção: quem e como

Para poder causar infecção, uma bactéria tem que, cumulativamente, conseguir entrar no hospedeiro, evitar as suas defesas, crescer nesse ambiente hostil, neutralizar as respostas imunológicas do hospedeiro à sua presença, adquirir ferro e nutrientes a partir do ambiente onde se encontra e, ainda, detetar alterações que aí ocorram para poder responder adequada e atempadamente às mesmas, de modo a garantir a sua sobrevivência. Quando o resultado de todas estas adaptações causa danos ao hospedeiro, a bactéria é, então, considerada patogénica e estas características servem como uma medida relativa do dano que pode causar ao hospedeiro (Casadevall e Pirofski, 2009).

O conceito de patogenicidade ou virulência é um dos mais complexos em Microbiologia. O problema surge pelo facto de a virulência ser uma propriedade microbiana que só pode ser expressa num hospedeiro suscetível, não sendo, portanto, uma característica bacteriana independente, como é, por exemplo, a morfologia. Uma determinada característica bacteriana deve ser considerada um fator de virulência se contribuir para a virulência/patogenicidade da bactéria num determinado contexto de relação biológica com um hospedeiro e o papel dos dois, bactéria e hospedeiro, não podem ser dissociados. Várias teorias tentaram explicar este fenómeno centrando-se apenas na componente microbiana ou na componente hospedeiro, o que, ainda que sendo útil para o avanço do conhecimento científico (Falkow, 2004), limitou sempre a interpretação dos fenómenos de infecção.

Foi o próprio Falkow que, em 1988, adotando uma visão microbiana da virulência, estabeleceu que para uma substância produzida por uma bactéria ser considerada um fator de virulência/patogenicidade, deveria respeitar o que o autor chamou os postulados moleculares de Koch: ser codificada por um gene associado a uma estirpe que esteja a causar doença, estando na maioria dos casos ausente ou inativo em estirpes incapazes de causar doença; ser necessária para a virulência da estirpe, evidenciada pela perda de virulência quando a molécula é inativada, e por um aumento da virulência quando é expressa numa estirpe não-virulenta; e deve ainda ser expressa quando a bactéria está a causar doença (Falkow, 1988). Contudo, estes postulados não preenchem, na íntegra, a definição de fator de virulência (FV), uma vez que a bactéria pode não produzir um determinado FV aquando de uma infecção, por não lhe ser conveniente nessa circunstância fazê-lo, produzindo apenas aqueles que lhe permitirão sobreviver nas condições em que se encontra. Também, segundo alguns autores, os fatores de virulência são substâncias que a bactéria produz para sobreviver à predação em ambientes oligotróficos (Engel e Balachandran, 2009; Hauser, 2009), o que põe em causa o primeiro postulado, uma vez que estirpes não causadoras de doença podem produzir FV, importantes para a sua sobrevivência no contexto ecológico onde se encontram.

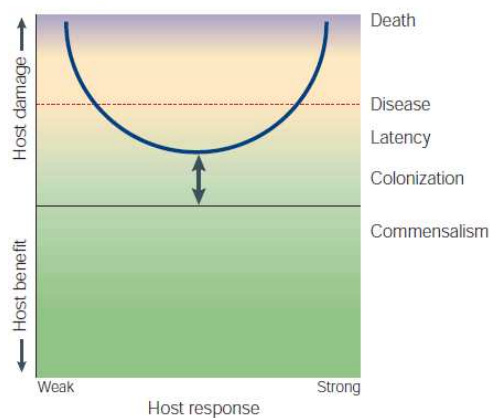
A emergência de doenças causadas pela microflora comensal de um hospedeiro ilustra bem a importância central que este também tem na patogenicidade bacteriana, uma vez que, em circunstâncias





normais, estes microrganismos não causam qualquer efeito pernicioso ao seu hospedeiro (Casadevall e Pirofski, 2009). Uma quebra nas defesas do hospedeiro pode motivar uma infecção causada pela sua microflora comensal e só nessa altura as substâncias produzidas por esses microrganismos são virulentas, ou seja, capazes de causar dano ao hospedeiro onde habitam, sendo que anteriormente as produziam sem qualquer prejuízo para o seu comensal.

Como resposta a estas supostas ambiguidades, Casadevall e Pirofski propuseram, e melhoraram ao longo do tempo, uma teoria sobre a patogénese microbiana, a que designaram “enquadramento do dano-resposta”, facultando uma visão que incorpora o contributo de ambos os intervenientes na patogénese microbiana. Segundo estes autores, a teoria baseia-se em 3 princípios que são evidentes por si mesmos e incontrovertidos: 1) a patogenia microbiana é o resultado da interação entre duas entidades, o micróbio e o hospedeiro; 2) o resultado relevante dessa interação é dano, ou prejuízo, para o hospedeiro; 3) esse dano pode ser o resultado da ação de fatores microbianos, da resposta do hospedeiro à presença e ação do micróbio, ou ambos (Casadevall e Pirofski, 2009). O dano não é, assim, um resultado estanque motivado apenas por um fator específico, mas pela combinação de um conjunto de fatores e deve ainda considerar o fator tempo, uma vez que é também dependente deste. Os autores sugerem, ainda, que o resultado da relação microrganismo-hospedeiro pode ser representado graficamente por uma parábola (figura 1), onde o dano máximo pode ocorrer em situações de respostas muito fracas ou muito fortes por parte do hospedeiro a um determinado fator expresso, em maior ou menor quantidade, pela bactéria. Numa resposta imune fraca, o dano é motivado sobretudo pelo fator expresso pela bactéria e numa resposta imune muito forte, o dano é motivado essencialmente pelo próprio hospedeiro. Esta representação, ainda que bastante elucidativa, tem também as suas limitações, no sentido de que não incorpora o fator tempo. Tal implicaria uma representação tridimensional, colocando num terceiro eixo o tempo, mas seria mais exata, uma vez que o dano no hospedeiro evolui também ao longo do tempo para um estado de maior ou menor gravidade, enviesando, assim, a parábola que descreve esta relação (Casadevall e Pirofski, 2009).



**Figura 1** – Representação gráfica da teoria do dano-resposta (adaptado de Casadevall e Pirofski, 2009).



*Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria oportunista, o que significa que habitualmente consegue infetar apenas hospedeiros com falhas nas suas defesas, causando infeções mais ou menos graves em função das suas capacidades virulentas, traduzidas pelos fatores de virulência que consegue expressar, mas, também, pelas respostas mais ou menos eficazes do hospedeiro com quem está a estabelecer a relação biológica. Este pormenor de regulação génica como resposta a sinais externos envolvidos no processo de infeção destaca, mais uma vez, a complexidade deste fenómeno, pois não só o hospedeiro reage à presença do patogénico, como o próprio patogénico reage à resposta do hospedeiro, num permanente equilíbrio/desequilíbrio de forças e estratégias de sobrevivência de ambas as partes (Casadevall e Pirofski, 2009).





# I. *Pseudomonas aeruginosa*: formidável bactéria, perigosa ameaça

## I.1. Aspetos históricos, filogenéticos e biológicos

O nome *Pseudomonas* foi proposto no final do século XIX por Migula, do Instituto Karlsruhe, Alemanha, apresentando uma descrição do género curta e imprecisa. Nos seus textos, lê-se apenas “células com órgãos de mobilidade polares. A formação de esporos ocorre nalgumas espécies, mas são raros (por exemplo: *Pseudomonas violaceae*)” (Palleroni, 2010). Migula não clarificou a etimologia da palavra, encontrando-se apenas na 7ª edição do “Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology”, de 1957, pela primeira vez, a descrição formal do nome: “Gr. adj. *pseudēs* falsa; Gr. n. *monas* uma unidade, mónada; M. L. fem. n. *Pseudomonas* uma falsa mónada”. Esta etimologia, apesar de quase telegráfica, foi literalmente transcrita por Doudoroff e Palleroni para a descrição do género na 8ª edição do manual, em 1984 e foi mantida inalterada na 1ª e 2ª edições do “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology”, de 1984 e 2005, respetivamente (Palleroni, 2010).

*Pseudomonas aeruginosa* é a espécie-tipo deste género. A etimologia do seu epíteto específico é apresentada como “ae.ru.gi.no’sa. L. fem. adj. *aeruginosa* cheia de ferrugem de cobre ou verdete, daí verde” (Palleroni, 2005), mas a sua utilização esteve envolta em polémica até 1967. Migula, aquando da descrição do género *Pseudomonas*, em 1894, classifica a espécie-tipo como *Pseudomonas pyocyanea*, devido à característica cor esverdeada das suas colónias, causada pelo pigmento piocianina. Mais tarde, Migula descobre os trabalhos de Schroeter realizados em 1872, em que este, apesar de não ter obtido culturas puras, descreve uma bactéria produtora de piocianina e classifica-a como *Bacterium aeruginosum*. Assim, reconhecendo a validade da classificação de Schroeter, Migula reclassifica, em 1900, a espécie-tipo do género *Pseudomonas* como *Pseudomonas aeruginosa* (Hugh e Lessel, 1967). Esta alteração não é adotada por toda a comunidade científica e o epíteto específico *pyocyanea* mantém-se até cerca de 1967, devido ao facto de alguns autores considerarem que o primeiro cientista a obter uma cultura pura da bactéria, Gessard, em 1882, sugeriu o epíteto *pyocyaneus* para a descrever (Hugh e Lessel, 1967). Contudo, essa vaga indicação feita por Gessard não cumpria as regras da nomenclatura e o facto de Schroeter não ter obtido culturas puras no seu trabalho, não invalida a classificação que apresentou, segundo o Código Internacional da Nomenclatura de Bactérias e Vírus (Hugh e Lessel, 1967). Assim, o uso do epíteto *pyocyanea*, apesar de se ter mantido até 1967, foi considerado errado por Hugh e Lessel (1967), que demonstraram na sua pesquisa a primazia do epíteto *aeruginosa*. A partir desse estudo, a Comissão Judicial do Comité Internacional da Nomenclatura Bacteriana adotou *aeruginosa* como epíteto específico da espécie-tipo do género *Pseudomonas* e colocou o epíteto *pyocyanea* como epíteto rejeitado, terminando assim a polémica em torno do epíteto específico desta bactéria.



A classificação sistemática de *Pseudomonas aeruginosa* situa-a no género *Pseudomonas*, da família Pseudomonadaceae, ordem Pseudomonadales, classe Gammaproteobacteria, do filo Proteobacteria, do Domínio Bacteria. O género *Pseudomonas* é o mais abundante e o mais significativo grupo de bactérias do nosso planeta em termos ecológicos, com os seus membros a serem encontrados em grande número na maioria dos principais ecossistemas naturais, terrestres e aquáticos e, também, em íntima associação com algumas plantas e animais (Spiers *et al.*, 2000). Recentemente, sugeriu-se ainda que *P. aeruginosa* é, de todas as espécies deste género, aquela com maior representação quantitativa no nosso planeta. A sua abundância e a sua importância tanto como um “pacífico” habitante de vários ecossistemas, como um pernicioso patogénico, traduz-se no enorme volume de literatura científica e técnica disponível acerca da sua fisiologia e patogenicidade (Klockgether *et al.*, 2008).

Conforme a descrição presente na 2ª edição do “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology” (Palleroni, 2005), *Pseudomonas aeruginosa* é um bastonete direito ou ligeiramente encurvado, com dimensões entre 1,5 e 5 µm de comprimento e 0,5 e 1 µm de largura, Gram-negativo, oxidase e catalase positivo, móvel por um flagelo polar, podendo, também, apresentar mobilidade em superfícies sólidas (conhecida por “twitching”), devido à ação de *pili* presentes na superfície da sua parede celular. Apresenta dois tipos principais de colónias em meios de cultura sólidos: colónias grandes, com margens lisas e centro elevado (tipo “ovo estrelado”) e colónias pequenas, rugosas e convexas. Os isolados clínicos apresentam habitualmente colónias do primeiro tipo e os isolados ambientais, colónias do segundo tipo. Um terceiro tipo de colónias, mucosas, é ainda observado em isolados de secreções respiratórias e urinárias, e foi descrito pela primeira vez por Sonnenshein, em 1927. Esta bactéria produz dois pigmentos fluorescentes, pioverdina e piocianina, que estão envolvidos na sua patogenicidade. Não consegue crescer em condições acídicas (inferiores a pH 4,5) e a sua temperatura ótima de crescimento é 37°C, conseguindo, contudo, crescer a 42°C, o que a distingue de todas as outras espécies do seu género. É aeróbica, com um metabolismo que utiliza apenas o oxigénio como recetor final de eletrões, podendo, na ausência de oxigénio, utilizar o nitrato como aceitador final de eletrões, mas nunca adotando uma via metabólica fermentadora. O seu habitat preferencial é a água, podendo encontrar-se também no solo e nalgumas plantas e animais. Em termos nutricionais, consegue crescer em meio mínimo, utilizando apenas um único composto orgânico como fonte de carbono e energia, mas também em meios enriquecidos, conseguindo utilizar uma enorme diversidade de fontes de carbono. É, também, uma bactéria patogénica para o Homem e, ocasionalmente, para as plantas, com uma conhecida resistência intrínseca a alguns antibióticos.

A estirpe-tipo está depositada nas coleções de cultura “American Type Culture Collection” (ATCC) com o número ATCC 10145, “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) com o número NCBI 8295 e “National Collection of Type Cultures” (NCTC) com o número NCTC 10332.



## 1.2. Epidemiologia

*Pseudomonas aeruginosa* está associada a um espectro cada vez mais alargado de infeções humanas (Kerr e Snelling, 2009). As infeções mais graves ocorrem em unidades de cuidados de saúde e incluem bacteriémias, pneumonias, escaras e infeções pós-operatórias, urinárias e gastrointestinais, para além de endocardites, osteomielites e meningites (Kerr e Snelling, 2009; Mena e Gerba, 2009). Alguns grupos de doentes estão mais expostos ao risco de infeção por *P. aeruginosa* do que outros, sobretudo os doentes neutropénicos, imunodeficientes, queimados e os que apresentam desarranjos metabólicos (Strateva e Mitov, 2011). Defesas diminuídas dos pacientes, como as causadas por incisões cirúrgicas, inserção de cateteres ou tubos endotraqueais, também aumentam a predisposição para uma infeção por *P. aeruginosa* (Kerr e Snelling, 2009). Os doentes de unidades de cuidados intensivos (UCI) são, assim, um grupo de elevado risco, devido à maior utilização de aparelhos invasivos nessas unidades e à sua doença primária. Doenças pulmonares como a doença pulmonar obstrutiva crónica, bronquiectasias e fibrose quística são também fatores de predisposição para uma infeção pulmonar causada por esta bactéria (Balasubramanian *et al.*, 2012). *P. aeruginosa* coloniza os pulmões de crianças com fibrose quística numa idade mediana de um ano de vida (Li *et al.*, 2005) e pode ser isolada da expetoração de cerca de 80% dos adultos com fibrose quística (Strateva e Mitov, 2011). Doentes com síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA) são também um grupo de risco, podendo contrair pneumonias e bacteriémias por *P. aeruginosa* (Kanj e Sexton, 2012). Meningites causadas por esta bactéria estão sobretudo associadas a doentes intervencionados cirurgicamente ou com tumores no pescoço e cabeça, tífites estão associadas a doentes com leucemia, e enterocolites necrosantes a doentes tumorais neutropénicos. Doentes queimados têm em *P. aeruginosa* a principal causa de infeções nas suas queimaduras. Nestes doentes, a mortalidade por bacteriémia associada a esta bactéria tem-se mantido constante nos últimos 25 anos (Mena e Gerba, 2009).

*P. aeruginosa* é, hoje, o quinto patogénico mais relevante à escala mundial, o segundo agente patogénico mais frequente nas pneumonias nosocomiais, o terceiro nas infeções urinárias, o quarto nas infeções pós-operatórias e o sétimo em septicémias (Lister *et al.*; 2009, Kanj e Sexton, 2012). É, também, a principal causa de falhas respiratórias e de morte da maioria dos doentes com fibrose quística (Folkensson *et al.*, 2012). *P. aeruginosa* é, ainda, a bactéria Gram-negativa multirresistente que mais pneumonias causa aos doentes hospitalizados com suporte ventilatório (Fricks-Lima *et al.*, 2011) e aos doentes pediátricos hospitalizados em UCI (Lister *et al.*, 2009). São também frequentes as infeções causadas por *P. aeruginosa* em unidades de cuidados intensivos, sendo responsável por 21% das pneumonias, 13% das infeções oculares e otorrinolaringológicas, 10% das infeções urinárias e 3% das septicémias ocorridas nas UCI dos Estados Unidos da América (EUA). Nas UCI europeias, é considerada o segundo patogénico mais frequente, responsável por 30% das pneumonias, 19% das infeções urinárias e 10% das septicémias nessas unidades (Lister *et al.*, 2009).



Desde o início dos anos 80, a prevalência de *P. aeruginosa* em infecções de doentes neutropênicos e queimados tem diminuído na Europa e América do Norte, mas aumentado no Japão, onde continua a ser o principal agente infeccioso associado a bacteriémias nos doentes neutropênicos (Kanj e Sexton, 2012). Até 1950, menos de 100 casos de bacteriémias causadas por *P. aeruginosa* tinham sido descritos, mas com a introdução, nos anos 50 e 60, de regimes terapêuticos com potentes imunodepressores para tratar neoplasias e doenças inflamatórias, este número aumentou bastante (Mena e Gerba, 2009). Em doentes com fibrose quística, a incidência de infecções causadas por esta bactéria não tem diminuído e *P. aeruginosa* continua a ser a principal causa de morbidade e mortalidade neste grupo de doentes, bem como nos doentes com bronquiectasia, em que continua a ser o principal patogénico colonizador dos seus pulmões (Fricks-Lima *et al.*, 2011; Kanj e Sexton, 2012).

A significância de *P. aeruginosa* como causa de morbidade e mortalidade associada a pneumonias de doentes ventilados e infecções nosocomiais, no geral, mantém-se elevada, apesar das diversas políticas de controlo de infeções implementadas nos hospitais. São frequentes as descrições de surtos de infeções nosocomiais causadas por esta bactéria, sendo habitualmente associados à incorreta utilização dos equipamentos médicos (Iversen *et al.*, 2007; Lanini *et al.*, 2011) e a contaminações cruzadas, muitas vezes com origem nos reservatórios ambientais dos hospitais, sobretudo em torneiras e lavatórios. A multirresistência (MDR) a antibióticos, característica desta bactéria (Bert *et al.*, 1998; Breathnach *et al.*, 2012), é outro fator associado ao sucesso na proliferação deste patogénico em ambiente hospitalar (Hota *et al.*, 2009).

Apesar de se considerar este patogénico oportunista sobretudo associado a infeções nosocomiais, as infeções comunitárias causadas por *P. aeruginosa* são também frequentes. Foliculites e otites associadas à utilização de equipamentos recreativos balneares (piscinas, jacúzis, banheiras de hidromassagem, entre outros) são frequentes (Kerr e Snelling, 2009) e ocorrem, na maioria das vezes, em indivíduos saudáveis, sendo *P. aeruginosa* responsável por cerca de 70% das otites e a principal causa de foliculites (Mena e Gerba, 2009). Também queratites causadas por esta bactéria em utilizadores de lentes de contacto são uma realidade, estando *P. aeruginosa*, nas últimas duas décadas, indicada como a principal responsável por esta patologia (Robertson *et al.*, 2011). Estas três patologias, com origem comunitária e em indivíduos saudáveis, desmistificam a tendência habitual de associar *P. aeruginosa* apenas a ambientes nosocomiais e a indivíduos imunocomprometidos. Estas infeções surgem devido a alterações debilitantes nos tecidos do hospedeiro, causadas pelo prolongado contacto da água na pele e ouvidos, removendo as camadas lipídicas protetoras, ou devido a pequenos arranhões na córnea e a hipoxia, permitindo a entrada e disseminação da bactéria no epitélio ocular (Mena e Gerba, 2009, Robertson *et al.*, 2011). Este fenómeno vai ao encontro da definição de bactéria oportunista, ou seja, aquela que apenas consegue causar infeção em indivíduos imunocomprometidos ou quando ultrapassa alguma barreira de defesa do hospedeiro (Mena e Gerba, 2009). Pneumonias causadas por *P. aeruginosa* têm, também, uma expressão significativa nas infeções



comunitárias, com uma incidência de cerca de 7% (Arancibia *et al.*, 2002), bem como osteomielites e endocardites em toxicodependentes que se injetam, representando 90% de todas as endocardites neste grupo de indivíduos (Mena e Gerba, 2009; Kanj e Sexton, 2012). Alguns estudos associam ainda surtos de diarreia a infecções causadas por *P. aeruginosa*, bem como enterocolites necrosantes em lactentes (Mena e Gerba, 2009).

As causas destas infecções comunitárias são descritas como associadas sobretudo a água balnear e de consumo humano, mas também a alguns alimentos, sobretudo vegetais, segundo Hardalo e Edberg (1997). Alguns animais também servem como veículos desta bactéria, bem como algumas plantas e o próprio solo (Mena e Gerba, 2009), o que não é surpreendente, atendendo à sua ubiquidade no ambiente.





### 1.3. Virulência

A capacidade de *P. aeruginosa* causar um tão diverso tipo de infecções em diferentes grupos de doentes e também em indivíduos saudáveis é atribuída à combinação da sua versatilidade metabólica com a sua intrínseca resistência a antibióticos, cumulada com a capacidade de se adaptar à presença destes fármacos, aliada ainda à possibilidade de produzir uma panóplia de diferentes fatores de virulência (Balasubramanian *et al.*, 2012).

Para ter sucesso na infecção, *P. aeruginosa* tem que detetar atempadamente as respostas do hospedeiro face à sua presença e às substâncias que produz e reagir numa forma adequada e eficaz às mesmas. Um dos mecanismos pelos quais *P. aeruginosa* deteta sinais externos (no caso de infecção, as respostas do hospedeiro) são os chamados sistemas de dois componentes, “two component systems” (TCS). Estes têm um papel muito importante na modulação da expressão genética da célula bacteriana, em resposta às condições ambientais que a rodeiam (Balasubramanian *et al.*, 2012). Muitos fatores de virulência excretados e alguns fenótipos que favorecem a virulência, como a formação de biofilmes, são também regulados por *quorum sensing* (QS), um mecanismo de reconhecimento da densidade celular bacteriana, também importante na regulação da expressão genética, incluindo alguns genes associados à virulência (Strateva e Mitov, 2011). A transição de infecções agudas por *P. aeruginosa* para infecções crónicas nalguns sítios específicos, como nos pulmões dos doentes com fibrose quística (Lorè *et al.*, 2012), é uma evidência clara da sua capacidade de adaptação em termos de virulência, como estratégia de sobrevivência perante as condições externas onde se encontra. É importante referir que, do enorme genoma de *P. aeruginosa* (com mais de 6,3 milhões de bases nucleotídicas, aproximando-se da dimensão do genoma de alguns eucariotas simples), cerca de 8,4% é dedicado a genes que codificam proteínas reguladoras (Stover *et al.*, 2000). Quanto aos TCS, *P. aeruginosa* PAO1, cujo genoma está integralmente sequenciado, apresenta cerca de 127 TCS, o que comparando com os 60 TCS em *Escherichia coli* e 80 TCS em *Bacillus subtilis*, demonstra a enorme adaptabilidade e capacidade de regulação de *P. aeruginosa* (Balasubramanian *et al.*, 2012). Esta característica representa uma importante vantagem competitiva em termos ecológicos e patogénicos, traduzida na sua ubiquidade ambiental e prevalência hospitalar.

Uma infecção causada por *P. aeruginosa* é composta por 3 fases: aderência bacteriana e colonização, invasão local e disseminação sistémica, podendo a infecção parar em qualquer uma destas fases (Strateva e Mitov, 2011). Após a fase inicial de colonização, a infecção evolui para uma fase aguda ou crónica. A infecção aguda é caracterizada por uma elevada produção de diversos fatores de virulência, enquanto numa infecção crónica essa produção é regulada e quase sempre diminuída.

São vários, e diversos, os fatores de virulência que podem ser expressos por *P. aeruginosa*, encontrando-se os mais importantes, ou melhor estudados, sumariamente descritos de seguida.



### 1.3.1. Tipos de fatores de virulência

Os fatores de virulência podem dividir-se em diversos tipos, em função da sua principal intervenção no processo infeccioso: exotoxinas, importantes para causar danos ao hospedeiro, mas não necessários para a viabilidade da célula bacteriana; modulinas, que desencadeiam respostas inflamatórias no hospedeiro; enzimas, que destroem os tecidos do hospedeiro e providenciam nutrientes à célula bacteriana ou participam em mecanismos de atenuação das respostas imunológicas do hospedeiro e de invasão dos seus tecidos; adesinas e estruturas de mobilidade, dada a sua importância na fixação às células do hospedeiro; cápsulas, que protegem o microrganismo das defesas do hospedeiro e participam, nalguns casos, na aderência; produção de determinantes de evasão ao sistema do complemento, componente central da imunidade inata e da defesa antimicrobiana do hospedeiro; produção de pigmentos e mecanismos pro-apoptóticos, sobretudo em relação a células de defesa do hospedeiro (neutrófilos e macrófagos) (Casadevall e Pirofski, 2009). A capacidade de formar biofilmes, que ajudam a bactéria a isolar-se dos mecanismos de defesa do hospedeiro e ainda dos antibióticos; a ação de mecanismos de regulação do crescimento bacteriano em função da densidade bacteriana e de alterações das condições no meio envolvente; os sistemas secretórios, que permitem à bactéria excretar para o meio envolvente, ou diretamente para o interior das células do hospedeiro, uma série de substâncias associadas à virulência/patogenicidade; a produção de sideróforos, para aquisição de ferro, essencial para a sobrevivência celular; a sobrevivência intracelular, conseguida por alguns patogénicos; a variação antigénica, para “confundir” as respostas imunológicas do hospedeiro; e, ainda, a termotolerância, para permitir a infeção de hospedeiros homeotérmicos, incluindo o Homem (Casadevall e Pirofski, 2009), são também muito importantes para a virulência/patogenicidade dos microrganismos.

Podemos dividir os fatores de virulência em 2 tipos: os estruturais, que fazem parte da parede celular da bactéria, e os fisiológicos, que são produzidos e segregados pela célula. Ambos são importantes e essenciais para a virulência da bactéria, participando, numa forma interligada, na infeção. Acrescem a estes, as características da célula que, não sendo verdadeiros fatores de virulência, lhe permite melhor sobreviver no hospedeiro: produção de biofilmes, regulação génica (incluindo os genes de virulência) e a termotolerância.

#### 1.3.1.1. Componentes de superfície da parede celular

Na parede celular de *P. aeruginosa* podemos encontrar 4 principais componentes que participam na patogenicidade da bactéria: o seu flagelo polar, os *pili*, o lipopolissacarídeo (LPS) e ainda sistemas secretórios, através dos quais a célula liberta para o exterior proteínas e/ou toxinas envolvidas na patogenia.



#### **1.3.1.1.1. Flagelos e *pili***

Responsáveis pela mobilidade da célula, o flagelo e os *pili* têm um papel muito importante na patogênese, por permitirem à bactéria deslocar-se no meio onde se encontra e porque facilitam a invasão e a aderência da bactéria às células epiteliais do hospedeiro, ligando-se a receptores específicos (Strateva e Mitov, 2011). No entanto, estas estruturas são muito imunogénicas, funcionando como ligandos para as células fagocíticas do hospedeiro e estimulando o recrutamento de neutrófilos. Assim, após a colonização inicial, a produção de flagelos e *pili* é habitualmente “desligada” para diminuir a imunogenicidade da bactéria, iniciando-se em simultâneo a expressão de genes envolvidos na produção de biofilmes (Sadikot *et al.*, 2005).

#### **1.3.1.1.2. Lipopolissacarídeo**

O lipopolissacarídeo (LPS) é um constituinte de todas as bactérias Gram-negativas, encontra-se na membrana externa das suas paredes celulares e contribui para a integridade estrutural da bactéria. É composto por 3 partes: um domínio hidrofóbico, ligado à bicamada fosfolipídica da membrana externa, conhecido por lípido A, um oligossacarídeo central, que se liga ao lípido A e ao polissacarídeo O, o terceiro componente do LPS, que se prolonga para fora da membrana. O LPS parece estar envolvido na disseminação sistémica de *P. aeruginosa* e também na aderência aos tecidos do hospedeiro (Ivanov *et al.*, 2011). O lípido A e o polissacarídeo O são variáveis de estirpe para estirpe e são muito imunogénicos, desencadeando uma cascata de processos inflamatórios no hospedeiro, causando-lhe danos, podendo até levar à síndrome séptica e ao choque séptico (Kanj e Sexton, 2012), o que para a bactéria também não é favorável, uma vez que a morte do hospedeiro pode por em risco a sua própria sobrevivência. Em infeções crónicas, *P. aeruginosa* seleciona mutantes com modificações específicas no lípido A, que lhe conferem menor imunogenicidade para se evadir mais facilmente dos peptídeos antimicrobianos produzidos pelo sistema imunitário do hospedeiro (Kipnis *et al.*, 2006) e aumentar as suas possibilidades de sobrevivência. Assim, ainda que não cumprindo a definição geral de fator de virulência, por estar sempre presente na célula, o LPS participa na patogénica de *P. aeruginosa* e sofre até adaptações moleculares em função do tipo de infeção que a bactéria está a desenvolver.

#### **1.3.1.1.3. Alginato**

O alginato é um exopolissacarídeo mucoso constituído por repetições de polímeros de ácido manurónico e ácido glucurónico. Encontra-se na matriz dos biofilmes e contribui para a lesão tecidular do hospedeiro para além de atenuar a resposta imunitária (Kanj e Sexton, 2012). Estirpes produtoras de alginato



são frequentes em doentes com fibrose quística e a produção excessiva de alginato protege ainda a bactéria da ação antibiótica (Kipnis *et al.*, 2006). Cerca de 85% dos isolados de *P. aeruginosa* obtidos a partir destes doentes apresentam uma morfologia mucosa, devido à produção excessiva de alginato, enquanto apenas menos de 1% dos isolados obtidos de outros locais apresentam este fenótipo, denotando a sua importância particular para a colonização e sobrevivência no ambiente pulmonar (Stapper *et al.*, 2004). Estes autores demonstraram ainda que o alginato é importante para a arquitetura e desenvolvimento dos biofilmes, mas não para a sua formação inicial.

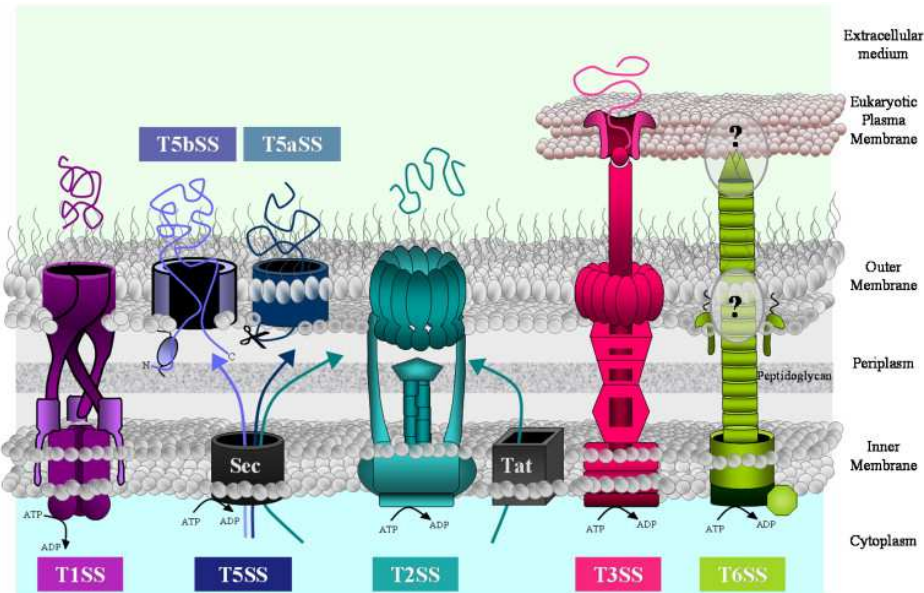
#### 1.3.1.1.4. Sistemas secretórios

A capacidade de segregar substâncias é muito importante para a sobrevivência da célula bacteriana no meio ambiente. Para tal, as bactérias têm sistemas secretórios que participam, por exemplo, no seu crescimento, ao segregarem enzimas como proteases e lipases que degradam macromoléculas em nutrientes que a célula pode absorver e utilizar (Filloux, 2011). Dos 6 sistemas secretórios conhecidos das Proteobactérias, *P. aeruginosa* possui 5: os sistemas tipo 1, 2, 3, 5 e 6 (Bleves *et al.*, 2010). Através destes sistemas, a bactéria segrega também uma série de fatores de virulência, na sua maioria toxinas ou enzimas hidrolíticas, para o meio extracelular (sistemas secretórios do tipo 1, 2 e 5) ou para o citosol das células do hospedeiro (sistemas secretórios do tipo 3 e 6) (figura 2) (Bleves *et al.*, 2010).

Os diferentes sistemas secretórios são dedicados à excreção de exoproteínas específicas. A principal exoproteína com implicação na virulência segregada pelo T1SS é a protease alcalina (Apr). As elastases LasA e LasB são segregadas pelo T2SS, bem como protease IV, fosfolipase C hemolítica e não hemolítica, lipase e fosfatase alcalina. O T3SS, também conhecido por injectossoma, segrega para o interior das células do hospedeiro 4 exoenzimas, conhecidas por T3SS efetoras: ExoS, ExoT, ExoU e ExoY. O T5aSS segrega esterase e T5bSS a exoprotease LepA. O T6SS segrega uma proteína envolvida na formação de nanotubos, mas cuja importância ainda não é bem conhecida (Bleves *et al.*, 2010). Estes autores discutem ainda a relevância desta diversidade de sistemas secretórios em *P. aeruginosa* na ubiquidade desta bactéria, como uma importante estratégia de sobrevivência no ambiente. Os sistemas secretórios presentes em *P. aeruginosa* permitem-lhe segregar substâncias para a superfície celular, para o meio ambiente ou diretamente para o interior de uma célula eucariótica, pelo que não só a bactéria desenvolveu diversas estratégias para adquirir nutrientes como terá também tido necessidade de desenvolver mecanismos de defesa contra amebas ou nemátodes, que co-habitam os seus habitats naturais. Assim, defendem ainda os autores, ao contactar com seres humanos imunocomprometidos, a disponibilidade de um tão diverso arsenal secretório ter-se-á traduzido numa enorme vantagem para *P. aeruginosa* ter



sucesso na colonização destes hospedeiros, contribuindo para que se tornasse um dos mais significativos patogênicos nosocomiais da atualidade.



**Figura 2** – Esquema dos 5 sistemas secretórios em *P. aeruginosa* e modo de ação de cada um deles. [TxSS – sistema secretório tipo x (1, 2, 3, 5 ou 6); extracellular medium – meio extracelular; eukaryotic plasma membrane – membrana celular do hospedeiro eucariótico; outer membrane – membrana externa; periplasm – espaço periplasmático; inner membrane – membrana interna; cytoplasm – citoplasma bacteriano]. T1SS segrega substâncias diretamente para o exterior da célula bacteriana, T3SS injeta-as para o citoplasma de células eucarióticas, através de um sistema tipo agulha, e o mecanismo de ação do T6SS não é ainda totalmente conhecido. T2SS e T5SS segregam as substâncias em 2 passos: as exoproteínas que usam estes sistemas são sintetizadas como precursores e o seu peptídeo terminal é usado como sinal para os translocadores Sec e Tat da membrana interna da célula. Estes enviam a molécula para o espaço periplasmático e aí a molécula usa o T2SS ou o T5SS para atravessar a membrana externa e sair para o exterior. Habitualmente, as substâncias segregadas pelo T2SS são libertadas para o meio exterior e as segregadas pelo T5SS (subdividido ainda em T5aSS e T5bSS) ficam à superfície da membrana externa da célula bacteriana (adaptado de Bleves *et al.*, 2010).

### 1.3.1.2. Fatores de virulência segregados

São diversas as substâncias segregadas por *P. aeruginosa* que têm implicação na sua patogenicidade. Algumas participam na fase de colonização e invasão, outras na disseminação e outras ainda na toxicidade bacteriana e diminuição da resposta imunitária do hospedeiro.

### 1.3.1.2.1. Lectinas

As lectinas são proteínas de origem não imunológica que reconhecem e se ligam a epítomos específicos de origem glicídica, funcionando como mediadores centrais da transferência de informação nos sistemas biológicos, interagindo com glicoproteínas, glicolípidos e oligossacarídeos (Funken *et al.*, 2012). *P. aeruginosa* produz duas lectinas, LecA e LecB, que se ligam, respetivamente, à galactose e à fucose e parecem funcionar como adesinas, participando na invasão e colonização inicial, mas também como citotoxinas do epitélio pulmonar, sobretudo LecA, inibindo o batimento ciliar das células epiteliais (Chemani *et al.*, 2009; Strateva e Mitov, 2011; Funken *et al.*, 2012). LecB está associada à produção de biofilmes (Funken *et al.*, 2012) e LecA promove a aderência de *P. aeruginosa* ao epitélio intestinal causando uma quebra na barreira intestinal, resultando numa maior absorção de exotoxina A (ExoA) (Strateva e Mitov, 2011).

### 1.3.1.2.2. Toxinas

*P. aeruginosa* consegue causar danos e necrose nos tecidos do hospedeiro muitas vezes devido à produção de exotoxina A. Esta toxina pertence ao grupo das exotoxinas bacterianas, onde se incluem a toxina diftérica, a toxina da cólera, a C33 exoenzima e a toxina pertussis. Estas, apesar de terem recetores diferentes, catalisam a mesma reação enzimática e partilham uma configuração estrutural comum (Jørgensen *et al.*, 2008). ExoA, segregada através do T2SS, é uma ADP-ribosil-transferase que entra nas células eucarióticas por endocitose, mediada por recetores específicos e, no interior da célula, inibe a síntese proteica por ribosilação do fator de alongamento-2 (Kipnis *et al.*, 2006), levando assim à morte celular, num mecanismo semelhante ao da toxina diftérica (Jørgensen *et al.*, 2008). ExoA é muito tóxica para os mamíferos e parece estar envolvida na mediação da infeção local e sistémica, favorecendo o processo de colonização e a invasão por necrotização local dos tecidos, estando também associada a processos de imunossupressão (Strateva e Mitov, 2011).

### 1.3.1.2.3. Proteases

*P. aeruginosa* produz várias proteases que participam em diversos processos enzimáticos de degradação de proteínas exógenas. Um importante grupo destas proteases é o das metaloproteases, assim designado pelo facto de terem no seu centro ativo um ião metálico e que engloba a protease alcalina e as elastases LasA e LasB, muito importantes nos processos infecciosos de *P. aeruginosa*. Aps está envolvida na destruição da fibrina, fibrinogénio, laminina, elastina, colagénio, C1q e C3 do sistema do complemento, inibidores de proteases e interferão- $\gamma$  (Feltzer *et al.*, 2000; Bradbury *et al.*, 2010), afetando os mecanismos de



defesa do hospedeiro. É segregada pelo T1SS e está muito associada a infecções da córnea, podendo também participar na patogênese de infecções pulmonares agudas (Kipnis *et al.*, 2006). Em conjunto sobretudo com a elastase LasB, encontra-se também presente nos isolados recolhidos de secreções pulmonares de doentes com fibrose quística, correlacionando-se elevados teores de Apr e LasB com uma condição clínica debilitada destes doentes (Oldak e Trafny, 2005).

A principal ação enzimática das elastases é a degradação da elastina que, para além de ser um constituinte importante dos vasos sanguíneos (Van Delden e Iglewski, 1998), constitui cerca de 28% do tecido pulmonar (Okumura *et al.*, 2008) e é responsável pela sua expansão e contração (Petermann *et al.*, 2001). A atividade concertada entre LasA e LasB promove a atividade elastolítica de *P. aeruginosa*, que se pensa ser responsável pela destruição do tecido pulmonar, causando hemorragias pulmonares nas infecções agudas (Van Delden e Iglewski, 1998), e ainda pela degradação de duas proteínas surfactantes pulmonares, SP-A e SP-D, envolvidas na imunidade inata pulmonar (Strateva e Mitov, 2011). LasA é uma imunoprotease com um centro serina e que atua em sinergia com Apr e LasB na degradação da elastina, quebrando as ligações glicina-glicina nelas presentes, tornando-a mais sensível à ação da Apr ou LasB (Strateva e Mitov, 2011). LasB é uma metaloprotease de zinco segregada pelo T2SS que, para além da elastina, degrada ainda a fibrina, a fibronectina, a laminina, o colagénio, a caseína, inativa as imunoglobulinas humanas G e A, a lisozima, a transferrina, a mucina gástrica, o interferão- $\gamma$  e alguns componentes do sistema do complemento e inibidores de proteases presentes nos nossos pulmões (Bradbury *et al.*, 2010). LasB, bem como a Apr, não só destrói componentes tecidulares do hospedeiro, como interfere com os seus mecanismos de defesa contra a infeção (Strateva e Mitov, 2011). Esta elastase apresenta uma atividade proteolítica cerca de 10 vezes superior à da Apr e 4 vezes superior à da tripsina (Van Delden e Iglewski, 1998).

#### **1.3.1.2.4. Lipases**

As enzimas lipolíticas, ou lipases, parecem estar envolvidas na sinalização lipídica, influenciando fenótipos com relevância virulenta em *P. aeruginosa*, sobretudo LipA e LipC. A primeira está associada à diminuição da produção de pioverdina em meios com privação de ferro e LipC parece afetar a mobilidade, a formação de biofilmes e a produção de ramnolípidos (Funken *et al.*, 2011). Apresentam um sinergismo com fosfolipase, uma vez que a secreção simultânea resulta em efeitos patológicos que não se poderiam explicar pela ação individual de cada uma delas (König *et al.*, 1996).

EstA é a única esterase autotransportadora conhecida em *P. aeruginosa* (Strateva e Mitov, 2011), usando o T5SS para chegar à superfície externa da parede bacteriana e aí hidrolisar ésteres de glicerol. Está envolvida na produção de ramnolípidos e afeta os 3 tipos de mobilidade conhecidos em *P. aeruginosa*: “swimming”, “twitching” e “swarming”, e, por consequência, a formação de biofilmes (Wilheim *et al.*, 2007).

### 1.3.1.2.5. Ramnolípidos

Os ramnolípidos são biossurfactantes constituídos por glicolípidos com ramnose, tendo uma estrutura semelhante à dos detergentes e considera-se que solubilizam os fosfolípidos do surfactante pulmonar, tornando-o acessível à ação da fosfolipase C hemolítica, podendo levar à atelectasia observada nas infecções pulmonares (Strateva e Mitov, 2011). Os ramnolípidos também inibem o transporte muco-ciliar e o batimento ciliar do epitélio pulmonar (Read *et al.*, 1992) e estão envolvidos nos processos de movimento por “swarming” e na formação de biofilmes (Caiazza *et al.*, 2005).

### 1.3.1.2.6. Hemolisinas

Hemolisinas são enzimas que, por definição, destroem as células sanguíneas. *P. aeruginosa* apresenta duas hemolisinas importantes: fosfolipase C hemolítica e lecitinase. Estas atuam em sinergia na degradação de lípidos e da lecitina e promovem a invasão bacteriana através dos efeitos citotóxicos que provocam nas células do hospedeiro (Sadikot *et al.*, 2005). A fosfolipase C hidrolisa preferencialmente lípidos que contenham grupos de amônio quaternário, encontrados nas membranas eucarióticas e no surfactante pulmonar, como por exemplo a fosfatidilcolina, e tem uma atividade muito reduzida nas membranas procarióticas. *P. aeruginosa* produz ainda uma fosfolipase C não hemolítica, que é 40% idêntica à hemolítica e também hidrolisa a fosfatidilcolina, mas usando um substrato diferente (Strateva e Mitov, 2011).

### 1.3.1.2.7. Pigmentos

*P. aeruginosa* foi classificada tendo por base uma nova substância pigmentar, que se denominou piocianina, produzida apenas por esta espécie e que lhe conferia uma coloração azul-esverdeada (ponto 1. deste capítulo). A piocianina pertence ao grande grupo dos compostos tricíclicos designados fenazinas e participa na destruição do tecido pulmonar em infecções crônicas.

Estudos *in vitro* demonstraram que a piocianina interfere negativamente num grande número de atividades celulares de mamíferos, incluindo a respiração celular, o batimento ciliar, o crescimento das células epidermais, a homeostase do cálcio, a libertação de prostaciclina no epitélio pulmonar, a libertação de interleucina-2, limitando também o crescimento dos linfócitos-T e a secreção de imunoglobulinas pelos linfócitos-B. Este pigmento promove ainda a apoptose de neutrófilos e desequilibra a atividade anti-proteolítica das células das vias respiratórias dos doentes com fibrose quística (Strateva e Mitov, 2011). A sua conhecida propriedade oxido-redutora permite-lhe ainda oxidar a glutaniona e inativar a ação da catalase





nas células epiteliais do tecido pulmonar e do endotélio intestinal, participando, assim, também nos danos causados ao epitélio pulmonar por stress oxidativo (Lau *et al.*, 2004; Kipnis *et al.*, 2006).

A importância da piocianina para a virulência, sobretudo nas infecções respiratórias, é muito expressiva e a sua elevada prevalência nos isolados de infecções respiratórias, em particular nos doentes com fibrose quística (Strateva e Mitov, 2011), é disso testemunho.

#### **1.3.1.2.8. Sideróforos**

*P. aeruginosa* produz dois sideróforos, a pioquelina e a pioverdina, que utiliza para obter ferro, um dos elementos químicos mais abundantes na crosta terrestre e que existe sob dois estados oxidativos:  $Fe^{3+}$ , associado a grandes concentrações de oxigénio, pouco solúvel e não biotóxico (em concentrações normais), e  $Fe^{2+}$ , solúvel, que ocorre apenas em baixas concentrações de oxigénio ou de pH e que é muito biotóxico.

Todos os seres vivos, à exceção de algumas bactérias muito específicas, necessitam de ferro para sobreviver, uma vez que muitas enzimas, muito conservadas em termos filogenéticos, necessitam deste elemento químico para a sua atividade, como as ribonucleótido-redutases, que participam na produção de ácido desoxirribonucleico (ADN), ou os sistemas citocromo, para a produção de energia nas mitocôndrias e células bacterianas. Assim, os seres vivos adotaram estratégias para obter ferro e mantê-lo no seu organismo sempre na sua forma oxidada, para evitar a formação dos radicais ferrosos tóxicos (Chu *et al.*, 2010). Nos mamíferos, onde o Homem se inclui, a maioria do ferro é aprisionado em ferritina, transferrina, lactoferrina e hemoglobina, todas apresentando uma elevada afinidade para este elemento. Esta característica tem sido designada por “retenção do ferro” e permite ao hospedeiro diminuir a biodisponibilidade deste elemento químico a bactérias que o estejam a infetar, sendo portanto uma importante característica da sua imunidade inata (Lamont *et al.*, 2009).

A pioverdina é o principal sideróforo produzido por *P. aeruginosa* e é responsável pela fluorescência verde-amarelada das suas colónias em condições de deficiência de ferro, devido ao grupo cromóforo que contem na sua estrutura (Saha *et al.*, 2012). Além da função fisiológica de obter ferro a partir do meio envolvente, por um mecanismo de excreção, seguido de incorporação após quelatar o  $Fe^{3+}$ , participa também na formação de biofilmes (Lamont *et al.*, 2009) sendo, nos doentes com fibrose quística, uma peça fundamental para o desenvolvimento dos biofilmes nos seus pulmões (Saha *et al.*, 2012). A pioverdina participa ainda na sua própria regulação e na regulação de outros fatores de virulência (Kipnis *et al.*, 2006; Sadikot *et al.*, 2005), por um mecanismo desencadeado pelo reconhecimento do complexo pioverdina-ferro ao nível da membrana externa da célula e que promove uma cascata de sinais citoplasmáticos, que vão regular os genes envolvidos na síntese da pioverdina, ExoA e endoprotease (Saha *et al.*, 2012).



A pioquelina pertence a um grupo distinto de sideróforos, os fenolatos, e é menos importante que a pioverdina, por ter uma menor afinidade ao Fe e porque o seu mecanismo de ação para a incorporação de Fe<sup>3+</sup> apresenta mais riscos para a célula do que o utilizado pela pioverdina (Saha *et al.*, 2012). Em termos de virulência, a pioquelina também pode participar na formação de biofilmes e no mecanismo de autorregulação da sua produção pela célula em função da concentração de ferro no seu interior (Braud *et al.*, 2009).

Estes sideróforos conseguem quelatar uma série de outros íons de metais pesados, como Ag<sup>+</sup>, Al<sup>3+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cr<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Eu<sup>3+</sup>, Ga<sup>3+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Sn<sup>2+</sup>, Tb<sup>2+</sup>, Tl<sup>+</sup> e Zn<sup>2+</sup> para proteger a célula da sua ação perniciosa (Braud *et al.*, 2009; Saha *et al.*, 2012), nalguns casos, e para preencher as necessidades fisiológicas mínimas em relação a outros.

#### 1.3.1.2.9. Proteínas T3SS efetoras

Os sistemas secretórios são um dos componentes vitais para a virulência de *P. aeruginosa* por permitirem a libertação para o exterior da célula de uma série de substâncias virulentas para o hospedeiro. Um grupo muito estudado dessas substâncias são as proteínas segregadas pelo T3SS, devido à sua atividade toxinogénica no hospedeiro, ao facto de serem diretamente injetadas no citoplasma das células do hospedeiro e ainda porque este sistema é um dos potenciais candidatos a alvo para novas terapias anti-*Pseudomonas* (Kipnis *et al.*, 2006; Hauser, 2009). O T3SS é comum às espécies dos géneros *Yersinia*, *Salmonella*, *Shigella* e *Pseudomonas* (Kipnis *et al.*, 2006) e segrega 4 exoenzimas, conhecidas também por citotoxinas: ExoS, ExoT, ExoU e ExoY. Todas necessitam de um cofator eucariótico para a sua ativação, desconhecendo-se ainda alguns desses cofatores, inclusivé os associados a ExoU e ExoY (Hauser, 2009).

ExoS e ExoT são 76% homólogas quanto às suas sequências aminoácídicas e ambas têm uma atividade tóxica bi-funcional, por apresentarem atividade GTPase e ADP-ribosil-transferase. Contudo, ExoS é a principal citotoxina envolvida nos processos de colonização, invasão e disseminação durante o processo infeccioso, destruindo a actina do citoesqueleto das células eucarióticas, o que provoca o seu arredondamento, e diminui a capacidade de aderência célula-célula, facilitando assim a entrada de *P. aeruginosa* através das barreiras epiteliais. ExoS inibe ainda a síntese de ADN, através da sua atividade como GTPase, promove a perda de capacidade de tráfego vesicular e da endocitose e pode levar à morte celular por necrose ou apoptose. Postula-se que esta capacidade necrótica ou apoptótica da ExoS, se direcionada para as células do sistema imunitário, pode permitir a *P. aeruginosa* sobreviver e persistir na presença de uma elevada resposta imunológica por parte do hospedeiro, conferindo-lhe essa significativa vantagem (Hauser, 2009). A produção de ExoS está associada à disseminação a partir do local de colonização para a corrente sanguínea dos hospedeiros infetados, resultando numa septicémia fatal. ExoT, apesar de muito semelhante estrutural e enzimaticamente a ExoS, apresenta apenas 0,2% da atividade



desta (Bradbury *et al.*, 2010). A atividade ADP-ribosilante da ExoT, ao contrário de ExoS, está limitada a um grupo restrito de proteínas do hospedeiro. Participa também na destruição da actina do citoesqueleto das células eucarióticas, provocando o seu arredondamento, previne a internalização das células bacterianas pelos macrófagos e está ainda associada a uma desaceleração no processo de cicatrização das feridas (Hauser, 2009; Strateva e Mitov, 2011). A morte celular por apoptose pode ocorrer por ação de ExoT, mas só ao fim de cerca de 10 horas e não após 2 a 3 horas, como acontece com ExoS (Hauser, 2009). Em laboratório, foi possível associar ExoT à disseminação da infecção dos pulmões para o fígado (Lee *et al.*, 2005)

ExoU é a citotoxina-T3SS mais letal, sendo 100 vezes mais citotóxica que ExoS e provocando a morte rápida das células eucarióticas onde é injetada (Bradbury *et al.*, 2010). Esta citotoxina é uma potente fosfolipase, possuindo uma vasta gama de substratos, incluindo fosfolípidos, lisofosfolípidos e lípidos neutros (Hauser, 2009). Contudo, o mecanismo de ação através do qual causa danos tão sérios e tão rapidamente (causa apoptose em cerca de 1 hora) na célula eucariótica não são ainda bem conhecidos (Strateva e Mitov, 2011). Esta exoenzima citotóxica está associada a choque séptico, aumento na severidade infecciosa e mortalidade associada a pneumonia (Bradbury *et al.*, 2010).

ExoY é uma adenilato-ciclase, com domínios semelhantes aos domínios correspondentes das adenilato-ciclases de *Bordetella pertussis* e *Bacillus anthracis*, promove o aumento de AMP-cíclico no citoplasma eucariótico, levando à destruição da actina do citoesqueleto, inibe a internalização das células bacterianas pelos macrófagos e aumenta ainda a permeabilidade endotelial. Apesar destas atividades, em teoria, induzirem uma reação severa na célula eucariótica, tal não acontece, e a importância da ExoY nos processos infecciosos é ainda desconhecida (Hauser, 2009).

### **1.3.1.3. Outros fatores de virulência, *sensu lato***

Algumas características da célula bacteriana, não sendo fatores de virulência *sensu stricto*, por não causarem diretamente danos ao hospedeiro, contribuem também para a sua patogenicidade, por promoverem o seu sucesso em termos de sobrevivência e disseminação.

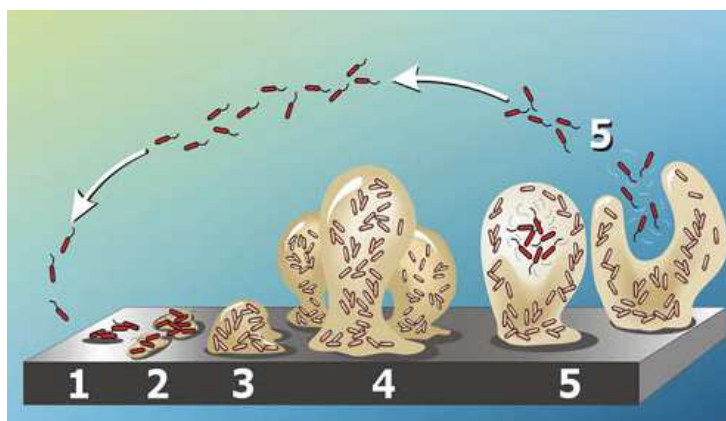
#### **1.3.1.3.1. Biofilmes**

Biofilmes são agregados densos de microrganismos embebidos numa matriz exopolissacárida, ubíquistas na natureza e um componente crítico na patogénese de determinadas doenças infecciosas (Casadevall e Pirofski, 2009). A principal relevância da capacidade de uma espécie bacteriana patogénica

produzir biofilmes detêm-se com o aumento da sua possibilidade de sobrevivência no hospedeiro que está a infetar. Quando agrupada em biofilmes, *P. aeruginosa* consegue resistir melhor aos antibióticos, à resposta imunitária do hospedeiro e, nos equipamentos hospitalares e outras superfícies abióticas, aos tratamentos com biocidas. Esta propriedade é muito importante porque, ainda que estes agentes diminuam o número de células presentes no biofilme, não conseguem erradicar por completo todas as bactérias nele presente (Harmsen *et al.*, 2010), conseguindo assim o patogénico sobreviver e, a partir dessas células remanescentes, desenvolver novo biofilme.

A importância dos biofilmes nos doentes com fibrose quística é enorme, tendo um papel muito significativo na persistência de *P. aeruginosa* nos pulmões destes doentes (Strateva e Mitov, 2011). Também no ambiente, a formação de biofilmes é muito importante para *P. aeruginosa*, permitindo-lhe aderir a todo o tipo de superfícies, aumentando a sua viabilidade e sobrevivência na água, solo, plantas, etc. Relativamente à água, a formação de biofilmes nas condutas dos sistemas de abastecimento de água para consumo humano são uma realidade e um problema severo para as entidades abastecedoras de água (Wingender e Flemming, 2011), dificultando bastante a manutenção dos parâmetros de qualidade microbiológica da água para consumo humano ou para utilização balnear e recreativa.

A estrutura de um biofilme é dinâmica, estando em permanente evolução e promovendo a disseminação das células bacterianas, como se observa no esquema apresentado na figura 3.



**Figura 3** – Esquema representativo da formação e desenvolvimento de um biofilme de *P. aeruginosa*. 1) **fase inicial** – respondendo a sinais ambientais, as células planctónicas aderem a uma superfície sólida por meio de adesinas, flagelos e *pili*; 2) **fase de desenvolvimento** – as células sofrem alterações nos seus fenótipos, reprimindo a expressão dos flagelos e *pili* e iniciam a formação da matriz exopolissacárida do biofilme, passando a ficar “irreversivelmente” aderentes à superfície; 3) as células sésseis agrupam-se mais e multiplicam-se levando a um maior amadurecimento do biofilme e ao início da sua “arquitetura”; 4) **fase madura** – amadurecimento total da arquitetura do biofilme, que apresenta, nalguns locais, um formato tipo cogumelo, característica dos biofilmes de *P. aeruginosa*; 5) **fase de disseminação** – no interior do biofilme, algumas células readquirem estruturas de mobilidade e o biofilme rompe, lançando essas células para o meio ambiente (adaptado de Stoodley *et al.*, 2002).



### 1.3.1.3.2. *Quorum sensing*

O *quorum sensing* (QS) é um mecanismo de reconhecimento celular e de regulação da expressão de várias centenas de genes das células bacterianas quando estas se encontram agrupadas, mediado sobretudo por 3 sistemas interconectados, os sistemas Las, Rhl e Pqs (Harmsen *et al.*, 2010). É importante na formação e manutenção de biofilmes por permitir, em tempo real, reconhecer a densidade populacional e as condições ambientais em que as células se encontram e promover as necessárias alterações para garantir a sua sobrevivência, através da produção de pequenas moléculas, as acil-homoserinas-lactonas (AHL). Estas atuam em 3 etapas: produção de AHLs, acumulação de AHLs em função da densidade populacional e a resposta por parte das células bacterianas quando uma determinada concentração de AHLs é atingida (Chun *et al.*, 2004).

Muitos dos genes regulados por QS expressam fatores de virulência (Strateva e Mitov, 2011), pelo que a sua importância para a patogenicidade é enorme. Resumidamente, o sistema Las regula, entre outros, a expressão dos genes *lasI*, *lasA*, *lasB*, *apr* e *toxA*, o sistema Rhl controla a expressão de *rhlI*, *rhlA* e *rhlB*, associados à produção de ramnolípido, e o sistema Pqs regula diversos genes com impacto no “fitness” celular e outros associados a elastases, ramnolípido e piocianina (Strateva e Mitov, 2011). Alguns estudos parecem evidenciar que as AHLs podem participar numa forma direta na patogénese, promovendo, nalguns casos, a apoptose em macrófagos e neutrófilos (Tateda *et al.*, 2003). Por outro lado, estas moléculas são também alvos para o sistema imunitário, inato e adquirido do hospedeiro, tendo-se já demonstrado que células epiteliais pulmonares conseguem inativar uma das AHLs que participa no QS de *P. aeruginosa* (Chun *et al.*, 2004).

Todas estas moléculas e fenótipos presentes em *P. aeruginosa* participam na sua virulência, contribuindo em maior ou menor grau para o seu sucesso infeccioso, sobretudo em indivíduos imunocomprometidos. Diversos estudos sobre cada um destes fatores de virulência são conduzidos para melhor compreender os mecanismos associados ao processo infeccioso, numa perspetiva de obter conhecimento que nos permita atuar contra esses fatores, de modo a diminuir os efeitos perniciosos que causam. Este objetivo surge pela absoluta necessidade de colmatar a falta de opções terapêuticas perante estirpes que se revelam muito resistentes aos antibióticos (Kipnis *et al.*, 2006), uma das características intrínsecas desta espécie bacteriana.

## 1.4. Resistência a antibióticos

Ainda que alguns autores classifiquem de forma diferente as moléculas orgânicas capazes de inibir o crescimento ou matar microrganismos em função da sua origem natural ou sintética, outros não consideram essa distinção, utilizando o termo antibiótico em função da capacidade da molécula orgânica matar ou impedir o crescimento de microrganismos, através de interações com alvos bacterianos específicos, independentemente da sua origem ser sintética ou natural (Davies e Davies, 2010), sendo esta a terminologia utilizada no presente trabalho.

A descoberta dos antibióticos, no início do século XX, é considerada como um dos mais significativos acontecimentos da medicina da era moderna, traduzindo-se, ainda hoje, na cura de inúmeras infecções, poupando imensas vidas. Contudo, a sua utilização foi, desde o início, acompanhada pelo aparecimento de estirpes resistentes. Como exemplo, para a penicilina, descoberta em 1928 por Alexander Fleming, foi descoberta uma penicilinase ainda em 1940, alguns anos antes da sua introdução na prática clínica, e assim que esta substância começou a ser utilizada como terapêutica antibacteriana, o surgimento de estirpes resistentes foi quase imediato. Esta observação é hoje entendida como uma demonstração histórica de que muitos mecanismos de resistência aos antibióticos são componentes naturais das comunidades bacterianas (Davies e Davies, 2010).

Existem vários tipos de antibióticos, classificados em função das suas estruturas e atividades, mas, para cada um deles, existem um ou mais mecanismos de resistência que permitem às estirpes que os apresentam resistir e sobreviver à sua atividade antibiótica. Dos vários tipos de antibióticos, 3 grupos são mais recorrentemente utilizados como “anti-pseudomonais”: os beta-lactâmicos, os aminoglicosídeos e as fluoroquinolonas (Strateva e Yordanov, 2009). *P. aeruginosa* é resistente a uma série desses agentes antimicrobianos, devido sobretudo à baixa permeabilidade da sua membrana externa, que apresenta uma permeabilidade cerca de 100 vezes inferior à da membrana externa de *E. coli*, à expressão constitutiva de várias bombas de efluxo e à ocorrência da beta-lactamase cromossômica AmpC, também designada por cefalosporinase (Mesaros *et al.*, 2007; Lister *et al.*, 2009; Strateva e Yordanov, 2009).

A resistência intrínseca de *P. aeruginosa* é sobretudo direcionada aos beta-lactâmicos do tipo aminopenicilinas (incluindo aqueles combinados com inibidores de beta-lactamases) e às cefalosporinas de primeira e segunda geração (Strateva e Yordanov, 2009). *P. aeruginosa* apresenta, ainda, uma enorme facilidade em desenvolver mecanismos de resistência adicionais por processos mutagénicos, que alteram a expressão ou a função de mecanismos de resistência cromossomicamente codificados (Lister *et al.*, 2009), ou pela aquisição de plasmídeos e integrões que contêm genes de resistência (Mesaros *et al.*, 2007). Pensa-se que o seu enorme genoma, um dos maiores do mundo procariótico, e a sua plasticidade, em que cerca de 0,3% dos seus codões expressam proteínas envolvidas na resistência antimicrobiana e 10% dos seus genes



organizados em “ilhas genômicas”, com capacidade de adquirirem integroes, favorecem esta ocorrência (Mesaros *et al.*, 2007).

### **1.4.1. Epidemiologia da resistência antibiótica**

A resistência a antibióticos em *P. aeruginosa* tem vindo a aumentar em todo o mundo. As infeções causadas por *P. aeruginosa* resistente a antibióticos estão associadas ao aumento das taxas de mortalidade, morbidade, necessidade de intervenções cirúrgicas, permanência da estadia hospitalar e cuidados crónicos (Hirsch e Tam, 2010). A aquisição de resistência durante o tratamento é um problema ainda maior, que se traduz na duplicação do tempo de internamento hospitalar e em maiores custos associados à terapêutica (Dimatatac *et al.*, 2003). As UCI merecem especial atenção quando se considera a resistência antibiótica de *P. aeruginosa*, uma vez que se detetam taxas de resistência superiores nos isolados recolhidos de pacientes internados nestas unidades do que nos restantes (Lister *et al.*, 2009), talvez devido à maior utilização de antibioterapia, associada ao estado mais debilitado da saúde destes doentes, que exige intervenções terapêuticas mais extremas e prolongadas. O mesmo fenómeno acontece com os doentes com infeções crónicas por *P. aeruginosa*, onde se incluem os doentes com fibrose quística.

Existem diversos programas de vigilância da resistência a antibióticos dos principais agentes patogénicos em todo o mundo. Na Europa, é o “European Antimicrobial Resistance Surveillance Network” (EARS-Net), promovido pelo “European Centre for Disease Prevention and Control” (ECDC), o principal programa de vigilância. Os dados mais recentes, relativos a 2011, referem valores de resistência globais na Europa (considerando um total de 29 países) para estirpes clínicas de *P. aeruginosa* de 18,6% para os carbapenemos (n=9734), com variações entre 3,5% (Holanda) e 66,7% (Roménia); 14,2% para a ceftazidima (CAZ) (n=9442), com variações entre 0% (Estónia) e 62,5% (Roménia); 16,5% para a piperacilina (PIP), associada ou não ao tazobactam (n=9348), com variações entre 0% (Estónia) e 66,7% (Roménia); 17,7% para os aminoglicosídeos (n=9522), com variações entre 0% (Estónia, Islândia e Noruega) e 66,7% (Roménia); e 22,5% para as fluoroquinolonas (n=9606), com variações entre 5,4% (Noruega) e 70% (Roménia). Para Portugal, este programa reporta taxas de resistência de 19,8% para os carbapenemos (n=505), 15,2% para a ceftazidima (n=526), 19% para a piperacilina, associada ou não ao tazobactam (n=522), 15,2% para os aminoglicosídeos (n=526) e 25,6% para as fluoroquinolonas (n=516). Analisando os dados entre 2008 e 2011, o mesmo relatório destaca uma tendência expressiva de crescimento da resistência aos aminoglicosídeos no nosso país, ao longo destes últimos 4 anos (ECDC, 2012).

Mais preocupante que as taxas globais de resistência, a prevalência de estirpes multirresistentes (MDR) (definida como a resistência combinada a pelo menos 3 antibióticos de classes diferentes) tem aumentado globalmente, atingindo valores de cerca de 20% nos EUA e superiores a 30% na Ásia (Mesaros

*et al.*, 2007). A ocorrência destas estirpes limita as opções terapêuticas para o tratamento das infecções por elas causadas e aumenta a probabilidade de transferência e disseminação de genes de resistência entre a população nosocomial. O relatório de 2011 do EARS-Net refere que 15,3% da população total de *P. aeruginosa* isolada na Europa nesse ano (n=9774) revelou ser resistente a pelo menos 3 classes diferentes de antibióticos e 4,6% apresentaram resistência às 5 classes de antibióticos vigiadas neste programa europeu [carbapenemos, cefalosporinas (ceftazidima), penicilinas (piperacilina associada ou não ao tazobactam), aminoglicosídeos e fluoroquinolonas]. Para Portugal, o EARS-Net reporta uma taxa de 16,2% de estirpes MDR (n=525) em 2011, evidenciando um ligeiro aumento dessa taxa desde 2008 (ECDC, 2012).

A crescente ocorrência de estirpes com maiores níveis de multirresistência, em que a terminologia para as designar não era consistente e originava confusão na comunidade científica e clínica, levou o ECDC e o “Center for Disease Control and Prevention” (CDC) a promoverem uma terminologia internacional padronizada para a designação dessas estirpes, publicada por Magiorakos *et al.* (2011) e atualizada, quando necessário, no sítio da internet do ECDC (<http://www.ecdc.europa.eu>). Assim, para além da definição de multirresistência, surgem agora os termos resistência-extensa (XDR) e pan-resistência (PDR) para descrever crescentes graus de resistência aos antibióticos, classificadas como a resistência a todos os grupos de antibióticos exceto a 1 ou 2 grupos, no primeiro caso, e resistência a todas as classes de antibióticos disponíveis contra um determinado patogénico, no caso da PDR. A introdução destas designações não só na comunidade científica, mas também na prática clínica vai permitir uma melhor comparação entre dados e, por consequência, uma melhor compreensão global e generalizada da problemática da multirresistência bacteriana de grau elevado (Magiorakos *et al.*, 2011). Falagas e Bliziotis (2007) apresentam uma revisão da literatura contendo uma súmula de estudos clínicos e de vigilância que descrevem a ocorrência de estirpes XDR e/ou PDR em *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e *Klebsiella pneumoniae*. Dos 3 estudos de vigilância relativos a *P. aeruginosa* incluídos nesta revisão, assinalaram-se taxas de XDR/PDR de 1,3%/0,08% (n=8705, em nível mundial, entre 2001 e 2004), 5%/<1,9% (n=527, EUA, 3 meses de 2003) e 100%/100% (n=13, Grécia, sem indicação do período a que reportam). Dos 2 casos clínicos evidenciados, as taxas de mortalidade associadas a *P. aeruginosa* PDR foram de 83,3% (n=6, Eslováquia, 2006, em UCI) e 20% (n=5, Grécia, 2005). Em 2012, Peña *et al.* apresentam um estudo espanhol retrospectivo a 2006-2007 envolvendo 474 estirpes MDR, em que 55,9% revelaram um fenótipo XDR, tendo sido isoladas sobretudo de vias respiratórias ou do sistema urinário. Outro estudo espanhol, envolvendo 10 hospitais de diferentes regiões de Espanha, reportou a ocorrência de 10,5% estirpes XDR (n=190) em amostras recolhidas de doentes com septicémias, sendo que a maioria das estirpes XDR pertenciam ao mesmo clone genético, encontrando-se disseminadas por 7 dos 10 hospitais geograficamente dispersos pelo país (Cabot *et al.*, 2012). Estudos portugueses sobre *P. aeruginosa* XDR ou PDR são desconhecidos até à data.

A incidência de estirpes XDR e PDR alerta para o problema crescente da falta de opção terapêutica para estes casos e do número muito limitado de novos agentes antimicrobianos em desenvolvimento





(Magiorakos *et al.*, 2011). A ocorrência sobretudo de estirpes PDR, ainda que atualmente seja baixa, deixa o médico quase sem qualquer possibilidade terapêutica, o que tem uma elevada importância clínica e de saúde pública (Falagas e Bliziotis, 2007). Medidas de controlo da infeção e do regime antibiótico são essenciais para controlar a disseminação de estirpes MDR (onde se inserem as XDR e PDR) de qualquer patogénico. Dentro do seio dos profissionais da saúde é cada vez mais reconhecida a importância da recomendação da lavagem das mãos entre pacientes, proposta por Semmelweis no início do século XX, entre outros aspetos de prevenção (Davies e Davies, 2010). Muitas sociedades científicas de renome, como a “Infectious Diseases Society of America” (IDSA) e a “European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases” (ESCMID), implementaram já diversos programas de redução da disseminação da resistência antibiótica (Falagas e Bliziotis, 2007). As políticas de prescrição de antibióticos devem considerar estratégias para otimizar a indicação, seleção, dosagem, via de administração, duração e periodicidade da administração antibiótica para maximizar a cura clínica ou a prevenção da infeção, limitando, em simultâneo, as consequências indesejadas da utilização da terapia antibiótica, incluindo a toxicidade para o paciente, e o surgimento de microrganismos resistentes (Gyssens, 2011). A antibioterapia empírica inicial é muito importante, uma vez que está associada a melhores resultados. Esta deve ser suportada em estudos epidemiológicos locais e é quase sempre iniciada com um beta-lactâmico em conjunto com um aminoglicosídeo ou uma fluoroquinolona. A caracterização laboratorial dos patogénicos envolvidos na infeção deve ser feita o mais rapidamente possível e, logo que se tenham os dados relativos a esse estudo, deve-se ajustar de imediato o regime terapêutico para limitar, tanto quanto possível, a pressão seletiva dos antibióticos sobre as estirpes infecciosas, na tentativa de diminuir assim a probabilidade de desenvolvimento de resistências (Mesaros *et al.*, 2007).

A epidemiologia da resistência antibiótica em estirpes ambientais de *P. aeruginosa* é escassa quando comparada à existente para as estirpes clínicas, encontrando-se apenas alguns trabalhos científicos que perscrutam a resistência a antibióticos em estirpes obtidas em águas recreativas (sobretudo em piscinas e banheiras de hidromassagem), devido ao risco de foliculite e otite externa associado a esta bactéria (Tirodimos *et al.*, 2010; Lutz e Lee, 2011), ou em águas residuais numa perspetiva de disseminação das estirpes clínicas para o ambiente (Quinteira e Peixe, 2006; Slekovec *et al.*, 2012). No entanto, não há um estudo que reúna essa informação numa forma global, geográfica, comparativa e temporal. Alguns trabalhos ilustram a resistência em isolados de águas de rio, mar e de profundidade (da Silva *et al.*, 2007; Blasco *et al.*, 2008; Khan *et al.*, 2007) e outros ainda em solos e composto (Kaszab *et al.*, 2010; Kaszab *et al.*, 2011). A maioria destes estudos inclui antibióticos a que *P. aeruginosa* é intrinsecamente resistente, pelo que a sua relevância científica para a epidemiologia de resistência no ambiente é diminuta. Conhecendo a ubiquidade desta bactéria e a sua enorme plasticidade genómica, o conhecimento do resistoma natural ou do potencial de aquisição de resistência de *P. aeruginosa* poderá contribuir para melhor definir as estratégias terapêuticas direcionadas a este importante agente patogénico.

## 1.4.2. Mecanismos de resistência

*P. aeruginosa* possui virtualmente todos os mecanismos de resistência antibacterianos conhecidos (Strateva e Yordanov, 2009). Estes dividem-se em 3 tipos: alterações na permeabilidade da membrana externa da parede celular por alteração e diminuição de porinas ou produção de bombas de efluxo, diminuindo a entrada do antibiótico ou aumentando a sua extrusão do interior da célula, respetivamente; enzimas inativadoras dos antibióticos, impedindo a sua normal atividade; e modificação dos alvos citoplasmáticos, impedindo a ligação dos antibióticos aos seus alvos e consequente inativação do seu papel antibiótico no interior da célula (Mesaros *et al.*, 2007; Lister *et al.*, 2009; Strateva e Yordanov, 2009; Davies e Davies, 2010). A tabela 1 reúne os principais mecanismos de resistência existentes em *P. aeruginosa*.

**Tabela 1** – Principais mecanismos de resistência presentes em *P. aeruginosa* em relação aos principais grupos de antibióticos utilizados para o tratamento de infeções causadas por esta bactéria.

	Diminuição da Permeabilidade da Parede Celular		Enzimas Inativadoras de Antibióticos				Modificação dos Alvos Bacterianos	
	Diminuição de OprD	Bombas de efluxo	Beta-lactamases			Modificadoras de aminoglicosídeos	Mutações das topoisomerasas	Metilação ribossomal
			Aumento AmpC	OXA	ESBL			
Beta-lactâmicos								
Penicilinas		+	+	+	+			
Cefalosporinas		+	+	(+)	+			
Aztreonam		+	+	+	+			
Imipenem	+					+		
Meropenem	(+)	+				+		
Aminoglicosídeos								
Fluoroquinolonas		+				+		(+)

OprD – porina OprD; OXA – oxacilinase (de espectro alargado); ESBL – beta-lactamases de espectro alargado; MBL – metalo-beta-lactamases  
Adaptado de Mesaros *et al.*, 2007.

A resistência aos beta-lactâmicos é conseguida através de estratégias de diminuição da permeabilidade da parede celular e inativação dos antibióticos pela produção de diversos tipos de beta-lactamases. A resistência aos aminoglicosídeos deve-se a enzimas que modificam a sua configuração ou a alterações conformacionais da sub-unidade 30S dos ribossomas, onde estes antibióticos se ligam, impedindo assim, por estas duas vias, a sua atividade bactericida. As fluoroquinolonas podem ser excretadas por diversas bombas de efluxo, a sua entrada reduzida por diminuição da permeabilidade da parede celular ou, ainda, e sobretudo, por mutação dos genes que expressam as topoisomerasas, envolvidas na replicação do ADN, às quais as fluoroquinolonas se ligam em locais específicos que, pelas mutações ocorridas, mantêm a sua atividade replicadora, mas deixam de ser reconhecidos pelas fluoroquinolonas.

### 1.4.2.1. Diminuição da permeabilidade da parede celular

A permeabilidade da parede celular bacteriana é definida pelo volume de exclusão das suas porinas, proteínas hidrofílicas que adquirem uma conformação em canal e que atravessam a membrana externa da



parede celular bacteriana, tornando-a semipermeável, e que participam no transporte de nutrientes para o interior da célula, sendo portanto vitais para a sua sobrevivência. A análise da sequência genômica de *P. aeruginosa* identificou 64 porinas, divididas em 3 tipos, e que participam no transporte de açúcares, aminoácidos, fosfato, cátions divalentes e sideróforos (Hancock e Brinkman, 2002). As porinas presentes na membrana externa da parede celular de *P. aeruginosa* apresentam um volume de exclusão médio menor que o das porinas presentes noutras bactérias Gram-negativas, fazendo com que seja resistente a antibióticos de elevado peso molecular, como os macrólidos (Hancock e Brinkman, 2002). Por outro lado, alguns antibióticos hidrofílicos de menor peso molecular, como os beta-lactâmicos, aminoglicosídeos e algumas fluoroquinolonas conseguem utilizar algumas porinas para atravessar a membrana externa da parede celular.

Para além da baixa permeabilidade natural de *P. aeruginosa*, esta bactéria apresenta duas estratégias complementares para diminuir a concentração citoplasmática dos antibióticos por diminuição da permeabilidade da sua parede celular: diminuição da produção da porina OprD, envolvida na entrada de carbapenemos para a célula, e aumento da produção de bombas de efluxo, envolvidas na extrusão de antibióticos que cheguem ao citoplasma ou espaço periplasmático.

#### **1.4.2.1.1. Diminuição da produção da porina OprD**

A porina OprD é a principal porta de entrada dos carbapenemos nas células bacterianas, sobretudo o imipenemo (IP) e, em menor extensão, o meropenemo (MP) (por ser menos hidrofílico) (Mesaros *et al.*, 2007; Strateva e Yordanov, 2009). *P. aeruginosa* consegue regular negativamente a produção desta porina na presença do antibiótico hidrofílico por mecanismos que diminuem a expressão transcricional do gene *oprD*, por quebra do gene promotor, terminação prematura da transcrição e co-regulação com bombas de efluxo. Outro processo que pode estar envolvido na diminuição da produção de OprD prende-se com a ocorrência de mutações genéticas, que interrompem o processo de transcrição da porina através de inserções ou deleções de bases nucleotídicas, criando falhas na transcrição ou o surgimento prematuro de códons-stop. Contudo, estes mecanismos não são ainda completamente conhecidos, dificultando, algumas vezes, a ligação dos fenótipos resistentes a um mecanismo de resistência específico (Lister *et al.*, 2009).

#### **1.4.2.1.2. Produção de bombas de efluxo**

O transporte ativo de antibióticos para o exterior da célula através de bombas de efluxo é um importante mecanismo não enzimático que confere resistência, em maior ou menor extensão, a quase todos os antibióticos anti-pseudomonais (Strateva e Yordanov, 2009). Alguns destes sistemas de extrusão são

expressos em valores basais em estirpes “wild-type” e participam na resistência intrínseca. Outros têm uma expressão induzida em resposta à pressão antibiótica (Mesaros *et al.*, 2007).

As bombas de efluxo, para além dos antibióticos, têm também como substratos biocidas, tintas, detergentes, solventes orgânicos, compostos aromáticos e AHL, componentes do *quorum sensing*, tendo assim também um papel fisiológico importante na comunicação célula-célula e na patogenicidade (Lister *et al.*, 2009). São 4 as principais bombas de efluxo envolvidas na resistência a antibióticos em *P. aeruginosa*: MexA-MexB-OprM, MexC-MexD-OprJ, MexE-MexF-OprN e MexX-MexY-OprM. A primeira e a última participam na resistência intrínseca e adquirida enquanto as outras duas participam apenas em mecanismos de resistência adquiridos. MexAB-OprM é a bomba de efluxo com o maior perfil de substratos, contribuindo para a resistência a quase todos os beta-lactâmicos (penicilinas, monobactâmicos, cefalosporinas de espectro alargado e os carbapenemos meropenemo e panipenemo, mas não o imipenemo e biapenemo) e fluoroquinolonas. O sistema MexCD-OprJ exporta sobretudo cefalosporinas de quarta geração [cefepima (FEP) e cefpiroma] e fluoroquinolonas. MexEF-OprN confere resistência a fluoroquinolonas e não é conhecido que tenha os beta-lactâmicos como substrato, contudo a sua sobreprodução, por mutação no locus *mexT*, confere co-resistência ao imipenemo, uma vez que esta mutação induz também uma diminuição na expressão da OprD. A sobreprodução da bomba MexXY-OprM afeta a suscetibilidade aos aminoglicosídeos e às fluoroquinolonas (Lister *et al.*, 2009; Strateva e Yordanov, 2009).

O efluxo de antibióticos confere um nível de resistência baixo a médio, mas pode restringir bastante as opções terapêuticas por promover a resistência conjunta a diferentes grupos de antibióticos; em acumulação com outros mecanismos de resistência pode conferir elevados níveis de resistência; e pode ainda favorecer a emergência de mutações por diminuir as concentrações dos antibióticos no interior da célula bacteriana para valores sub-inibitórios (Mesaros *et al.*, 2007).

#### **1.4.2.2. Produção de enzimas inativadoras de antibióticos**

A inativação enzimática de antibióticos está descrita para os beta-lactâmicos e aminoglicosídeos. A produção de beta-lactamases é o principal mecanismo de resistência adquirida aos beta-lactâmicos em *P. aeruginosa* (Strateva e Yordanov, 2009), existindo diversas enzimas, agrupadas em várias classes, capazes de romper o anel beta-lactâmico destes antibióticos, anulando-lhes assim a atividade antibacteriana por deixarem de conseguir interferir com a síntese do peptidoglicano. As enzimas que interferem com os aminoglicosídeos são codificadas em plasmídeos ou integrões e dividem-se em 3 classes, em função da sua atividade bioquímica (Strateva e Yordanov, 2009).



#### 1.4.2.2.1. Beta-lactamases

Segundo Ambler, este grupo de enzimas divide-se em 4 classes, A, B, C e D, em função das suas sequências genéticas e aminoacídicas. As classes A, C e D têm um centro ativo que contem serina, enquanto a classe B tem zinco no seu centro ativo, razão pela qual é conhecida como a classe das metalo-beta-lactamases (MBL) (Queenan e Bush, 2007).

A AmpC é uma beta-lactamase cromossômica habitualmente produzida em quantidades reduzidas (expressão reduzida), determinando a resistência intrínseca de *P. aeruginosa* a aminopenicilinas e à maioria das cefalosporinas de primeira geração (Strateva e Yordanov, 2009). Contudo, a sua produção pode ser aumentada entre 100 a 1000 vezes na presença de beta-lactâmicos indutores, como o imipenemo, conferindo resistência a todos os beta-lactâmicos exceto aos carbapenemos (Lister *et al.*, 2009). A atividade da AmpC não é inibida pelos inibidores de beta-lactamases como o ácido clavulânico ou o tazobactam (Nordmann e Guibert, 1998).

As beta-lactamases de espectro alargado (ESBL) são enzimas hidrolíticas que conferem resistência a todos os beta-lactâmicos, exceto aos carbapenemos (ainda que uma delas, GES-2, consiga hidrolisar carbapenemos), e são inibidas pelos inibidores de beta-lactâmicos. Existem diversas sub-classes de ESBL, em função das suas capacidades hidrolíticas específicas: SHV, TEM, CTX-M, PER, VEB e GES (entre outras), todas pertencentes à classe A de Ambler (Paterson e Bonomo, 2005). As oxacilinases (OXA) são consideradas um grupo à parte dentro das ESBL, por pertencerem a uma classe de Ambler diferente (classe D), por não hidrolisarem as cefalosporinas de espectro alargado e ainda pelo facto de, à exceção da OXA-18, não serem inibidas pelos inibidores de beta-lactâmicos, como acontece com as restantes ESBL (Strateva e Yordanov, 2009). Estas beta-lactamases ocorrem em *P. aeruginosa*, onde foram pela primeira vez identificadas, e são caracterizadas pela hidrólise da oxacilina e cloxacilina (Paterson e Bonomo, 2005). Existem diversas oxacilinases em *P. aeruginosa*, agrupadas em 5 tipos, e a maioria é codificada em plasmídeos ou integrões, o que contribui para a sua disseminação (Strateva e Yordanov, 2009).

As MBL são um grupo distinto de beta-lactamases, caracterizadas pelo facto do seu centro ativo conter iões de zinco e por serem suscetíveis à ação de agentes quelantes, como o EDTA. Estas metaloenzimas degradam todos os beta-lactâmicos, exceto os monobactâmicos, o que lhes confere o título da família mais versátil das beta-lactamases (Queenan e Bush, 2007) e não são inibidas pelos inibidores das beta-lactamases. Agrupam-se em vários subgrupos, em função da sua conformação estrutural, sendo os principais as IMP, VIM, SPM e GIM, e disseminam-se através de plasmídeos e integrões. A característica mais importante deste grupo de beta-lactamases é o facto de degradarem numa forma muito eficiente os carbapenemos, o que lhes é quase exclusivo, e traduz-se numa grande limitação nas opções terapêuticas, sobretudo porque também não são sensíveis aos inibidores de beta-lactamases (Cornaglia *et al.*, 2011).

#### 1.4.2.2. Enzimas modificadoras de aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos atuam interferindo na atividade ribossomal, inibindo a síntese proteica, o que leva à morte da célula bacteriana. As enzimas modificadoras de aminoglicosídeos inativam estes antibióticos pela adição de um radical fosfato, adenil ou acetil à molécula, diminuindo assim a afinidade do antibiótico ao seu alvo na célula bacteriana: a sub-unidade 30S do ribossoma bacteriano. Estas enzimas dividem-se em 3 categorias, em função da sua atividade: aminoglicosídeos fosforiltransferases, aminoglicosídeos adeniltransferases e aminoglicosídeos acetiltransferases, sendo estas as mais frequentes em *P. aeruginosa* (Strateva e Yordanov, 2009).

#### 1.4.2.3. Modificações dos alvos bacterianos

A alteração conformacional dos alvos bacterianos a que os antibióticos se ligam quando entram no citoplasma bacteriano é uma estratégia utilizada por algumas bactérias Gram-negativas, incluindo *P. aeruginosa*. Esta estratégia revela-se eficaz na resistência contra as fluoroquinolonas e aminoglicosídeos.

As fluoroquinolonas ligam-se à ADN-girase, ou topoisomerase, impedindo assim a replicação do ADN. Tal situação origina a morte celular e a conseqüente diminuição da densidade populacional bacteriana, debelando assim a infeção. A resistência às fluoroquinolonas, por alteração dos alvos bacterianos, acontece através de alterações na conformação da ADN-girase, causadas por mutações pontuais nos genes *gyrA/gyrB*, que codificam a zona identificada como “região determinante para a resistência às quinolonas” (QRDR), a região da enzima bacteriana considerada como o sítio ativo destes antibióticos. Estas mutações originam a síntese de uma topoisomerase com uma conformação alterada, de menor afinidade para as fluoroquinolonas (Strateva e Yordanov, 2009).

A metilação da sub-unidade 16S do ácido ribonucleico (ARN) ribossomal confere resistência aos aminoglicosídeos, impedindo-os de se ligarem ao ribossoma bacteriano. A primeira ARN-metilase em *P. aeruginosa*, codificada pelo gene *rmtA*, foi reportada no Japão em 2003, tendo-se demonstrado que conferia uma elevada resistência a todos os aminoglicosídeos administrados por via parentérica e apresentou-se muito associada a elementos genéticos móveis (Poole, 2005). Uma nova ARN-metilase, RmtD, foi identificada numa estirpe PDR de *P. aeruginosa* no Brasil, em 2005, conferindo também uma resistência generalizada a este grupo de antibióticos (Doi *et al.*, 2007).

A resistência a beta-lactâmicos por alteração na conformação das “proteínas ligadoras às penicilinas” (PBP), diminuindo a sua afinidade às penicilinas, foi já reportada em *P. aeruginosa*, após tratamentos com imipenemo ou doses elevadas de piperacilina em doentes com fibrose quística, mas estes eventos são raros (Strateva e Yordanov, 2009).



## 1.5. Disseminação de fatores de virulência e resistência a antibióticos

A conhecida ubiquidade e elevada capacidade de resistência a substâncias antimicrobianas de *P. aeruginosa* é seguramente consequência do seu enorme genoma, que contém uma grande quantidade de genes reguladores e genes envolvidos no catabolismo, transporte e efluxo de compostos orgânicos, numa das maiores proporções observadas em genomas procarióticos (Stover *et al.*, 2000). Mas um segundo aspeto muito relevante do genoma desta bactéria estará também envolvido no seu sucesso evolutivo: a expressiva percentagem de genoma flexível, ou móvel, estimado em cerca de 10% de todo o seu genoma (Wolfgang *et al.*, 2003).

O genoma de uma bactéria consiste dum núcleo central, “core”, invariável e comum a todas as estirpes da sua espécie, e uma parte variável, ou flexível, que varia entre os clones desse *taxon* (Klockgether *et al.*, 2007). Este genoma flexível adquire ou perde informação genética por processos de transferência genética horizontal (TGH) (Battle *et al.*, 2009), a pedra angular da evolução bacteriana (Hacker e Carniel, 2001). Este material genético móvel é designado por elementos genéticos móveis (EGMs) e são compostos por ilhas genómicas (Battle *et al.*, 2009), integrões, transposões, sequências de inserção, bacteriófagos e plasmídeos (Hacker e Carniel, 2001; Klockgether *et al.*, 2007). Nestas unidades genéticas móveis podem encontrar-se genes de virulência ou genes de resistência (Hacker e Carniel, 2001; Battle *et al.*, 2009), o que lhes confere uma importância central na disseminação de fatores de virulência e de resistência a antibióticos pelo microbioma envolvente às bactérias que os contêm.

### 1.5.1. Ilhas genómicas

As ilhas genómicas são regiões cromossomais flanqueadas por repetições diretas e inseridas na parte final 3' de um gene tARN, apresentam um conteúdo G+C distinto do resto do genoma (Klockgether *et al.*, 2007) e variam no seu tamanho entre 10 a 100 kb (Hacker e Carniel, 2001). Contêm grupos de genes com funções específicas como os sistemas de aquisição de ferro ou sacarose, importantes para promover o crescimento bacteriano e disseminação no ambiente, bem como genes que codificam toxinas ou fatores de aderência, habitualmente associados à patogenicidade, mas também importantes no aumento do “fitness” da bactéria quando sob stress (Hacker e Carniel, 2001). Estas unidades genéticas foram descobertas em bactérias patogénicas, razão pela qual se designaram, na altura, por ilhas de patogenicidade, mas, desde então, têm sido detetadas em inúmeras espécies não patogénicas (Klockgether *et al.*, 2007), o que demonstra a sua importância em termos adaptativos e evolutivos para os procariontes.

Em *P. aeruginosa*, diversas ilhas genómicas foram já identificadas: PAGI-1, PAGI-2, PAGI-3, PAGI-4, PAPI-1, PAPI-2 e, mais recentemente, as PAGI-5 a PAGI-11 (Battle *et al.*, 2009). Todas apresentam um



elevado número de “open reading frames” (ORF), uma região cromossômica que não apresenta codões stop, o que é sugestivo da presença de “regiões codificadoras de proteínas”, ou genes, na ilha genômica, destacando assim a importância que estas estruturas podem ter na patogenicidade, resistência ou adaptabilidade ecológica bacteriana (Klockgether *et al.*, 2007; Morales-Espinosa *et al.*, 2012).

### 1.5.2. Integrões

Os integrões são elementos genéticos móveis capazes de adquirir e rearranjar ORFs inseridas em cassetes de genes e convertê-las em genes funcionais, garantindo a sua correta expressão, tendo sido originalmente identificados como um mecanismo de aquisição de genes de resistência e expressão múltipla de fenótipos de resistência em sinergia com transposições, em bactérias Gram-negativas (Cambray *et al.*, 2010). Os integrões podem encontrar-se inseridos em transposições, plasmídeos ou no cromossoma da bactéria e são constituídos por um componente inicial que contém uma recombinase, a integrase, seguida de um sítio específico de recombinação, que permite a inserção do integrão noutra estrutura genômica, e por um componente secundário que contém fragmentos de ADN, designados por cassetes de genes, que são incorporados ou translocados em simultâneo com o integrão.

Estes EGMs são classificados de acordo com o tipo de integrase que possuem, conhecendo-se atualmente integrões de classe 1 até à classe 9, sendo os de classe 1 a 3 os mais frequentes (Ruiz-Martínez *et al.*, 2011). Os integrões de classe 1 foram os primeiros a serem descobertos, estão associados a dezenas de genes de resistência diferentes e encontram-se em diversos ambientes e bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (Nemergut *et al.*, 2008). São também os integrões mais encontrados em *P. aeruginosa* e são compostos por um segmento conservado 5', que inclui o gene para a integrase *intl*, seguido do sítio de recombinação *attI* e uma região promotora  $P_{ant}$ , e o segmento conservado 3'. Entre estes dois segmentos encontra-se a zona variável onde uma ou várias cassetes de genes estão inseridas e são expressas sob controlo da  $P_{ant}$ . Os integrões de classe 2 e classe 3 contêm os genes de integrase *intl2* e *intl3*, 40% e 61% semelhantes ao *intl*, respetivamente, e quase nunca são encontrados em *P. aeruginosa* (Fonseca *et al.*, 2005).

### 1.5.3. Transposições e sequências de inserção

Os transposições são elementos genéticos móveis que podem mudar a sua posição relativa dentro do genoma, podendo, com essas deslocções, criar ou reverter mutações genéticas. Habitualmente carregam um ou mais genes adicionais, na maioria das vezes de resistência a antibióticos, para além





daqueles envolvidos na transposição. Os transposões conseguem passar do ADN cromossomal para o ADN plasmídico, e vice-versa, o que permite a transferência de material genético entre ambos, podendo até levar à adição permanente de ADN no genoma cromossomal de uma bactéria. Participam também em processos de conjugação, uma das estratégias para a troca de material genético entre duas células bacterianas, designando-se, nesses casos, por transposões conjugativos. Esta promiscuidade genética envolvendo transposões verifica-se também no mecanismo de transdução, descrito abaixo, dado que podem “saltar” para a cápside de bacteriófagos e serem injetados noutras células por esta via (Frost *et al.*, 2005). Quando o elemento de transposição não apresenta nenhuns genes adicionais aos genes de transposição é designado por sequência de inserção.

A presença de transposões em *P. aeruginosa* está descrita por alguns autores, dos quais se destaca Yu *et al.* (2006), que referem a inserção de integrões contendo o gene codificador da MBL VIM-2 em transposões, o que favorece a transposição, dentro e fora do genoma da célula deste preocupante determinante de multirresistência. Também genes que codificam ESBLs foram já encontrados inseridos em transposões (Dubois *et al.*, 2002), bem como genes de resistência a aminoglicosídeos (Yamane *et al.*, 2004).

#### **1.5.4. Bacteriófagos**

Os bacteriófagos são vírus que infetam bactérias e participam em processos de transferência de material genético entre diferentes células bacterianas, por um processo designado por transdução, em que os bacteriófagos podem recolher ADN de uma bactéria e injetá-lo noutra (Frost *et al.*, 2007), podendo assim participar na disseminação de fatores de virulência e resistência.

Segundo Garbe *et al.* (2011), em Agosto de 2010 conheciam-se 586 genomas de fagos e 46 respeitavam a fagos que infetam *P. aeruginosa*.

#### **1.5.5. Plasmídeos**

Os plasmídeos são um conjunto de genes organizados numa entidade estável e auto-replicativa, de tamanho menor que o cromossoma da célula. Habitualmente não contêm genes associados às funções celulares essenciais e apresentam-se em forma circular de cadeia dupla de ADN. A sua anatomia inclui um grupo de genes associados às funções replicativas e um conjunto variável de genes que codificam processos distintos daqueles presentes no cromossoma da bactéria (Frost *et al.*, 2005), codificando genes envolvidos na virulência e resistência antibiótica, bem como genes associados a interações ecológicas e mecanismos de desintoxicação da célula bacteriana (Smillie *et al.*, 2010). Por serem auto-replicativos, estes EGMs têm que



se replicar controlando o número de cópias e têm que garantir a sua passagem para as células-filhas aquando da divisão celular, num processo conhecido por partição. É impossível a co-existência de plasmídeos diferentes com o mesmo mecanismo de replicação, um fenómeno designado por incompatibilidade. Esta característica está na base da classificação dos plasmídeos, dividindo-os por grupos de incompatibilidade. Frost *et al.* (2005) refere a existência de 14 grupos de incompatibilidade na família Pseudomonadaceae.

A mobilidade plasmídica, entre diferentes células, é um fenómeno bem descrito e muito explorado na Engenharia Genética. Esta característica confere-lhes a capacidade de rápida e eficazmente disseminarem os determinantes de virulência e/ou resistência que contêm. Em *P. aeruginosa* estão descritos alguns plasmídeos que contêm genes codificadores de ESBLs e genes de resistência a aminoglicosídeos, cloranfenicol e sulfonamidas, mas ainda não foram detetados plasmídeos contendo genes codificadores de cefalosporinases, ainda que a estrutura de algumas cefalosporinases contidas em plasmídeos, de outras espécies, seja bastante semelhante à estrutura da cefalosporinase AmpC, cromossómica, de *P. aeruginosa* (Strateva e Yordanov, 2009).

Em *P. aeruginosa*, a maioria dos genes que codificam as ESBLs TEM e SHV, bem como a maioria das oxacilinases e algumas MBLs, estão localizados em plasmídeos ou em integrões, contribuindo para a sua rápida disseminação, devido à mobilidade plasmídica (Strateva e Yordanov, 2009).



## 2. Termalismo: *Sanum per aquam*

### 2.1. História do termalismo europeu e nacional

Desde o início dos tempos que o Homem procura a água, porque é ela essencial à Vida (Cortez, 2012). Diz o autor que já a Bíblia contém referências à miraculosidade das fontes de água, quando Moisés, para saciar o povo fugitivo do Egito, tocou com o seu bastão numa rocha do Monte Horeb e dela brotou água. Em várias doutrinas religiosas e filosóficas, a água é elemento central de diversos rituais e abluções de purificação, condição essencial da salvação da alma para os cristãos e islamitas. Desde os tempos primitivos, e durante muitos séculos, as doenças foram consideradas como “castigos” dos deuses, ou de Deus e, sendo a água um elemento de “purificação”, desde sempre o Homem procurou as águas, sobretudo quentes, para tratar/purificar a saúde.

O uso medicinal de águas quentes é conhecido desde o Paleolítico Superior, em França. No Neolítico, foi construído, em Itália, um poço para as captar e no Egito e na Grécia construíram-se edifícios que pensa-se terem sido hospitais termais. Atribui-se a Vitruvius e a Plínio, o Antigo, o estudo e o início da classificação das águas minerais. Durante séculos, em Roma, a terapia foi exclusivamente hídrica. Este povo foi um forte impulsionador das práticas termais, sendo que no século IV a.C. já havia em Roma 856 banhos públicos e 14 termas, atingindo o consumo diário de água os 750 milhões de litros. A ocupação romana de França multiplicou a utilização das águas minerais naquele país e, a partir dela, as estâncias termais foram procuradas não apenas com fins curativos, mas também com fins de repouso e lazer pelas legiões romanas. Os célebres médicos Hipócrates, Galeno e Heródoto defendiam as virtudes da água e receitavam a sua aplicação em banhos. Em Portugal, em Lisboa, terão sido construídas pelos irmãos Cássio, em 49 a.C., as Termas Cassianas e, em Vizela, a construção ou reconstrução de um balneário anterior foi feita entre 81 e 90 d.C., no tempo do imperador Tito Flávio. Trajano (imperador romano entre 89 e 113 d.C.) mandou construir vários estabelecimentos termais na Península Ibérica, um deles em Chaves. Várias outras termas portuguesas foram também frequentadas por romanos, onde se inclui Conímbriga, Monte Real, São Pedro do Sul e Miróbriga, entre outras. Os árabes, por influência do médico Avicena, mantiveram em Portugal (e na Península) os luxuosos balneários romanos e a terapia pela água (Cortez, 2012).

Na Idade Média mantem-se a importância da hidroterapia, na Península Ibérica e por toda a Europa, tendo, inclusive, Carlos Magno, em França, escolhido Aix-le-Chapelle para capital do seu império, por causa das termas existentes nesse local. Os reis portugueses foram também frequentadores e promotores das termas: Afonso Henriques terá tratado nas Termas de São Pedro do Sul as sequelas do seu desastre na Batalha de Badajoz, a rainha D. Leonor mandou construir o Hospital Termal das Caldas da Rainha e a rainha



D. Amélia, esposa de D. Carlos, tratava de alguns problemas físicos nas Termas de São Pedro do Sul, sendo ainda hoje lá homenageada, com o seu nome atribuído a um dos edifícios termais (Cortez, 2012).

No Renascimento, com os estudos realizados pelo célebre médico suíço Paracelso acerca dos efeitos terapêuticos das águas, a aplicação das águas minerais começa a sair do empirismo e do cariz religioso ou mítico, mas no final do século XVIII assiste-se a um período de declínio do termalismo, motivado pela facilidade com que os aquistas se entregavam aos “prazeres da carne”, circunstância bastante penalizada pela Igreja e pelo poder que exercia na altura em toda a sociedade. O início do século XX assiste a um renascimento da atividade termal, sobretudo em França, considerado então o país do termalismo, prática que, na época, era o único meio de tratar afeções como a litíase renal e certas doenças específicas dos retornados das colónias. A criação da Segurança Social fez com que o termalismo deixasse de pertencer apenas à elite, tornando-o acessível a todos, o que motivou o aumento significativo do número de utentes termais na primeira metade do século por toda a Europa (Cortez, 2012).

A partir de meados desse século, começou a ser investigada a relação causa-efeito dos conhecidos benefícios das águas minerais, contudo, os primeiros estudos sobre a água termal, com algum carácter científico, datam do século XVII. Em Portugal, o médico de D. João V, Dr Francisco da Fonseca Henriques, publicou, em 1726, o seu “Aquilégio Medicinal” que, pela primeira vez, sistematiza as águas medicinais então conhecidas em Portugal. Pouco tempo depois, o Marquês de Pombal contratou o naturalista italiano Domingos António Vandelli para professor do Colégio dos Nobres, em Coimbra, e encarrega-o do estudo das nossas nascentes minerais, trabalho que foi a base para que as águas minerais fossem consideradas de utilidade pública. Foi Vandelli, com o seu discípulo Martins Pessoa, que efetuou, entre 1778 e 1781, na Universidade de Coimbra, a primeira análise de uma água mineral natural portuguesa, das Caldas da Rainha. Na sequência do trabalho de Vandelli e seus colaboradores, foi publicado, em 1894, o “Regulamento das Águas Portuguesas”. Espanha já possuía legislação idêntica desde 1816 e França desde 1589. Em 1919, é publicado o Decreto nº 5787-F, de 10 de maio, sobre a regulamentação das águas minerais. Segue-se, em 1928, o Decreto nº 15401, de 17 de abril, com disposições alargadas a águas de mesa e proteção bacteriológica das águas, vigente até 2004, altura em que o Decreto-Lei (DL) nº 142/2004, de 11 de junho, é publicado (Cortez, 2012), estabelecendo “novas regras no domínio do licenciamento dos estabelecimentos termais, da organização, do funcionamento e da fiscalização do sector”.

## 2.2. Terapia termal: princípios, indicações e contraindicações

A prática termal é entendida e reconhecida pela Organização Mundial da Saúde como uma prática de cuidados de saúde, da qual os seus praticantes obtêm melhorias de uma patologia específica e/ou melhorias do seu estado geral de saúde. A crenoterapia é a utilização da água mineral natural (AMN) como medicamento, quer seja por via interna ou externa, pressupondo a “utilização terapêutica das ações da água mineral natural resultantes da sua composição química (...) isto é, os seus efeitos bioquímicos, a sua atividade sobre os problemas fisiopatológicos”. A hidroterapia, designada por balneoterapia quando realizada num estabelecimento termal, utilizando água mineral natural, soma às ações crenoterápicas “as resultantes das ações próprias da hidroterapia em sentido lato: a utilização terapêutica das propriedades mecânicas e das propriedades térmicas da água” (Teixeira, 2012). A tabela 2 reúne os fatores e efeitos dessas duas vertentes da prática termal, bem como os efeitos inespecíficos associados ao ambiente termal.

**Tabela 2** – Fatores e efeitos da hidroterapia e da crenoterapia, bem como do ambiente termal.

<b>A – Efeitos comuns (Hidroterapia e crenoterapia)</b>	
<b>1 – Mecânicos</b>	
Flutuação (princípio de Arquimedes)	Facilitação de movimentos
Pressão hidrostática	Efeitos cardiovasculares
Densidade, viscosidade, tensão superficial	Facilitação da circulação de retorno dos membros inferiores
	Resistência hidrodinâmica ao movimento
<b>2 – Térmicos</b>	
Temperatura	Efeitos vasculares periféricos
	Efeito sedante e analgésico
	Relaxamento muscular (controlo de contrações musculares, de fadiga muscular)
	Ativação geral dos mecanismos de defesa orgânica (Síndrome do tipo de adaptação geral)
<b>B – Efeitos próprios da água mineral (Crenoterapia)</b>	
Mineralização da água	Ação farmacológica específica
	- ação direta sobre pele e mucosas
	- após absorção através da ingestão oral, da pele, ou via respiratória
<b>C – Efeitos inespecíficos do ambiente termal</b>	
Ambiente, clima, convívio	Efeitos psicoterápicos
	Relaxamento termal/Bem-estar termal
	Cuidados higiénico-dietéticos

Adaptado de Teixeira, 2012.

A esta combinação de fatores e efeitos, associam-se ainda as características físico-químicas únicas de cada água mineral natural, classificadas físico-quimicamente em diversas categorias em função da temperatura de emergência, pH, resíduos sólidos e principais oligoelementos, traduzindo-se numa série de indicações terapêuticas gerais que o mesmo autor apresenta num quadro resumo (tabela 3), dividindo-as em doenças orgânicas crónicas, alterações funcionais rebeldes e convalescença e recuperação, as três áreas de intervenção do termalismo terapêutico.

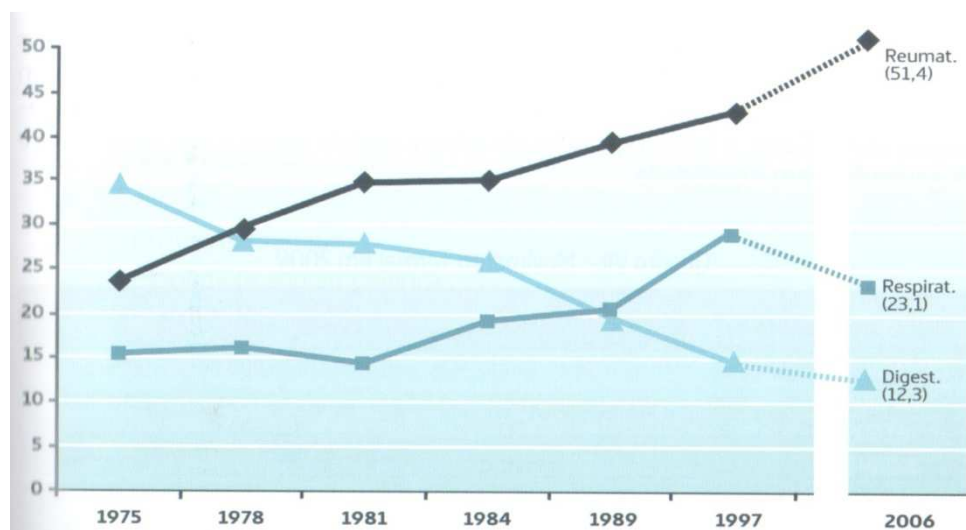
**Tabela 3** – Indicações da terapêutica termal.

<b>1 – Doenças orgânicas crônicas</b>	
<b>Afeções</b>	<b>Objetivos</b>
Reumatismos Doenças respiratórias Doenças otorrinolaringológicas Doenças da pele Sequelas de acidentes vasculares cerebrais Deficientes neurológicos Doenças metabólicas	Auxiliar na regressão ou até na cura Impedir a fixação de lesões Melhorar a tolerância a lesões Redução de medicamentos Desintoxicação a medicamentos
<b>2 – Alterações funcionais rebeldes</b>	
<b>Afeções</b>	<b>Objetivos</b>
Doenças digestivas crônicas Perturbações arteriovenosas Asma brônquica	Modificar a reatividade muscular, de mucosas e imunológica Complementar quimioterapia
<b>3 – Convalescença e recuperação</b>	
<b>Afeções</b>	<b>Objetivos</b>
Politraumatismos Pós-cirurgia Doenças neuropsíquicas Stress	Apressar restabelecimento Impedir sequelas Educação comportamental, higiénica e alimentar Repouso/Exercício

Adaptado de Teixeira, 2012.

Tal como qualquer outra técnica terapêutica, também a terapia termal tem não só indicações como contra-indicações. Estas podem ser específicas, diretamente relacionadas com a situação clínica e a tipologia (composição) da água mineral natural, ou gerais, relacionadas com a situação clínica e a terapia termal no seu todo. Destas, destacam-se os processos agudos ou crises de agudização de processos crônicos, onde se inserem todos os processos inflamatórios e infecciosos evolutivos, todos os processos tumorais malignos, lesões orgânicas ou funcionais graves (insuficiência cardíaca descompensada ou insuficiência hepática ou renal graves), mau estado geral e afeções psíquicas graves. Também toda a terapêutica é suscetível de causar efeitos secundários, sendo os associados à terapêutica termal aqueles envolvidos no agravamento do processo que motivou o recurso à terapêutica termal e a exacerbação ou disseminação de processos latentes, motivados por um insuficiente diagnóstico, má prescrição ou má vigilância da terapêutica termal. A crise termal é outro efeito secundário, caracterizado por uma reação sistémica geral exagerada que ocorre pelo 3º ou 4º dia de tratamentos, causada por erro técnico, má prescrição ou consequente da reação natural do paciente à própria água termal (Teixeira, 2012).

As afeções responsáveis pela maior frequência termal em Portugal têm sido as reumáticas, as digestivas e as do foro respiratório e otorrinolaringológico (ORL) (figura 4). As restantes (doenças metabólicas-endócrinas, nefro-urinárias e da pele) representam uma minoria, bastante distanciada destas (Teixeira, 2012).



**Figura 4** – Evolução ao longo de 41 anos da taxa de procura de terapêutica termal para os 3 principais grupos de doenças tratadas nos estabelecimentos termais portugueses (Teixeira, 2012). Resultados em percentagem. Abcissas – tempo (em anos). Reumat. – doenças reumatológicas; Respirat. – doenças respiratórias e otorrinolaringológicas; Digest. – doenças digestivas.

Como realça o autor, é interessante verificar a variação das posições relativas das 3 principais afeções tratadas em ambiente termal ao longo de 40 anos: a grande subida na procura de tratamentos termais para as doenças reumatológicas e do foro respiratório e ORL e a queda progressiva no interesse pelo tratamento das doenças digestivas. Esta queda deveu-se ao aparecimento de potentes anti-ulcerosos e modificadores da motilidade e do tónus muscular liso, e o aumento da procura dos tratamentos para as doenças reumatológicas e respiratórias crónicas à continuação da inexistência de medicamentos eficazes e seguros ou até os progressivos alertas sobre alguma da sua toxicidade, no que concerne aos anti-inflamatórios não esteroides, por exemplo (Teixeira, 2012).





## 2.3. Principais técnicas termais

Segundo Teixeira (2012) e Almeida (2013), as técnicas termais podem ser de administração interna ou aplicação externa e terem uma aplicação geral ou específica. Nas técnicas de administração interna, utilizam-se sobretudo os efeitos dependentes da composição química da água mineral natural e dividem-se em 3 tipos: ingestão ou hidropínia, administração colo-retal ou vaginal e ainda a injeção, todas para efeito de absorção dos elementos químicos dissolvidos na água mineral natural. As técnicas de aplicação externa, para além dos efeitos do quimismo da água, podem ser administradas sob diversas formas, com indicações específicas a diferentes patologias (Almeida, 2013, comunicação pessoal):

- a) Banhos de água: gerais (imersão em banheira ou em piscina) ou locais (pedilúvio, manilúvio, semicúpio); simples ou associados (hidromassagem, com jato subaquático, água corrente ou aerobanho). A duração e a temperatura dependem dos objetivos terapêuticos a alcançar, podendo ser de contraste (variando a temperatura ao longo do tratamento). Destinam-se ao tratamento de diversas osteoartroses ou psoríase (banho de água corrente). A piscina pode ainda ser utilizada para a realização de exercícios respiratórios, para o tratamento de asma.
- b) Duches de água: de jato ou de vapor, podendo ser gerais, regionais ou locais. Os duches de jato podem ser simples ou associados (a banhos ou a massagem) e de pressão muito fraca (em chuveiro ou crivo), fraca (em leque), forte (em “cascata” ou “jato quebrado”) a muito forte (jato filiforme). A duração e a temperatura dependem dos objetivos terapêuticos a alcançar. Os duches de vapor habitualmente são realizados a temperaturas entre os 40°C e os 45°C. Ambos se destinam ao tratamento de vários tipos de osteoartroses e, no caso do duche de jato filiforme, também ao tratamento de bronquite crónica.
- c) Técnicas de aplicação médica: de água (duche filiforme ou água corrente) ou gás da água mineromedicinal, de aplicação local, para o tratamento de patologias de ORL (amigdalites, faringites, sinusites, rinites, otites, tubotimpanites). A temperatura é isotérmica e a duração depende dos objetivos terapêuticos a alcançar.
- d) Outras técnicas aplicadas às patologias respiratórias e de ORL: irrigações e duches nasais ou faríngeos; inalações (aerossóis e nebulizações). No caso dos tratamentos da mucosa nasal, a água mineral natural é isotonicada por adição de sal à água termal, única alteração química permitida na prática termal, devido à especificidade da mucosa nasal (verificando-se o mesmo nas técnicas de aplicação médica, quando aplicadas sobre esta mucosa). As inalações simples ou com variação de pressão e densidade de vapor têm objetivos terapêuticos associados a rinites, sinusites, asma e bronquite crónica. As irrigações e duches nasais ou faríngeos destinam-se ao tratamento de rinites ou amigdalites e faringites, respetivamente.

Importa esclarecer que o termo “vapor” não tem aqui o mesmo conceito genérico de evaporação da água quando atinge os 100°C, mas é sim o resultado da repartição da água mineral natural em micropartículas, de maior ou menor dimensão, conforme o objetivo do tratamento termal, produzidas pelo equipamento termal.

A figura 5 apresenta alguns exemplos de equipamentos e tratamentos termais.

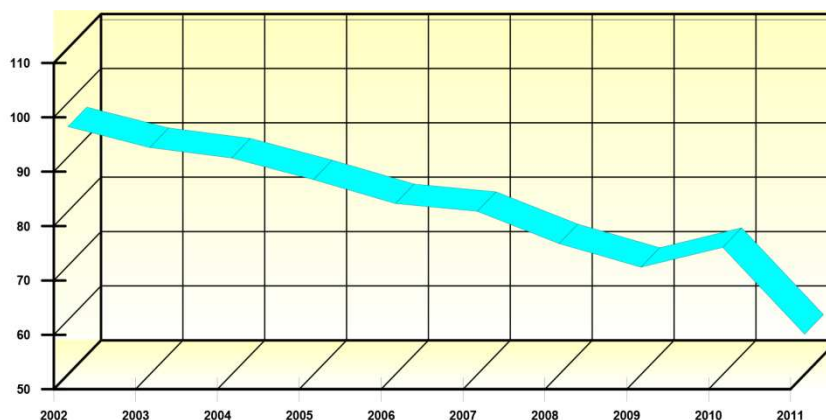


**Figura 5** – Exemplos de equipamentos e tratamentos termais. 1 – banheira de imersão com hidromassagem; 2 – duche localizado, automático, aos membros inferiores; 3 – duche de jato em cachão, manual; 4 – duche de vapor à coluna; 5 – duche de vapor aos pés e mãos; 6 – duche de jato de Vichy com massagem manual; 7 – equipamento de aerossol manossônico; 8 – tratamento de inalação por aerossol; 9 – técnica de aplicação médica (drenagem de Pröetz); 10 – equipamento de nebulização coletiva; 11 – tratamento de nebulização coletiva; 12 – tratamento de nebulização individual (imagens pessoais, com autorização dos intervenientes, propositadamente não identificáveis).



## 2.4. Caracterização do termalismo europeu e nacional

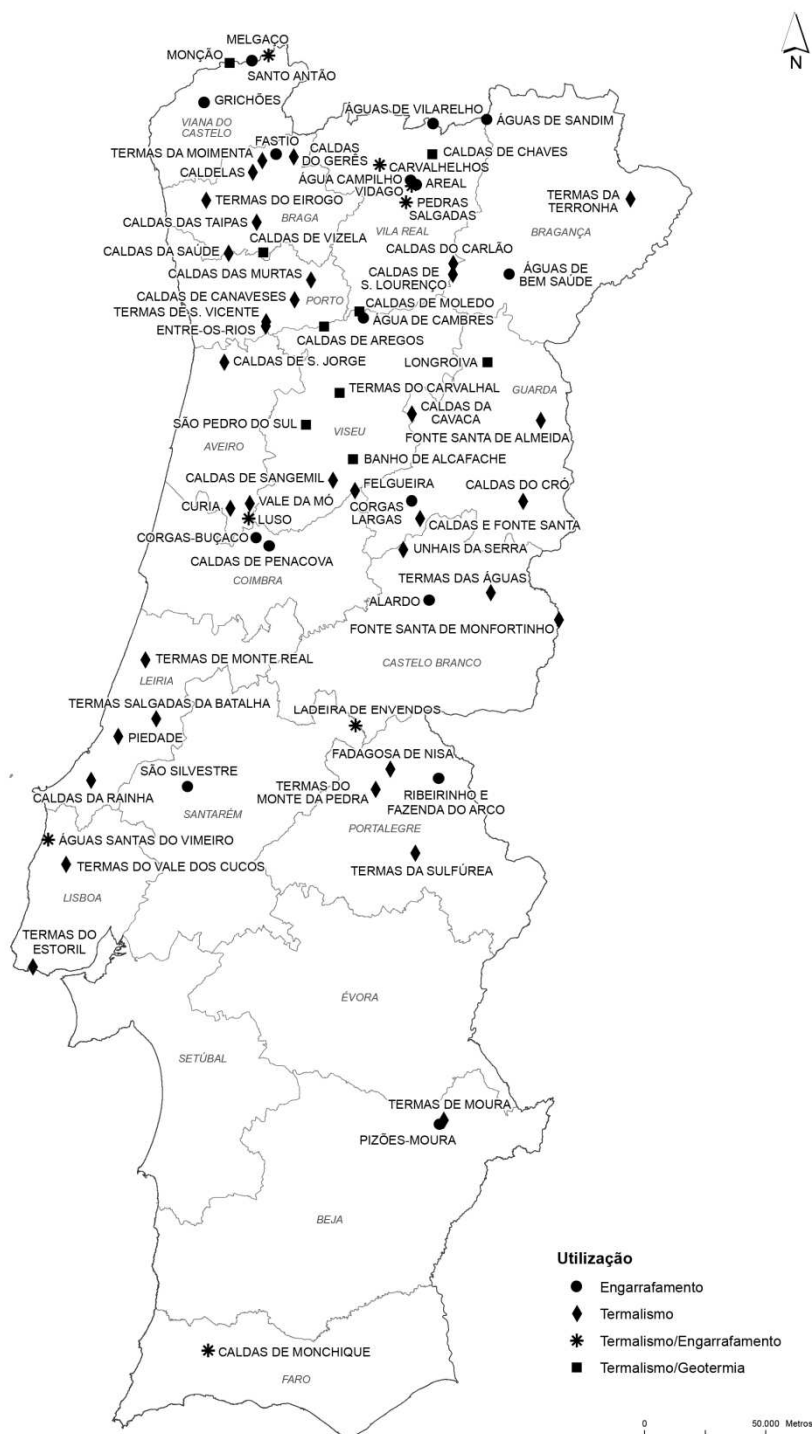
Na Europa, cerca de 676000 pessoas frequentaram termas para tratamentos de cura ou bem-estar em 2011. Contudo, este valor fica muito aquém do valor relativo a 2010, que foi mais do dobro, em que foram cerca de 1572000 as pessoas a frequentarem termas na Europa (<http://www.dgeg.pt>). Este decréscimo abrupto, para menos de metade, do número de utentes termais europeus de 2010 para 2011 ficou a dever-se à forte crise económica que o nosso continente está a atravessar, conforme é referido pela Associação das Termas de Portugal (comunicação pessoal). Também em Portugal se registou o mesmo fenómeno, tendo o número de utentes termais portugueses diminuído dos cerca de 70000 utentes/ano, em 2010, para quase 50000 utentes/ano, em 2011 (figura 6) (<http://www.dgeg.pt>), sendo que, em relação a 2001, altura em que, em Portugal, cerca de 100000 pessoas procuravam as termas, esta diminuição é ainda mais significativa. Importa referir que este número representa cerca de 6% da população portuguesa e, em termos económicos, esta atividade representou, em 2011, um volume de negócios global de 13738000 €, correspondente a 0,01% do produto interno bruto do país nesse ano (<http://www.dgeg.pt>), não englobando o volume de negócios do turismo associado ao termalismo.



**Figura 6** – Evolução da frequência termal no decénio 2002 a 2011 (<http://www.dgeg.pt>).

Portugal é um país rico em água e é claramente um país termal, tendo cerca de 45 estâncias termais, algumas com a dupla valência de engarrafamento de água ou de geotermia, para aproveitamento energético do calor da água mineral natural ou das estruturas geológicas onde estas se inserem. As estâncias termais apresentam-se heterogeneamente distribuídas pelo nosso país, situando-se a maioria na região norte-interior (figura 7) (<http://www.dgeg.pt>). A procura das termas é também bastante heterogénea, sendo as Termas de São Pedro do Sul as mais procuradas, com cerca de 16500 utentes/ano, seguidas das Termas de Chaves, com 4100 utentes/ano. As Caldas de São Jorge, Termas do Gerês, da Felgueira e de

Caldelas têm um número de utentes anuais acima dos 2500 e todas as restantes termas têm uma procura inferior a 2500 utentes/ano (<http://www.dgeg.pt>).



**Figura 7** – Distribuição geográfica e classificação das águas minerais naturais em Portugal quanto à sua utilização económica (<http://www.dgeg.pt>).



A caracterização dos utentes termais quanto ao sexo, idade e tratamentos termais que realizam é apresentada nas figuras 8, 9 e 10, respetivamente. Esta informação, relativa a 2006, foi disponibilizada pela Associação das Termas de Portugal, não tendo esta associação dados mais atualizados (comunicação pessoal). Da sua análise, é possível concluir que, em 2006, o perfil mais habitual do termalista português era ser do sexo feminino, ter entre 65 e 74 anos e realizar sobretudo tratamentos do foro musculoesquelético, seguidos de tratamentos do foro respiratório e otorrinolaringológico.

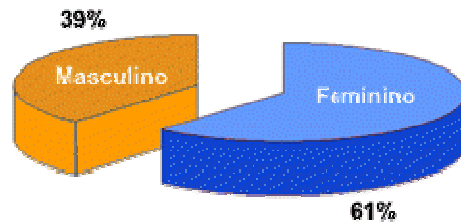


Figura 8 – Distribuição dos utentes termais por sexo, em 2006 (Associação das Termas de Portugal).

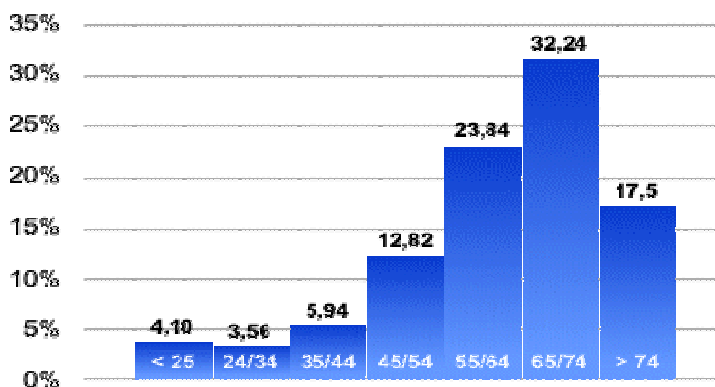


Figura 9 – Distribuição dos utentes termais por faixa etária, em 2006 (Associação das Termas de Portugal).

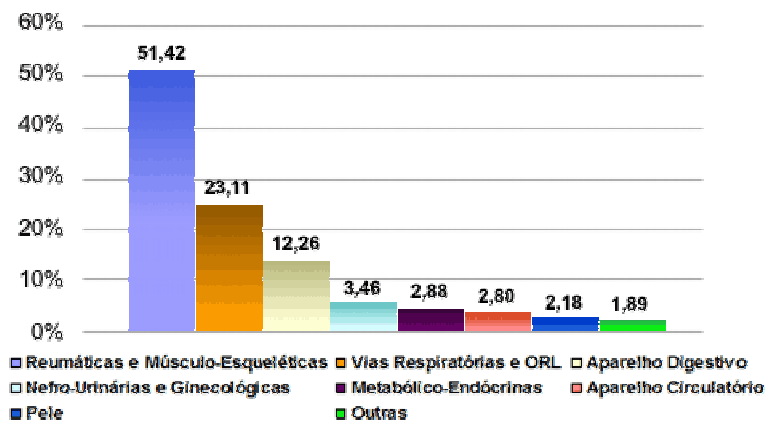


Figura 10 – Distribuição percentual da procura do termalismo em função das patologias a tratar, em 2006. ORL – otorrinolaringologia (Associação das Termas de Portugal).

## 2.5. Normas europeias e legislação portuguesa associada ao termalismo

Algumas regulamentações europeias versam sobre a água mineral natural e as ações físico-químicas que sobre ela se podem fazer, a fim de garantir a sua potabilidade, sendo a mais recente a Diretiva 2009/54/CE do Parlamento e do Conselho Europeu, de 18 de junho de 2009. No entanto, quanto ao setor do termalismo, não há normas europeias que o regulamentem, deixando aos países membros da União Europeia a competência de autonomamente legislar, ou não, sobre esse aspeto. A legislação portuguesa atual sobre água mineral natural e o setor do termalismo é de 1990, 2000 e 2004, tratando, respetivamente, dos aspetos ligados à regulamentação dos processos de prospeção e exploração do recurso hidromineral que é a água mineral natural (DL n.º 86/90 e DL n.º 90/90, ambos de 16 de março), as condições para que a água mineral natural utilizada em estabelecimentos termais seja considerada bacteriologicamente própria (Portaria n.º 1220/2000, de 29 de dezembro) e as regras para o licenciamento, organização, exploração económica e fiscalização dos estabelecimentos termais (DL n.º 142/2004). É suportada nestes documentos normativos e legais que se apresenta abaixo a súmula dos principais aspetos associados ao setor do termalismo.

A água mineral natural tem apenas duas finalidades económicas possíveis: o engarrafamento, necessitando esta água de cumprir todas as regras das águas para consumo humano, mas mantendo algumas exceções; ou o termalismo, para a prática de tratamentos de saúde ou de bem-estar. Independentemente da sua finalidade, a água mineral natural não pode ser sujeita a alterações da sua composição química (salvo algumas exceções para a indústria do engarrafamento) ou a quaisquer processos de desinfeção que alterem o seu microbismo natural. Também, para o setor do termalismo, a água mineral natural, além de ter que ser oferecida “tal e qual” ao utente (ou seja, tem que se garantir que não sofre alterações significativas da sua composição química desde que é extraída até à sua utilização), é utilizada “uma única vez”, à exceção das piscinas termais, não podendo assim haver qualquer reaproveitamento, para tratamentos termais, da água utilizada.

Por definição legal (DL n.º 142/2004), as termas são os “locais onde emergem uma ou mais águas minerais naturais adequadas à prática do termalismo”, o termalismo é “o uso da água mineral natural e outros meios complementares para fins de prevenção, terapêutica, reabilitação ou bem-estar”, o balneário ou estabelecimento termal “a unidade prestadora de cuidados de saúde na qual se realiza o aproveitamento das propriedades terapêuticas de uma água mineral natural”, o termalista “o utilizador dos meios e serviços disponíveis no estabelecimento termal” e o tratamento termal “o conjunto de ações terapêuticas indicadas e praticadas a um termalista, sempre sujeito à compatibilidade com as indicações terapêuticas que foram atribuídas ou reconhecidas à água mineral natural utilizada para esse efeito”. Ao termalismo estão assim intrinsecamente associados os conceitos de unidade prestadora de cuidados de saúde, de água mineral natural e das suas indicações terapêuticas.



Como unidade prestadora de cuidados de saúde, a entidade gestora do balneário termal deve cumprir todos os requisitos associados a estas unidades, incluindo a constituição de uma direção clínica. Esta é responsável pela qualidade dos cuidados de saúde prestados, pelo corpo clínico, constituído por médicos hidrologistas, pela permanência de pelo menos um médico hidrologista durante todo o período de funcionamento do balneário, pela avaliação e definição das contraindicações da água utilizada no estabelecimento termal e pela higiene das instalações e equipamentos terapêuticos, entre outras funções intrínsecas às funções de direção clínica de uma unidade prestadora de cuidados de saúde.

As indicações terapêuticas associadas a cada água mineral natural constam da lista anexa ao despacho conjunto publicado no Diário da República II série, de 23 de maio de 1989, com as alterações produzidas em diversos despachos posteriores, associados aos vários estabelecimentos termais e atualizações das suas indicações terapêuticas. Conforme quadro resumo disponível no sítio da internet da Direção Geral da Saúde (DGS) (<http://www.dgs.pt>), entidade responsável pelos estabelecimentos prestadores de cuidados de saúde, os estabelecimentos termais portugueses apresentam-se com indicações terapêuticas nas áreas das doenças metabólicas-endócrinas, sangue, sistema nervoso, aparelho circulatório, aparelho respiratório, aparelho digestivo, aparelho nefro-urinário, pele, reumatológicas e músculo-esqueléticas e ginecológicas.

A água mineral natural utilizada no termalismo é objeto de legislação própria. No DL n.º 90/90, de 16 de março, verifica-se que a água mineral natural é de domínio público e nele pode também ler-se como definição que é toda a água “considerada bacteriologicamente própria, de circulação profunda, com particularidades físico-químicas estáveis na origem dentro das gamas de flutuações naturais, de que resultam propriedades terapêuticas ou simplesmente efeitos favoráveis à saúde”. O DL n.º 86/90, de 16 de março, contém a legislação própria associada à água mineral natural, no que concerne aos “princípios orientadores do exercício das atividades referidas, com vista ao seu racional aproveitamento técnico-económico e valorização, de acordo com o conhecimento técnico-científico já hoje adquirido e os interesses da economia nacional”. É neste DL que se verifica a necessidade de constituição de um diretor técnico, responsável por todas as questões técnicas relacionadas com a prospeção e exploração deste recurso mineral, e que responde à Direção Geral de Energia e Geologia (DGE), a entidade estatal responsável pela vigilância de todos os recursos energéticos e geológicos do nosso país. Assim, é a DGE que define e regula os critérios necessários para a correta gestão do recurso hídrico termal, de modo a garantir a manutenção e preservação das suas características microbiológicas e físico-químicas. Da utilização da água mineral natural como elemento interveniente nos cuidados de saúde prestados nos estabelecimentos termais, é a DGS a entidade responsável pela fiscalização da manutenção das características físico-químicas e da potabilidade microbiológica da água mineral natural, conforme definido no DL n.º 142/2004, de 11 de junho. Estas entidades determinam com uma frequência anual, para cada estabelecimento termal, um programa de controlo analítico bacteriológico e físico-químico, com caráter semanal e trimestral,

respetivamente, que deve ser cumprido na íntegra pelos estabelecimentos termais, sob pena de encerramento do Balneário ou perda de direitos de concessão, caso não seja cumprido.

### **2.5.1. Segurança microbiológica nos estabelecimentos termais**

O DL nº 142/2004, de 11 de junho, no seu capítulo IV “Da qualidade e funcionamento”, reporta para a Portaria nº 1220/2000, de 29 de dezembro, quais as condições a que as águas minerais naturais, na captação e no interior dos estabelecimentos termais, devem obedecer para poderem ser consideradas bacteriologicamente próprias.

Segundo esta portaria, para que a água mineral natural seja considerada bacteriologicamente própria na captação e aquando da sua utilização dentro dos estabelecimentos termais, no que concerne a microrganismos patogénicos ou indicadores de contaminação microbiológica, deve apresentar-se “isenta de parasitas e microrganismos patogénicos; *E. coli* e outros coliformes e estreptococos fecais, em 250 ml de amostra analisada; anaeróbios esporolados sulfito-redutores, em 50 ml de amostra analisada e *Pseudomonas aeruginosa*, em 250 ml de amostra analisada”. Na água utilizada dentro do balneário termal, deve ainda considerar-se também a ausência de “*Legionella pneumophila*, em 1l de amostra analisada” e “o valor de referência para o número total de *Legionella* não *L. pneumophila* é de 100 unidades formadoras de colónias (UFC)/litro”.

Esta portaria determina ainda que sempre que estas condições não se verificarem, é da responsabilidade do explorador do estabelecimento termal “demonstrar a tomada de medidas corretivas e comprovar a sua eficácia”. Contudo, nada refere acerca da qualidade e segurança microbiológica nos equipamentos termais, onde o termalista entra em contacto direto com a água, sob a forma líquida ou aerossolizada, e em contacto direto também com os próprios equipamentos. Sobre esta questão, apenas o DL nº 142/2004, de 11 de junho, reporta a obrigação do titular do estabelecimento termal em “assegurar as condições necessárias à preservação da qualidade da água, (...), bem como nos pontos de utilização da água”, e da direção clínica em “velar pela higiene das instalações e equipamentos clínicos”. O seu artigo 26º reporta a necessidade de se criarem e implementarem “manuais de boas práticas de higiene destinados à utilização pelas entidades do setor como observância dos requisitos de higiene e qualidade dos cuidados prestados”.

Percebe-se assim que as autoridades europeias e nacionais não estão ainda suficientemente sensibilizadas para o problema da qualidade microbiológica aquando da efetiva realização dos tratamentos, colocando a ênfase apenas na qualidade microbiológica da água mineral natural. Ainda que o Governo Português tenha já referido no DL que regulamenta a atividade termal, a importância da higiene dos equipamentos, nada refere quanto à qualidade microbiológica dos mesmos. Os conhecimentos técnico-





científicos atuais permitem-nos saber que alguns microrganismos apresentam uma elevada capacidade de se instalarem em sistemas de adução e distribuição de águas, razão pela qual as normas europeias e a legislação nacional relativas ao abastecimento de águas para consumo humano não só permite, mas obriga à sua desinfeção e à presença de um residual de desinfetante por forma a minimizar esses riscos (Diretiva nº 98/83/CE do Parlamento e Conselho Europeu; DL nº 306/2007, de 27 de agosto), bem como a legislação relativa a águas de utilização balnear (piscinas) (Decreto Regulamentar nº 5/97, de 31 de março). A atual legislação termal contempla esse aspeto, quando obriga o gestor do estabelecimento termal a assegurar a qualidade microbiológica da água mineral natural aquando da sua utilização, concretizada no programa de controlo analítico anual determinado pela DGS. Nele, pode ler-se que, durante o funcionamento do estabelecimento termal, “a realização das análises microbiológicas à água mineral natural deve ser mantida com uma periodicidade semanal” e que “os pontos de colheita devem ser escolhidos de uma forma aleatória (um ponto de amostragem por cada tipo de equipamento e por setor)”. Contudo, os próprios equipamentos termais podem ser colonizados por diversos microrganismos, através da formação de biofilmes, estado frequente dos microrganismos aquáticos (Ma *et al.*, 2009), podendo alguns deles ser patogénicos, incluindo *Pseudomonas aeruginosa*, bactéria ubiquista que habita sobretudo zonas húmidas, com uma elevada capacidade de formar biofilmes e provida de uma diversidade de características morfológicas e fisiológicas, designadas por fatores de virulência em contexto clínico. O objetivo primordial de preservar as propriedades terapêuticas, ou efeitos benéficos para a saúde, da água mineral natural é assegurado pela proibição de alterar a sua composição química ou o microbismo natural (Portaria nº 1220/2000; DL nº 142/2004), contudo, essa medida poderá por em causa a segurança microbiológica dos utentes termais, se tal implicar a presença de microrganismos patogénicos nos equipamentos termais, ainda não sujeitos a vigilância sanitária por parte das autoridades de saúde.

### 3. Objetivos do presente trabalho

Sendo *P. aeruginosa* um dos patogênicos mais prevalentes em ambientes hospitalares, sobretudo nos casos de infecções respiratórias e de pele, e uma bactéria ubiquista em termos ecológicos, habitando sobretudo ambientes húmidos; sendo a atividade termal uma atividade prestadora de cuidados de saúde onde os termalistas entram em contato direto com os equipamentos termais, através dos quais a água mineral natural, não desinfetada, exerce o seu efeito terapêutico sobre afeções músculo-esqueléticas ou respiratórias; sendo nulo o conhecimento sobre a segurança microbiológica desses equipamentos, é nosso objetivo:

- a) Estudar a prevalência de *P. aeruginosa* nos circuitos e distribuição da água mineral natural termal e nos equipamentos terapêuticos de um balneário termal português, de modo a avaliar se os atuais programas de controlo analítico oficiais controlam numa forma adequada a presença deste patógeno oportunista no ambiente termal;
- b) Estudar o potencial de virulência desses isolados, comparando-os a isolados clínicos obtidos de infecções respiratórias, a fim de perceber a possível capacidade virulenta e infetiva dos isolados termais;
- c) Estudar a resistência a antibióticos desses isolados, a fim de perceber quais os potenciais riscos associados a uma eventual antibioterapia em caso de infecções respiratórias causadas por *P. aeruginosa* adquiridas aquando da prática termal;
- d) Estudar a capacidade de disseminação dos fatores de virulência e resistência nesses isolados, a fim de perceber a potencialidade de transmitirem a outras bactérias estas características participantes dos processos infecciosos.

Paralelamente a este estudo principal, é ainda nosso objetivo estudar a associação entre a presença de fatores de virulência e a resistência aos antibióticos nos isolados clínicos utilizados no estudo comparativo, uma vez que a literatura recente refere que a relação entre virulência e resistência em isolados clínicos poderá ser uma nova abordagem para o problema das resistências a antibióticos e a ausência de novos compostos antibióticos para o tratamento de infecções causadas por organismos multi, extensa ou pan-resistentes.



## **CAPÍTULO II**

---



## **MATERIAIS E MÉTODOS**



## 0. Breve caracterização técnica do estabelecimento termal

O estabelecimento termal em estudo localiza-se na região Centro do país e oferece tratamentos termais direcionados para patologias do foro músculo-esquelético, reumatológico, respiratório e otorrinolaringológico, para além da hidropínia (ingestão de água), como complemento ao tratamento termal. Estes tratamentos podem ser realizados em diversos tipos de equipamentos, conforme descrito na tabela 4. A prática da hidropínia não está associada a nenhum equipamento específico, razão pela qual não foi incluída na tabela.

**Tabela 4** – Tipos de equipamentos termais existentes no estabelecimento termal amostrado, identificados segundo a patologia-alvo e o circuito de distribuição de água mineral natural que os abastece, bem como indicação da principal zona de contacto da água mineral natural com o corpo do utente e a duração média de aplicação de cada tratamento.

Músculo-esqueléticas e reumatológicas	Zona de contacto	Duração (min)	Respiratórias e otorrinolaringológicas	Zona de contacto	Duração (min)
<b>Circuito Hidromassagem</b>			<b>Circuito Duche Faringeo</b>		
Hidromassagem	Pele	12-15	Duche faríngeo	Faringe	2-5
Pressoterapia	Pele	12-15	Drenagem de Pröetz	Seios nasais	2-5
<b>Circuito Duche Vichy</b>			<b>Circuito Irrigação Nasal/Aerossol</b>		
Duche Vichy e Aix	Pele *	8-12	Irrigação nasal	Seios nasais	5-8
Duche jato e cachão	Pele *	5-8	Pulverização faríngea	Faringe	1-2
<b>Circuito Vapor</b>			<b>Circuito Nebulização Individual</b>		
Estufa vapor integral	Pele *	10-15	Aerossol sónico	Pulmões	10-15
Estufa vapor coluna	Pele	10-15	Aerossol manossónico	Pulmões	10-15
Estufa vapor pés mãos	Pele	10-15	<b>Circuito Nebulização Individual</b>		
<b>Circuito Piscina</b>			<b>Circuito Hidromassagem</b>		
Piscina terapêutica	Pele *	15-30	Nebulizador individual	Pulmões	10-15
			Nebulização coletiva	Pulmões	5-20

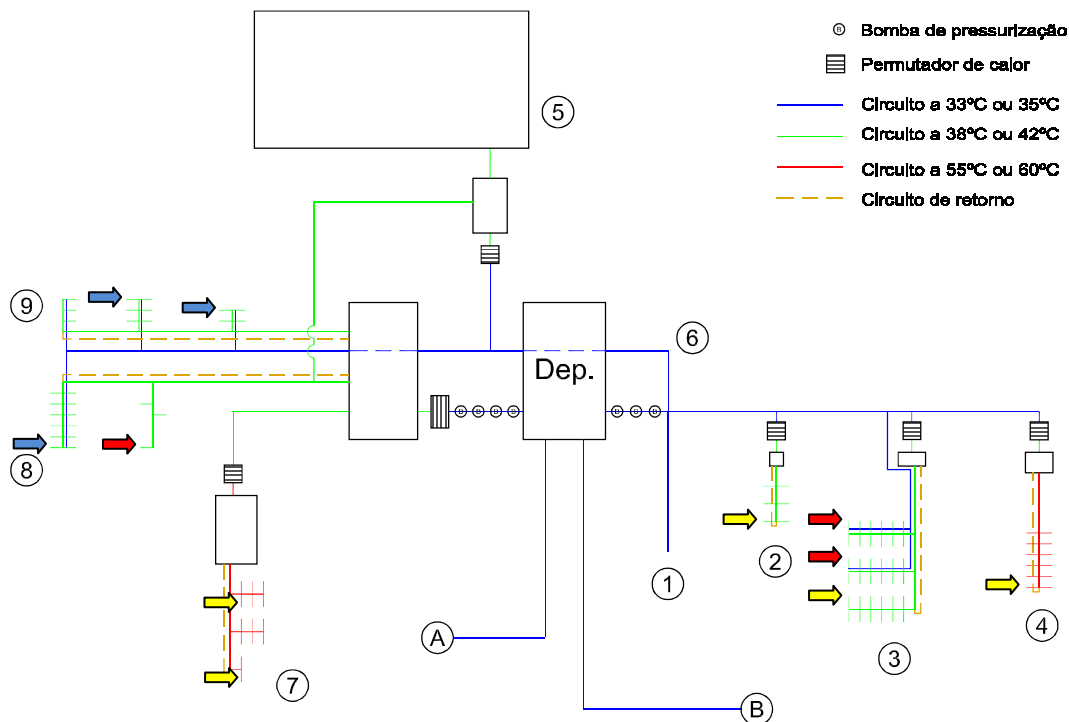
A indicação da zona de contacto da água mineral natural com o corpo do utente e do tempo médio de cada tratamento não tem qualquer validade clínica, baseando-se apenas na observação empírica.

\* - nos equipamentos assinalados, verifica-se a libertação de doses significativas de aerossóis de água mineral natural durante o funcionamento, havendo assim o contacto da água mineral natural, aerossolizada, com os pulmões dos utentes durante o tratamento, ainda que estes não sejam a zona-alvo de tratamento.

A água mineral natural chega aos equipamentos através de um sistema de adução e distribuição, composto por duas captações seladas e um depósito principal, que recebe a água mineral natural extraída pelas captações e a distribui aos 7 circuitos de distribuição, aquecidos a diferentes temperaturas, entre os 35°C e os 60°C, exceto o circuito de abastecimento da piscina terapêutica que não é aquecido. Este equipamento é abastecido por um circuito secundário aquecido a 38°C, utilizado apenas para compensar as perdas de calor no tanque da piscina nos períodos mais frios do ano. O depósito principal abastece também, através de um circuito próprio, alguns equipamentos termais com água mineral natural à sua temperatura natural (ou seja, não aquecida artificialmente), para permitir a regulação da temperatura de tratamento aquando da sua aplicação. Acresce a este sistema, um circuito de água mineral natural exclusivo para a hidropínia, perfazendo assim um total de 9 circuitos de distribuição da água mineral natural (figura 11).



Os equipamentos termais são constituídos sobretudo por materiais plásticos, podendo alguns apresentar algumas peças metálicas de aço inoxidável, material que constitui os tubos e bombas de adução das duas captações, bem como todos os depósitos e circuitos de distribuição da água mineral natural. As captações 1 e 2 distam entre si em cerca de 50 metros, e encontram-se distanciadas a 20 e 50 metros do depósito principal, de água fria, respetivamente. Deste depósito a água é pressurizada e aquecida a diferentes temperaturas em permutadores de placa, antes de ser distribuída pelos diversos circuitos, que se prolongam em cerca de 20 a 40 metros cada. O circuito que deriva diretamente do depósito principal de água fria apresenta uma extensão de cerca de 70 metros e o circuito para hidropónia uma extensão de cerca de 10 metros. O esquema da figura 11 representa o sistema de adução e distribuição da água mineral natural do estabelecimento termal em estudo, estando representado em escala quanto à dimensão da piscina e depósitos associados a cada circuito, mas não quanto ao comprimento dos circuitos.



**Figura 11** – Representação esquemática do sistema de adução e distribuição da água mineral natural do estabelecimento termal. A – captação 1 (35°C); B – captação 2 (35°C); 1 – circuito de hidropónia (33°C); 2 – circuito de duche faríngeo (38°C); 3 – circuito de irrigação nasal/aerossol (42°C); 4 – circuito de nebulização individual (55°C); 5 – piscina terapêutica – 2 sub-circuitos (33°C ou 35°C); 6 – circuito de água fria (33°C); 7 – circuito de vapor (60°C); 8 – circuito de hidromassagem (38°C); 9 – circuito de duche de Vichy (38°C); Dep. – depósito principal de água fria (33°C). As colheitas de amostras de água foram feitas através de torneiras de amostragem instaladas à saída das captações, depósito principal (Dep.) e circuitos 1, 5 e 6, e no final dos terminais de retorno dos circuitos de distribuição 2, 3, 4, 7, 8 e 9. As setas amarelas e azuis indicam os equipamentos termais amostrados a partir dos quais não se observaram ou não se preservaram isolados de *P. aeruginosa*. As setas vermelhas indicam os equipamentos a partir dos quais foram preservados os isolados de biofilme para este estudo.

## I. Origem, identificação, isolamento e preservação dos isolados

Os isolados ambientais de *Pseudomonas aeruginosa* utilizados neste estudo foram obtidos no estabelecimento termal anteriormente descrito, dividindo-se em planctônicos, quando obtidos de amostras de água, ou em biofilmes, quando obtidos de amostras da superfície dos componentes hidráulicos internos dos equipamentos termais.

As amostras planctônicas foram recolhidas aseticamente, com uma frequência semanal, em diversos pontos de colheita do sistema de adução e distribuição da água mineral natural das termas (figura 11), entre 2006 e 2009, num total de 2200 amostras. Os isolados foram obtidos de alíquotas de 250 ml de AMN, filtradas por membranas de 0,2  $\mu\text{m}$  de poro e incubadas a 37°C no meio de cultura sólido Cetrimide (Difco, EUA) durante 48 horas, para pesquisa de *P. aeruginosa*, ou por membranas de 0,45  $\mu\text{m}$  de poro, incubadas nos meios de cultura sólidos m-Endo, m-FC e m-Enterococcus-Agar (Difco, EUA) por 24 horas a 37°C, para a pesquisa de enterobactérias (SMEWW, 1998). Todas as colónias verdes ou azuladas no meio de cultura sólido Cetrimide, ou aquelas que apresentavam um odor de trimetilamina nos outros meios de cultura, foram sujeitas a um teste confirmatório após purificação de uma única colónia, no meio de cultura sólido Tripticase Soja (TSA) (Scharlau, Espanha), a 37°C, 24 horas. O teste confirmatório foi executado riscando o meio de cultura sólido Skim-Milk com a cultura pura, e incubando-o de seguida a 37°C durante 24 a 48 horas (SMEWW, 1998). Os isolados com uma zona translúcida em torno do crescimento e que se apresentaram verde-fluorescentes sob luz ultravioleta de 365 nm foram considerados como *P. aeruginosa*. Todos os isolados selecionados por este método foram de seguida identificados pelo sistema API 20 NE (BioMérieux, França), usando um nível de confiança de 95% como um resultado válido.

As amostras de biofilme preservadas para este estudo foram recolhidas aseticamente da superfície das peças internas de dois equipamentos de aerossol e de um equipamento de nebulização coletiva (6 amostras de cada equipamento do aerossol e 11 amostras do nebulizador coletivo), utilizando uma zaragatoa estéril. As amostras do nebulizador coletivo foram obtidas em setembro de 2008 e as amostras dos equipamentos de aerossol em janeiro e abril de 2009. Logo após a colheita, as amostras foram inoculadas no meio de cultura sólido Cetrimide (Difco, EUA) e incubadas a 37°C durante 24 a 48 horas. De todas as colónias verdes crescidas em cada placa, apenas um máximo de 4 colónias foi selecionado e o teste confirmatório em Skim Milk executado, após purificação em TSA. As colónias positivas foram identificadas pelo sistema API 20 NE, cumprindo os mesmos requisitos, e foram incluídas neste estudo. Outras colheitas idênticas foram realizadas num exemplar de cada tipo de equipamento termal presente no estabelecimento termal (figura 10), mas as colónias presuntamente identificadas como *P. aeruginosa* não foram preservadas nem contabilizadas, pelo que não puderam ser incluídas neste estudo.





Os isolados selecionados, identificados como *P. aeruginosa*, foram armazenados a -80°C em meio de cultura líquido Trypticase de soja (TS) (Scharlau, Espanha), suplementado com glicerol (Merck, Alemanha) a 15%, segundo o método de Feltman *et al.* (1978).

Isolados clínicos, derivados sobretudo de infeções respiratórias, foram utilizados neste estudo para fins comparativos. Estes isolados foram selecionados a partir da coleção de cultura *P. aeruginosa* do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra. Esta coleção é constituída sobretudo por isolados clínicos cedidos por um hospital central da região centro do país. Todos os isolados utilizados neste trabalho foram selecionados de entre os isolados relativos ao ano de 2009.

## 2. Seleção de amostras e estudos de diversidade genética

Antes de se iniciar a pesquisa de quaisquer características das populações, foi feita a seleção de amostras representativas de cada uma delas e estudou-se a sua diversidade genética.

### 2.1. Seleção das amostras para estudo

Da população de *P. aeruginosa* obtida no estabelecimento termal ao longo de 4 anos, foi feita uma seleção aleatória com alocação proporcional ao tipo de isolados, retendo 33% da população original, num total de 77 isolados. Esta amostra foi a utilizada para os estudos do presente trabalho. Previamente a esta amostragem, foram selecionados 40 isolados representativos da diversidade de locais e datas de colheita da população termal, tendo sido utilizados apenas para a genotipagem inicial exploratória efetuada a esta população, descrita de seguida.

Da população de *P. aeruginosa* de origem clínica, foi feita uma seleção aleatória com alocação proporcional ao tipo de produtos biológicos, retendo 16% da população inicial, num total de 76 isolados, associados a infeções respiratórias, urinárias e outras (isolados derivados de exsudados cuja origem não foi definida pelo hospital fornecedor dos isolados).

### 2.2. Genotipagem das amostras

#### 2.2.1. Amplificação aleatória de ADN polimórfico (RAPD)

Numa abordagem inicial à diversidade genética da população termal, fez-se uma genotipagem por amplificação aleatória de ADN polimórfico (“random amplified polymorphic DNA”) (RAPD) de 40 isolados selecionados em função dos locais e datas de colheita de modo a representar a maior diversidade possível da população termal, segundo o procedimento descrito em Cardoso *et al.* (2008). O ADN foi extraído usando o sistema Aquapure Genomic DNA kit (BioRad, EUA), seguindo as instruções do fabricante. A reação de RAPD foi feita utilizando o sistema Ready-To-Go RAPD Analysis Beads kit (GE Healthcare Biosciences, EUA), ao qual se adicionou o ADN de cada amostra e o *primer* 272 (10  $\mu$ M), conforme instruções do fabricante. A reação decorreu em 44 ciclos consecutivos de desnaturação a 95°C durante 1 minuto,



“annealing” a 36°C durante 1 minuto e extensão a 72°C durante 1 minuto (a primeira desnaturação foi feita a 95°C e a extensão final a 72°C, ambas durante 5 minutos) num termociclador T1 (Biometra, EUA).

### **2.2.1.1. Separação eletroforética dos produtos de RAPD**

Após a reação, os produtos de RAPD foram sujeitos a um processo de separação eletroforético, em gel de Agarose (Conda, Espanha) a 1% em TBE 0,5x contendo 20 µg/ml do corante Sybr Safe (Invitrogen, EUA), durante 1 hora a 80 V, em tampão TBE 0,5x, num sistema horizontal com fonte de alimentação GE Healthcare Biosciences, EUA. A colocação das amostras de RAPD nos poços do gel foi feita segundo esquema identificativo previamente estabelecido. No primeiro poço de cada gel foi colocado o padrão de ADN Gene Ruler 1 kb (Fermentas, EUA), para permitir a determinação da dimensão estimada dos produtos de RAPD.

### **2.2.1.2. Análise e interpretação dos perfis eletroforéticos de RAPD**

Concluída a eletroforese, o gel foi fotografado sob luz ultravioleta, utilizando um transiluminador (Vilbert Lourmat, França), acoplado a uma unidade de captação digital de imagens (Uvitec, Reino Unido).

As imagens foram observadas e interpretadas manualmente por 2 observadores diferentes, e a cada perfil de RAPD determinado atribuiu-se uma letra. Perfis que diferiam em uma ou mais bandas de maior intensidade luminosa ou em 3 ou mais bandas de menor intensidade luminosa foram considerados diferentes, caso contrário foram considerados idênticos (Cardoso *et al.*, 2008).

## **2.2.2. Eletroforese em campo pulsado (PFGE)**

Foi feita a genotipagem das duas amostras selecionadas (termal e clínica) por eletroforese de campo pulsado (“pulsed-field gel electrophoresis”) (PFGE), de acordo com o procedimento descrito por Maslow *et al.* (1993), com algumas modificações. O PFGE é uma técnica molecular que permite observar a diversidade genética de uma população e examinar a possível disseminação de um clone na população (Feltman *et al.*, 2001). Assim, a relação genética dos isolados de cada amostra foi avaliada a fim de eliminar genoclonos, para garantir que não ocorriam desvios na análise dos resultados do perfil de virulência, determinados posteriormente, das populações amostradas devido à sobre-representação de alguns clones nas amostras.

### 2.2.2.1. Preparação dos discos

Após crescimento em placa dos isolados a analisar, foi preparado 1 ml de uma suspensão bacteriana fresca de cada um dos isolados, em tampão de suspensão [Tris-HCl (Merck, Alemanha) 10 mM, NaCl (Panreac, Espanha) 1M, pH=7,6], com uma densidade ótica de 1,5 a 1,6, medida no espectrofotômetro UV-1800 (Shimadzu, Japão). O gel de agarose SeaKem Gold (Lonza, Switzerland), necessário para a preparação dos discos, foi preparado a 2% em tampão de suspensão. Depois de arrefecido a cerca de 40°C, 1 ml desse gel foi misturado com a suspensão bacteriana. Esta mistura foi homogeneizada e rapidamente aplicada no molde para os discos, permanecendo aí até à sua solidificação. Findo este processo, cada disco foi transferido para um tubo de plástico rolhado, de 15 ml (Bioplastics, Holanda), contendo 1 ml de tampão de lise [Tris-HCl (Merck, Alemanha) 6 mM, NaCl (Panreac, Alemanha) 1 M, EDTA (Merck, Alemanha) 100 mM, pH=7,6, suplementado com RNase (Sigma, EUA) 2 mg/ml, lisozima (VWR, EUA) 1% e dodecil-sulfato de sódio (“sodium dodecyl sulfate”) (SDS) (Sigma, EUA) 0,5%] e foram colocados a incubar durante 3 horas a 50°C. Decorrido esse tempo, rejeitou-se este tampão e adicionou-se 1 ml de uma solução de tampão ES [EDTA (Merck, Alemanha) 500 mM, SDS (Sigma, EUA) 1%, pH=8] suplementado com proteinase K (Sigma, EUA) a 1%, confirmando a completa imersão dos discos nesta. De seguida, os tubos foram colocados em banho-maria a 55°C durante a noite (cerca de 18 horas). No dia seguinte, rejeitou-se essa solução e iniciaram-se as lavagens dos discos, pela adição de 10 ml de tampão TE [Tris-HCl (Merck, Alemanha) 10 mM, EDTA (Merck, Alemanha) 10 mM, pH=7,6] a 4°C e agitação durante 30 minutos, repetindo-se este procedimento 4 vezes.

Após as 4 lavagens, os discos foram transferidos para tubos eppendorf previamente identificados, contendo 1 ml de tampão TE, e colocados a 4°C até utilização.

### 2.2.2.2. Digestão enzimática do ADN

Antes da digestão com a enzima de restrição, os discos foram incubados com 0,1 ml do tampão de restrição específico da enzima, durante 10 minutos, a 37°C. Retirou-se o tampão de restrição e adicionou-se a mistura de restrição, preparada segundo as instruções do fabricante, contendo a enzima de restrição *SpeI* (Takara, Japão), a uma concentração final de 20 unidades de enzima por cada reação de restrição, e incubou-se em banho-maria a 37°C durante 16 horas. Findo esse tempo, parou-se a reação de restrição, descartando a mistura de restrição e adicionando aos discos 1 ml de tampão TE.

Os discos digeridos permaneceram nesse tampão até serem incorporados no gel para separação eletroforética, o que aconteceu o mais rapidamente possível após a digestão.



### **2.2.2.3. Preparação do gel para separação eletroforética dos fragmentos de ADN**

O gel para a eletroforese em campo pulsado foi preparado com a agarose SeaKem LE (Cambrex, EUA), a 1,5%. Antes de verter o gel para o molde, adicionou-se 4 µl de Sybr Safe (Invitrogen, EUA), para corar o ADN. Depois de solidificado, foi retirado o pente que molda os poços do gel e em cada um desses poços foi aplicado um disco, segundo o esquema previamente desenhado de localização dos discos no gel. No primeiro poço de cada gel foi colocado o padrão de ADN Midrange PFG Marker II (New England BioLabs, USA), para permitir a calibração e normalização dos géis aquando da sua análise. Cuidados na aplicação dos discos foram tidos, para evitar a presença de bolhas de ar no interior dos poços. Após aplicação de todos os discos, os poços foram lacrados com a agarose de corrida não solidificada, concluindo-se assim a preparação do gel para a eletroforese.

### **2.2.2.4. Separação dos fragmentos digeridos de ADN por eletroforese em campo pulsado**

O aparelho de PFGE CHEF-DR III system (BioRad, EUA) foi preparado para a eletroforese, enchendo-se a tina de eletroforese com tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 0,5x [composição TBE 10x: Tris-Base (Merck, Alemanha) 0,089M, ácido bórico (Acros Organics, EUA) 0,089M, solução EDTA (Merck, Alemanha) (0,5M pH=8) 0,02M] suplementado com tiourea (Merck, Alemanha) a uma concentração de 50 µM, a fim de aumentar a definição das bandas eletroforéticas (Römling e Tümmler, 2000), e deixado a arrefecer a 14°C durante o tempo de preparação do gel.

Finda a preparação do gel de corrida, este foi colocado no centro da tina de eletroforese e a eletroforese em campo pulsado iniciou-se, decorrendo durante 18 horas, a 14°C, com uma voltagem constante de 6 V/cm, a um ângulo de 120° e impulso inicial de 1 segundo e final de 25 segundos.

### **2.2.2.5. Análise e interpretação dos perfis eletroforéticos de PFGE**

Concluída a eletroforese, o gel foi fotografado sob luz ultravioleta, utilizando um transiluminador (Vilbert Lourmat, França), acoplado a uma unidade de captação digital de imagens (Uvitec, Reino Unido). As imagens resultantes foram analisadas usando o *software* Quantity One, versão 4.6.6 (BioRad, EUA). Os perfis foram analisados e comparados automaticamente, utilizando o método “unweighted pair group method with arithmetic mean” (UPGMA), resultando daí um dendrograma de relação dos perfis eletroforéticos obtidos no PFGE. A normalização do dendrograma e definição do nível de “cut-off” para determinação da similaridade entre os perfis de PFGE (equivalente à clonalidade dos isolados) foi feita considerando o nível de similaridade obtido no dendrograma para o grupo dos padrões de ADN de cada gel analisado.

### 3. Pesquisa de fatores de virulência

Diversos fatores de virulência foram estudados nos isolados termais e clínicos de *P. aeruginosa* e interpretados por ferramentas estatísticas de análise e inferência de resultados, em função dos objetivos adequados a cada caso.

#### 3.1. Pesquisa fenotípica de fatores de virulência

A caracterização fenotípica dos fatores de virulência presentes em cada um dos isolados selecionados após tipagem por PFGE foi feita recorrendo a diversas técnicas de pesquisa qualitativa e semi-quantitativa, descritas de seguida.

##### 3.1.1. Componentes da superfície da parede celular

###### 3.1.1.1. Mobilidade

A pesquisa de diferentes mobilidades foi realizada segundo Inoue *et al.* (2008). O movimento natatório “swimming” foi pesquisado por inoculação através de picagem suave à superfície do meio de cultura composto por 1% de triptona (Difco, EUA), 0,5% de NaCl (Panreac, Espanha) e 0,3% de agar (Difco, EUA), seguido de incubação a 37°C durante 24 horas. O crescimento irradiado das colónias foi considerado como positivo, e o crescimento regular apenas em torno do ponto de picagem no meio, foi considerado como negativo.

O movimento natatório “swarming” foi avaliado por picagem suave à superfície do meio de cultura contendo 0,8% de Nutrient Broth (Difco, EUA), 0,5% de glicose (Merck, Alemanha) e 0,5% de agar (Difco, EUA), seguido de incubação a 37°C durante 24 horas. O crescimento irradiado das colónias, com formação de “braços” de crescimento foi considerado como positivo, e o crescimento regular apenas em torno do ponto de picagem no meio, foi considerado como negativo.

O movimento “twitching” foi pesquisado por inoculação perfurante até ao fundo da placa contendo meio de cultura composto por 1% de triptona (Difco, EUA), 0,5% de extrato de levedura (Difco, EUA), 0,5% de NaCl (Panreac, Espanha) e 1% de agar (Difco, EUA), seguido de incubação a 37°C durante 24 horas. O crescimento das colónias na interface entre o meio de cultura e o fundo da placa foi considerado como positivo, e a ausência desse crescimento na interface fundo da placa-meio como negativo.



### **3.1.2. Fatores de virulência segregados**

#### **3.1.2.1. Pesquisa de proteases**

##### **3.1.2.1.1. Atividade elastolítica**

A determinação da capacidade de hidrólise da elastina foi feita segundo o método descrito por Smibert e Krieg (1981), utilizando-se o meio Nutrient agar (Difco, EUA) suplementado com elastina (Sigma, EUA) na concentração final de 2 g/l. A inoculação foi feita numa área com cerca de 1 cm<sup>2</sup> e as placas foram incubadas a 37°C durante 1 a 5 dias. A degradação dos grânulos de elastina presente no meio, correspondente a um resultado positivo, foi detetada pela formação de um halo sem grânulos em torno da zona de crescimento. Em situações de difícil leitura dos resultados, ao 5º dia de incubação marcou-se na placa a zona de crescimento, removeu-se o material com uma ansa de plástico e lavou-se o meio de cultura com água, se necessário. A ausência de qualquer grânulo de elastina na zona de crescimento foi considerado um resultado positivo, e a presença de pelo menos um grânulo de elastina nessa zona, um resultado negativo.

##### **3.1.2.1.2. Atividade proteolítica**

A atividade proteolítica dos isolados em estudo foi analisada recorrendo ao método descrito em Finnan *et al.* (2004), com ligeiras modificações. O meio de cultura, contendo 1% de agar (Difco, EUA) e 2% de Skim Milk (Difco, EUA) dissolvido em CaCl<sub>2</sub> (Merck, Alemanha) (3 mM) e Tris-HCl (Merck, Alemanha) (50 mM, pH:7,5), foi riscado com o inóculo em estudo e a placa foi colocada a incubar a 37°C, durante 18 a 24 horas. A leitura de resultados foi feita pela observação da formação de um halo translúcido em torno da zona de crescimento. A presença do halo foi interpretado como um resultado positivo e a ausência desse halo como um resultado negativo.

#### **3.1.2.2. Pesquisa de lipases**

A produção de lipases foi determinada segundo o método descrito em Janda e Bottone (1981). O meio de cultura TSA (Scharlau, Espanha) enriquecido com 1% Tween 80 (Merck, Alemanha) foi inoculado e a placa foi colocada a incubar a 37°C, durante 24 horas. A formação de um halo turvo em torno da zona de crescimento foi considerado um resultado positivo e a sua ausência um resultado negativo.

### 3.1.2.3. Pesquisa de ramnolípidos

A produção de ramnolípidos nos isolados em estudo foi realizada segundo o procedimento descrito em Inoue *et al.* (2008). O meio de cultura utilizado, com pH final de 6,7, tinha a seguinte composição: 0,2 g de brometo de cetiltrimetilamônio (Sigma, EUA), 0,005 g de azul de metileno (Merck, Alemanha) e 15 g de agar (Difco, EUA) dissolvidos num litro de meio mínimo de sais que continha 20 g glicerol (Merck, Alemanha), 0,7 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck, Alemanha), 0,9 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Merck, Alemanha), 2 g  $\text{NaNO}_3$  (Merck, Alemanha), 0,4 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Merck, Alemanha), 0,1 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Merck, Alemanha) e 2 ml da solução de elementos minoritários [2 g/l de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Merck, Alemanha), 1,5 g de  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (Merck, Alemanha) e 0,6 g de  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (Sigma, EUA)]. Os isolados foram inoculados por picagem à superfície do meio e a placa foi colocada a incubar a 37°C, durante 48 horas. A formação de um halo azul-escuro em torno da zona de crescimento foi considerado um resultado positivo e a sua ausência um resultado negativo.

### 3.1.2.4. Pesquisa de hemolisinas

#### 3.1.2.4.1. Degradação de lecitina

A produção de lecitinase foi testada segundo o método descrito em Janda e Bottone (1981), ligeiramente modificado. O meio de cultura TSA (Scharlau, Espanha) enriquecido com 10% Egg Yolk Tellurite Enrichment (Oxoid, EUA) foi inoculado e a placa foi colocada a incubar a 37°C, durante 24 horas. A formação de um precipitado negro em torno da zona de crescimento foi considerado um resultado positivo e a sua ausência um resultado negativo.

#### 3.1.2.4.2. Pesquisa semi-quantitativa de fosfolipase C

A produção de fosfolipase C foi determinada segundo o método descrito em Berka *et al.* (1981). 100  $\mu\text{l}$  de meio mínimo de triptose [120 mM Tris-HCl; 0,1% triptose (Sigma, EUA); 20 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Merck, Alemanha); 1,6 mM  $\text{CaCl}_2$  (Merck, Alemanha); 10 mM KCl (Merck, Alemanha); 50 mM glicose (Merck, Alemanha)] foi distribuído em cada poço de uma microplaca de 96 poços de fundo plano (Bioplastics, Holanda). Cada poço contendo o meio de cultura foi inoculado com um isolado em estudo, segundo o esquema previamente desenhado de localização dos isolados na microplaca. De seguida, a microplaca foi colocada a incubar a 37°C, durante 24 horas. Findo esse período, adicionou-se 50  $\mu\text{l}$  do reagente de *p*-nitrofenilfosforilcolina (NPPC) [250 mM Tris-HCl, pH=7,2 (Merck, Alemanha); 60% glicerol (Merck, Alemanha); 1  $\mu\text{M}$   $\text{ZnCl}_2$  (Merck, Alemanha); 10 mM NPPC (Sigma, EUA)] e incubou-se a 37°C, durante 1 hora. Após esse período, foi lida a absorvância (usando o comprimento de onda de 403 nm), equivalente à





densidade ótica, de cada um dos poços da microplaca, utilizando o leitor de placas Synergy HT (BioTek, EUA), tendo como branco uma fila de poços contendo a mistura do meio de cultura com o reagente de NPPC. O ensaio foi repetido 3 vezes e o valor final para cada isolado foi determinado pela média dos 3 ensaios, subtraída do valor médio obtido para a densidade ótica dos brancos.

Os valores de absorvância finais para cada isolado foram interpretados segundo o método descrito em Choy *et al.* (2008): o valor “cut-off” de densidade ótica ( $DO_c$ ) foi definido como o correspondente a 3 desvios-padrão das médias das densidades óticas do branco. Os valores obtidos para cada isolado foram classificados como ausência de formação de fosfolipase C quando  $DO \leq DO_c$ , formação reduzida de fosfolipase C quando  $2 \times DO_c \geq DO > DO_c$ , formação moderada de fosfolipase C quando  $4 \times DO_c \geq DO > 2 \times DO_c$  e formação elevada de fosfolipase C quando  $DO > 4 \times DO_c$ .

### **3.1.2.5. Pesquisa de pigmentos: piocianina**

A produção de piocianina nos isolados em estudo foi pesquisada segundo o método descrito em Mavrodi *et al.* (2001). O meio de cultura contendo 2% de peptona (Difco, EUA), 0,14% de  $MgCl_2$  (Merck, Alemanha), 1% de  $K_2SO_4$  (Merck, Alemanha), 2% de glicerol (Merck, Alemanha) e 15 g de agar (Difco, EUA), foi inoculado e a placa foi colocada a incubar a 37°C, durante 48 horas. O surgimento de um pigmento escuro sob a zona de crescimento foi considerado um resultado positivo e a sua ausência um resultado negativo.

### **3.1.2.6. Pesquisa semi-quantitativa de sideróforos: pioverdina**

A produção de pioverdina nos isolados em estudo foi pesquisada segundo o método descrito em McMorran *et al.* (2001). Os isolados foram cultivados em meio de cultura King B (Scharlau, Espanha) até à fase estacionária de crescimento. De seguida, centrifugou-se a cultura líquida e transferiu-se 200  $\mu$ l do sobrenadante para uma microplaca de 96 poços de fundo plano (Bioplastics, Holanda), segundo o esquema previamente definido de localização dos sobrenadantes dos isolados na microplaca. Foi lida a absorvância equivalente à densidade ótica, no comprimento de onda de 403 nm, dado ser o valor máximo de absorvância da pioverdina, de cada um dos poços da microplaca, utilizando o leitor de placas Synergy HT (BioTek, EUA), tendo como branco uma fila de poços contendo apenas meio de cultura. O ensaio foi repetido 3 vezes e o valor final para cada isolado foi determinado pela média dos 3 ensaios, subtraída do valor médio obtido para a densidade ótica dos brancos.

Os valores de absorvância finais para cada isolado foram interpretados segundo o método descrito no ponto 3.1.2.4.2. deste capítulo, sendo as categorias definidas idênticas à desse ponto.

### 3.1.3. Outras características com influência na virulência

#### 3.1.3.1. Pesquisa semi-quantitativa da produção de biofilmes

A capacidade dos isolados em estudo produzirem biofilmes coesos em superfícies abióticas foi avaliada segundo o método descrito em Choy *et al.* (2008), com ligeiras alterações. A densidade ótica de uma cultura líquida crescida em meio de cultura Luria-Bertani (LB) (Nzytech, Portugal) a 37°C durante a noite, medida no espectrofotómetro UV-1800 (Shimadzu, Japão) foi acertada a 1,5 e 200 µl dessa suspensão bacteriana foi transferida para uma microplaca de 96 poços de fundo plano (Bioplastics, Holanda), segundo o esquema previamente definido de localização dos sobrenadantes dos isolados na microplaca. Após inoculação a microplaca foi colocada a incubar a 37°C, durante 24 horas. Findo esse período, removeu-se a suspensão bacteriana, aspirando-a com uma micropipeta e de seguida cada poço foi lavado 3 vezes com soro fisiológico. As bactérias aderentes à superfície do poço foram coradas com uma solução de cristal-violeta (Merck, Alemanha) a 0,25%, durante 5 minutos. Após esse período, cada poço foi lavado com água destilada entre 10 a 15 vezes, até que deixasse de haver libertação de corante aquando da lavagem. De seguida, adicionou-se 200 µl de etanol absoluto (Merck, Alemanha) para solubilizar o cristal-violeta que permaneceu agarrado às células aderentes à superfície do poço, e procedeu-se à leitura da absorvância, equivalente à densidade ótica, no comprimento de onda de 660 nm, de cada um dos poços da microplaca, utilizando o leitor de placas Synergy HT (BioTek, EUA), tendo como branco uma fila de poços contendo apenas etanol. O ensaio foi repetido 3 vezes e o valor final para cada isolado foi determinado pela média dos 3 ensaios, subtraída do valor médio obtido para a densidade ótica dos brancos.

Os valores de absorvância finais para cada isolado foram interpretados segundo o método descrito no ponto 3.1.2.4.2. deste capítulo, sendo as categorias definidas idênticas à desse ponto.



## 3.2. Pesquisa genotípica de fatores de virulência

Diversos genes associados à expressão de fatores de virulência foram pesquisados nas amostras em estudo, através da reação de polimerização em cadeia, “polymerase chain reaction” (PCR), usando *primers* específicos para esse fim.

### 3.2.1. Extração de ADN

A extração de ADN foi realizada por fervura de colónias, adaptando o método de Wiedmann-al-Ahmad *et al.* (1994). Uma colónia de cada isolado foi ressuspensa em 50 µl de água ultra-pura estéril e fervida em banho-maria durante 15 minutos, de modo a lisar completamente as células. De seguida, os detritos celulares foram removidos por centrifugação durante 5 minutos, a 14300 rotações por minuto (rpm) numa microcentrífuga de bancada Espresso (Thermo Scientific, EUA). O sobrenadante, contendo o ADN, foi transferido para um novo tubo eppendorf estéril.

A quantidade e qualidade do ADN obtido foram avaliadas pelo fotómetro GeneQuant Pro (Amersham Pharmacia Biotech, Suécia), retendo-se todas as suspensões de ADN com uma concentração superior a 500 µg/ml e uma relação de comprimentos de onda 260/280 inferior a 1,2, indicativa da presença de poucas proteínas na suspensão, dado que estas podem interferir na PCR. Nos casos em que a suspensão de ADN não cumpria esses requisitos, novo processo de extração era realizado.

As suspensões de ADN foram conservadas a -20°C até à sua utilização, podendo ser novamente congeladas a -20°C, para futuras utilizações.

### 3.2.2. Reação de polimerização em cadeia (PCR)

As reações de amplificação dos genes de virulência do ADN de cada isolado em estudo foram efetuadas usando 3 termocicladores: MJ Mini (BioRad, EUA), Tpersonal e T1 (ambos da Biometra, EUA).

Antes da realização de cada PCR foi preparada a mistura de amplificação contendo (números de reações+2) x 21,5 µl de mistura de reação Dream Taq PCR Master Mix (Fermentas, EUA), preparada previamente, de acordo com as instruções do fabricante, acrescentada de (número de reações+2) x 1,25 µl do *primer forward* (10 µM) e idêntico volume do *primer reverse* (10 µM). Essa mistura foi homogeneizada e distribuída em alíquotas de 25 µl por tubos eppendorf estéreis de 200 µl, livres de ADN e ADNases, previamente codificados segundo esquema de identificação dos códigos atribuídos ao ADN dos isolados em estudo. A cada uma das alíquotas da mistura de reação adicionou-se 1 µl de cada uma das suspensões de

ADN dos isolados a testar. Nas situações em que a reação de amplificação era feita para a posterior sequenciação dos produtos de reação, o volume utilizado era de 50 ou 100 µl da mesma mistura de reação, contendo 2 ou 4 µl de ADN do isolado cujo produto de reação seria sequenciado. Em cada conjunto de reações de PCR foi incluída uma alíquota da mistura de reação de amplificação acrescida de 1 µl de água ultra-pura estéril, para detetar eventuais contaminações.

Todas as reações de PCR foram iniciadas após a preparação das amostras para amplificação, decorrendo em 33 ciclos consecutivos de desnaturação a 95°C durante 1 minuto, “annealing” à temperatura específica de cada conjunto de *primers* (tabela 5) durante 1 minuto (30 segundos nalguns casos, indicados na tabela 5) e extensão a 72°C durante 1 minuto (a primeira desnaturação foi feita a 95°C e a extensão final a 72°C, ambas durante 5 minutos).

**Tabela 5** – *Primers* utilizados na pesquisa genotípica de fatores de virulência.

Grupo de Virulência	<i>Primer</i>	Sequência	Temperatura de <i>annealing</i> (°C)	Tamanho do produto PCR (bp)	Referência bibliográfica
Mobilidade	<i>flaG</i>	F: 5'-ACAACGGTAAAGGGCAG-3' R: 5'-AACGAGCGATTCTCGATG-3'	59,5	1689	Finnan <i>et al.</i> (2004)
	<i>orfF</i>	F: 5'-CAGTTCTTCACCCGCAAGATCGCC-3' R: 5'-CCTCGTAGTCGCCGTGCATGAACG-3'	64	946	Finnan <i>et al.</i> (2004)
	<i>pilA</i>	F: 5'-ACAGCATCCAAGTACGCG-3' R: 5'-TTGACTTCTCCAGGCTG-3'	59	1675	Finnan <i>et al.</i> (2004)
	<i>pilB</i>	F: 5'-TCGAACTGATGATCGTGG-3' R: 5'-CTTTCGGAGTGAACATCG-3'	54	408	Finnan <i>et al.</i> (2004)
Adesão	<i>lecA</i>	F: 5'-CTCCTGCATGAATTGGTAAGGC-3' R: 5'-GGGTCAGGAATCGATATCCC-3'	55,5*	736	Chemani <i>et al.</i> (2008)
	<i>lecB</i>	F: 5'-TAACAATCGAACGAGCCGGC-3' R: 5'-TCAACTGGACAGTCTGGGCG-3'	59*	836	Chemani <i>et al.</i> (2008)
Fenazinas	<i>phzH</i>	F: 5'-GGGTTGGGTGGATTACAC-3' R: 5'-CTCACCTGGGTGTTGAAG-3'	51	1752	Finnan <i>et al.</i> (2004)
	<i>phzM</i>	F: 5'-ATGGAGAGCGGGATCGACAG-3' R: 5'-ATGCGGGTTTCCATCGGCAG-3'	54	875	Finnan <i>et al.</i> (2004)
	<i>phzS</i>	F: 5'-TCGCCATGACCGATACGCTC-3' R: 5'-ACAACCTGAGCCAGCCTTCC-3'	63	1752	Finnan <i>et al.</i> (2004)
	<i>phzI</i>	F: 5'-CATCAGCTTAGCAATCCC-3' R: 5'-CGGAGAACTTTCCCTG-3'	49	392	Finnan <i>et al.</i> (2004)
	<i>phzII</i>	F: 5'-GCCAAGGTTTGTGTCGG-3' R: 5'-CGCATTGACGATATGGAAC-3'	51	1036	Finnan <i>et al.</i> (2004)
Proteases	<i>apr</i>	F: 5'-TGTCCAGCAATTCTCTTGC-3' R: 5'-CGTTTTCCACGGTGACC-3'	51	1017	Finnan <i>et al.</i> (2004)
	<i>lasA</i>	F: 5'-GCAGCACAAAAGATCCC-3' R: 5'-GAAATGCAGGTGCGGTC-3'	47	1075	Finnan <i>et al.</i> (2004)
	<i>lasB</i>	F: 5'-ACAGGTAGAACGCACGGTTG-3' R: 5'-GATCGACGTGTCAAACTCC-3'	57	1220	Finnan <i>et al.</i> (2004)
Exotoxinas	<i>exoA</i>	F: 5'-AACCAGCTCAGCCACATGTC-3' R: 5'-CGCTGGCCCATTCGCTCCAGCGCT-3'	68	396	Kaszab <i>et al.</i> (2010)
Sistema secretório do tipo III	<i>exoS</i>	F: 5'-ATCCTCAGGCGTACATCC-3' R: 5'-ACGACGGCTATCTCTCCAC-3'	53	328	Finnan <i>et al.</i> (2004)
	<i>exoT</i>	F: 5'-AATCGCCGTCCAAGTGCATGCG-3' R: 5'-TGTTCCGCGAGGTAAGTCTC-3'	58*	152	Kaszab <i>et al.</i> (2010)
	<i>exoU</i>	F: 5'-GGGAATACTTTCCGGGAAGTT-3' R: 5'-CGATCTCGCTGCTAATGTGTT-3'	58*	428	Allewelt <i>et al.</i> (2000)
	<i>exoY</i>	F: 5'-TATCGACGGTCATCGTCAGGT-3' R: 5'-TTGATGCACTCGACCAGCAAG-3'	61,8	1035	Finnan <i>et al.</i> (2004)

bp – pares de bases; F – *forward*; R – *reverse*; \* - tempo de *annealing* de 30 segundos



### **3.2.3. Separação eletroforética dos produtos de amplificação**

Após conclusão de cada PCR, as amostras foram sujeitas a um processo de separação eletroforético, conforme descrito no ponto 2.2.1.1. do presente capítulo.

### **3.2.4. Análise e interpretação dos resultados**

Concluída a eletroforese o gel foi fotografado sob luz ultravioleta, utilizando um transiluminador (Vilbert Lourmat, França), acoplado a uma unidade de captação digital de imagens (Uvitec, Reino Unido). Quando os produtos de PCR apresentavam as dimensões esperadas (tabela 5), tal era considerado um resultado positivo. A ausência de uma banda de ADN de tamanho igual ao esperado, ou a presença de uma banda de ADN de tamanho diferente do esperado era considerado um resultado negativo.

### **3.2.5. Purificação e concentração dos produtos de amplificação para sequenciação**

Sempre que era necessário proceder à sequenciação dos produtos de PCR, estes foram submetidos a processo de purificação e concentração recorrendo ao sistema PCR purification kit (Qiagen, EUA), seguindo as instruções indicadas pelo fabricante.

Após conclusão deste procedimento, os produtos de PCR purificados e concentrados foram enviados para sequenciação num fornecedor externo.

### **3.2.6. Análise e interpretação dos resultados da sequenciação**

A qualidade das sequências nucleotídicas resultante do serviço externo de sequenciação foi analisada, e editada manualmente quando necessário, usando o *software* Sequence Scanner versão 1.0 (Applied Biosystems, EUA). De seguida, as sequências foram alinhadas contra sequências publicadas na base de dados GenBank®, utilizando a função “megablast” da ferramenta “Basic Local Aligment Search Tool” (BLAST®) (NCBI, EUA).

Os resultados foram interpretados segundo a informação devolvida pela ferramenta BLAST®, considerando como similares apenas as sequências que apresentavam uma percentagem de similaridade igual ou superior a 99%.

## 4. Estudos de infecção aguda

A capacidade dos isolados de *P. aeruginosa* causarem infecções agudas foi estudada no modelo de infecção aguda de larvas de *Galleria mellonella*, considerado como um bom modelo de infecção para diversas bactérias, incluindo *P. aeruginosa* (Jander *et al.*, 2000).

### 4.1. Seleção das amostras para estudo

Da amostra termal de *P. aeruginosa*, selecionou-se aleatoriamente um isolado de cada equipamento termal e dois isolados planctônicos, num total de 5 isolados. Da amostra clínica selecionaram-se aleatoriamente 3 isolados de infecções respiratórias e ainda um isolado de urina e um de exsudados.

Todos os isolados selecionados pertenciam a diferentes grupos de PFGE.

### 4.2. Ensaio de infecção aguda em larvas de *Galleria mellonella*

#### 4.2.1. Determinação da concentração celular das suspensões bacterianas

Partindo de uma suspensão celular dos isolados selecionados para este estudo com uma densidade ótica entre 1 e 1,2, medida no espectrofotômetro UV-1800 (Shimadzu, Japão) foram feitas sucessivas diluições de 1:10 até à nona diluição, numa solução de Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Merck, Alemanha) 10 mM. De seguida inoculou-se, por espalhamento à superfície no meio de cultura TSA (Scharlau, Espanha), 100 µl de cada diluição preparada. As placas foram incubadas a 37°C e os resultados lidos após 24 horas de incubação.

Foram feitas 3 réplicas deste procedimento e os resultados finais, expressos em UFC/ml, para cada diluição, foram determinados pela média aritmética dos valores obtidos em cada réplica, incluindo o acerto dos valores de DO de cada réplica.

#### 4.2.2. Injeção das larvas

Considerando os resultados dos ensaios descritos no ponto 4.2.1. deste capítulo, as diluições das suspensões bacterianas de cada isolado em estudo, correspondentes a concentrações celulares entre 0 e 10000 UFC/ml, num total de 5 diluições por ensaio, foram utilizadas para inocular larvas de *G. mellonella*,



conforme procedimento descrito em Miyata *et al.* (2003), com ligeiras modificações. As larvas utilizadas pertenciam à cultura permanente do Grupo de Estudo em Ciências Biológicas do Instituto Superior Técnico da Universidade de Lisboa, tendo sido crescidas em condições controladas até apresentarem cerca de 1 cm de comprimento, altura em que foram submetidas ao ensaio de infeção.

As séries de diluição utilizadas para a inoculação foram feitas numa solução de  $Mg_2SO_4$  (Merck, Alemanha) 10 mM contendo 1,2 mg/ml de ampicilina (Nzytech, Portugal), adicionada para inibir a infeção das larvas pelas bactérias presentes na sua superfície. As larvas foram inoculadas por injeção, acima do 2º par de patas posteriores, através de microseringa estéril acoplada a uma chave micrométrica, utilizada para premir o êmbolo da seringa de modo a que esta dispensasse o volume exato de 5  $\mu$ l por injeção. Antes da injeção, a superfície de injeção da larva foi desinfetada com etanol absoluto (Merck, Alemanha), também para diminuir a possibilidade de infeção das larvas pelas bactérias presentes na sua superfície. Para cada diluição foram inoculadas 10 larvas e finda a inoculação de cada conjunto de larvas, estas foram colocadas a incubar a 37°C, numa placa de petri estéril, durante 48 horas. Findo esse tempo, o número de larvas mortas foi contabilizado, para cada experiência, sendo que uma larva era considerada como morta quando se apresentava necrosada ou quando não reagia ao toque. Para cada isolado foi feito um controlo negativo, injetando um grupo de 10 larvas apenas com a solução de diluição, seguido de incubação e leitura conforme descrito acima.

Foram feitas 3 réplicas deste procedimento para cada isolado e os resultados finais, expressos em número de larvas mortas, para cada diluição, foram determinados pela média aritmética dos valores obtidos em cada réplica.

#### **4.2.3. Determinação da dose letal para 50% das larvas testadas ( $LD_{50}$ )**

Obtidos os valores médios de UFC/ml e o número de larvas mortas por diluição, para cada isolado, a dose letal para 50% das larvas testadas ( $LD_{50}$ ) foi estimada através de um modelo de regressão logística com quatro parâmetros, construído com base nos logaritmos decimais das médias aritméticas dos resultados obtidos nos 3 ensaios experimentais para cada isolado, utilizando o *software* Sigmaplot, versão 10.0 (Systat, EUA). Em termos globais, o modelo foi avaliado através do valor do coeficiente de determinação ajustado e do teste F, considerando um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ). O erro experimental foi determinado usando a fórmula da propagação de erros para potências de base 10 e os resultados finais foram expressos em UFC/ml.

## 5. Ensaio de resistência à desinfecção

As amostras de *P. aeruginosa* selecionadas para este estudo foram sujeitas à ação de um agente químico vulgarmente utilizado na desinfecção química de circuitos de água, e à ação de um agente desinfetante físico, radiante, a fim de testar a resistência a estes agentes.

### 5.1. Ensaio de resistência à desinfecção química por hipoclorito de sódio

A partir de meio de cultura líquido Müller Hinton (MH) (Scharlau, Espanha) suplementado com 4% de hipoclorito de sódio (Merck, Alemanha) foi feita uma escala de diluições de 1:2 em 200 µl de meio de cultura líquido MH (Scharlau, Espanha) previamente distribuído por todos os poços de uma microplaca de 96 poços de fundo plano (Bioplastics, Holanda), até à diluição de 1:64, equivalente à concentração final de 0,075% de hipoclorito. O último poço de cada fila da microplaca permaneceu apenas com meio de cultura MH, servindo como controlo positivo de cada ensaio.

Para cada isolado de cada população, preparou-se uma suspensão bacteriana com densidade ótica entre 1,1 e 1,2, medida no espetrofotómetro UV-1800 (Shimadzu, Japão) e diluiu-se numa escala de diluição de 1:10 até à diluição  $10^{-6}$ , equivalente a uma concentração bacteriana estimada de 100 a 900 UFC/ml.

De seguida, 100 µl da suspensão diluída  $10^6$  vezes foi inoculada ao longo de uma fila horizontal da microplaca, de modo a sujeitar as bactérias a diferentes concentrações do agente bactericida. O último poço de cada fila foi também inoculado, para confirmar a viabilidade das células utilizadas no ensaio. Após inoculação de toda a placa, esta foi colocada a incubar, a 37°C, durante 24 horas, após o qual os resultados foram lidos. A presença de turvação no poço foi considerada indicativa de crescimento bacteriano, sugestiva da capacidade do isolado resistir à presença do bactericida na concentração correspondente ao poço onde o crescimento bacteriano era observado. A ausência de turvação foi considerada como a incapacidade das células bacterianas se multiplicarem na presença do bactericida na concentração correspondente ao poço onde não era observada turvação. Destes poços inoculou-se, por espalhamento à superfície do meio de cultura sólido MH (Scharlau, Espanha), 100 µl do inóculo testado, a fim de verificar a existência de crescimento colonial após 48 horas de incubação a 37°C.

Foram feitas 3 réplicas deste procedimento e o resultado final para cada isolado foi determinado pela pior das observações de cada réplica (nos casos em que se verificaram diferenças dos resultados entre réplicas, reteve-se o pior resultado, ou seja, aquele onde se verificou crescimento bacteriano na presença da maior concentração de hipoclorito).





## 5.2. Ensaio de resistência à desinfeção física por radiação ultravioleta

Diluições de suspensões bacterianas de cada isolado, idênticas às preparadas no ponto 5.1. deste capítulo, foram efetuadas e da diluição  $10^{-6}$  de cada isolado inocularam-se três placas contendo meio de cultura sólido MH (Scharlau, Espanha) com 100  $\mu$ l, por espalhamento em dupla toalha. De seguida, as placas foram expostas a radiação ultravioleta (UV) de 264 nm de comprimento de onda utilizando um emissor de UV (Vilber Lourmat, França). Uma placa foi exposta, aberta, durante 30 segundos e outra, também aberta, durante 1 minuto: A terceira placa inoculada não foi sujeita a qualquer exposição radiante, servindo de controlo positivo ao ensaio. Findos os períodos de exposição, as placas foram colocadas a incubar a 37°C durante 24 horas. Após este período, as placas foram observadas quanto à presença de crescimento e os resultados registados, seguindo-se um segundo período de incubação a 37°C durante mais 24 horas. Após este segundo período de incubação, as placas foram novamente observadas quanto à presença de crescimento, os resultados registados e o ensaio dado por terminado.

Foram feitas 3 réplicas deste procedimento e o resultado final para cada isolado foi determinado pela pior das observações de cada réplica (nos casos em que se verificaram diferenças dos resultados entre réplicas, reteve-se o pior resultado, ou seja, aquele onde se verificou o maior grau de crescimento bacteriano para a mesma exposição à radiação). Os resultados finais foram classificados em 5 níveis de crescimento colonial na placa: 1 – ausência de crescimento; 2 – crescimento em torno do rebordo do meio de cultura com a lateral da placa, ocupando menos de metade desse rebordo; 3 – crescimento em torno do rebordo do meio de cultura com a lateral da placa, ocupando mais de metade desse rebordo; 4 – crescimento em torno do rebordo do meio de cultura com a lateral da placa, ocupando mais de metade desse rebordo e crescimento em menos de metade da superfície do meio de cultura na placa; 5 – crescimento em torno do rebordo do meio de cultura com a lateral da placa, ocupando mais de metade desse rebordo e crescimento em mais de metade da superfície do meio de cultura na placa.

## 6. Determinação da suscetibilidade a antibióticos

A suscetibilidade aos antibióticos mais utilizados no tratamento de infeções por *P. aeruginosa* foi testada nos isolados termais e clínicos de *P. aeruginosa* selecionados para este estudo. Na amostra termal, foram pesquisados os mecanismos de resistência dos mutantes obtidos nestes ensaios.

### 6.1. Método de difusão em disco

A partir de suspensões em soro fisiológico com densidade ótica equivalente à turvação 0,5 da escala de McFarland de cada um dos isolados em estudo foram inoculadas, pelo método de espalhamento em dupla toalha, a superfície de duas placas de petri contendo meio de cultura sólido MH (Scharlau, Espanha). Numa das placas colocou-se asseticamente e equidistantes diferentes discos contendo os antibióticos amicacina (AMK) 30 µg (Oxoid, EUA), ciprofloxacina (CIP) 5 µg (Oxoid, EUA), MP 10 µg (Oxoid, EUA) e IP 10 µg (Oxoid, EUA). Na outra placa colocou-se asseticamente e equidistantes discos contendo os antibióticos FEP 30 µg (Oxoid, EUA), aztreonam (AZT) 30 µg (Oxoid, EUA), CAZ 30 µg (Oxoid, EUA) e PIP 30 µg (Oxoid, EUA).

Após este conjunto de inoculações consecutivas, que decorreu em menos de 15 minutos, seguindo as instruções do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), as placas foram colocadas a incubar a 37°C, durante 18 horas, findas as quais, se procedeu à leitura dos resultados, por medição dos halos de inibição do crescimento bacteriano utilizando um paquímetro digital. Os resultados foram registados e interpretados segundo as normas expressas pelo CLSI (CLSI, 2009). Nos casos definidos como intermédios pelos parâmetros do CLSI, estes foram contabilizados para o estudo como resistentes (Cardoso *et al.*, 2008).

### 6.2. Determinação da concentração mínima inibitória (CMI)

Quando adequado, foi determinada a concentração mínima inibitória (CMI) de alguns antibióticos, pelo método E-test (BioMérieux, França). Este método baseia-se também na difusão de antibióticos através do meio de cultura MH, usando a técnica descrita acima para a inoculação da placa. Contudo, o antibiótico apresenta-se não num disco, de concentração única, mas numa tira de um material plástico impregnado num gradiente de concentração do antibiótico. Quando a tira de E-test é colocada sobre a superfície do meio de cultura sólido inoculado, inicia-se uma libertação em gradiente de concentração do antibiótico pelo meio.



Após incubação a 37°C durante 18 horas, procede-se à observação da placa, verificando-se o surgimento de uma elipse de inibição simetricamente centrada em torno da tira de antibiótico. O vértice da elipse interceta a tira de gradiente de antibiótico no local correspondente à CMI do antibiótico em análise. Este valor é obtido pela leitura da escala contida na tira, em µg/ml.

### **6.3. Pesquisa da diminuição da expressão da porina OprD**

A pesquisa da diminuição da expressão da porina OprD foi realizada nalguns isolados, por eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes, “sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis” (SDS-PAGE), após obtenção por ultracentrifugação das membranas externas da parede celular dos isolados em estudo.

#### **6.3.1. Extração das membranas externas da parede celular**

As membranas externas da parede celular dos isolados em estudo foram obtidas por ultracentrifugação, seguindo o método de Cardoso *et al.* (2002).

Os isolados foram crescidos em meio líquido TS (Scharlau, Espanha) até atingirem a fase exponencial de crescimento, altura em que as células foram centrifugadas a 15000 g/min, à temperatura ambiente, durante 20 minutos, numa centrífuga B-20 A (IEC; EUA) e ressuspensos de seguida, para lavagem, em 10 mM de tampão fosfato salino (PBS) [NaCl (Panreac, Espanha) 150 mM, KCl (Merck, Alemanha) 25 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (Merck, Alemanha) 0,06 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck, Alemanha) 1 mM, pH=7,2], através de nova centrifugação a 15000 g/min, durante 20 minutos. Os sedimentos foram ressuspensos em 5 ml de tampão fosfato (PB) a 10 mM [Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (Merck, Alemanha) 0,06 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck, Alemanha) 1 mM, pH=7] contendo 140 mM de mercaptoetanol (Sigma, EUA) e sonicados, em gelo, durante 5 minutos, com intervalos de 30 segundos, num sonicador VibraCell (Sonics and Materials, EUA). Os detritos celulares foram removidos por centrifugação a 15000 g/min, durante 15 minutos, à temperatura ambiente. Findo este processo, o sobrenadante, que continha a membrana exterior da parede celular, foi conservado e sujeito a ultra-centrifugação a 180000 g/min, a 4°C, durante 60 minutos, numa ultracentrifuga L-80 (Beckman, EUA), utilizando o rotor 70.1 Ti do equipamento. O sedimento obtido foi ressuspenso em 5 ml de tampão PB, para lavagem, e sujeito a novo processo de ultracentrifugação nas mesmas condições, repetindo-se o processo de lavagem por duas vezes. De seguida, o sedimento lavado foi ressuspenso em 5 ml de tampão PB contendo lauril-sarcosinato de sódio (Sigma, EUA) a 1%, e deixou-se a reação de desnaturação decorrer durante 20 minutos, à temperatura ambiente. Decorrido este tempo, foi feita nova ultracentrifugação a

180000 g/min, à temperatura ambiente, durante 30 minutos, finda a qual se procedeu à ressuspensão para lavagem dos precipitados em tampão PBS contendo lauril-sarcosinato de sódio (Sigma, EUA) a 1%, seguida de nova ultracentrifugação em iguais condições.

Por último, os sedimentos obtidos foram ressuspensos em 150 µl de água destilada em tubos eppendorf previamente identificados, e conservados a -80°C até utilização.

### **6.3.2. Separação eletroforética das proteínas da membrana externa por SDS-PAGE**

As membranas externas da parede celular dos isolados em estudo foram separadas eletroforéticamente em condições desnaturantes, segundo o método de Laemmli (1970), com ligeiras modificações.

#### **6.3.2.1. Quantificação proteica e desnaturação das amostras**

Previamente à eletroforese, e para permitir a comparação dos perfis eletroforéticos a obter, foi feita a quantificação proteica em cada extrato, de modo a permitir o ajuste do volume de amostra a aplicar, para que a quantidade de proteína sujeita a eletroforese fosse igual nas diferentes amostras.

A quantificação proteica foi feita segundo o método de Lowry *et al.* (1951), com ligeiras modificações, e usando albumina bovina sérica (BSA), numa escala de concentrações de 50 a 200 µg/ml, como padrão.

10 µl de cada amostra foi diluído em 1 ml de água destilada, e adicionou-se 25 µl de SDS 20% e 5 ml de uma solução contendo Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Merck, Alemanha) 2% em NaOH (Merck, Alemanha) 0,1 M e CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O (Merck, Alemanha) 0,5% em citrato de sódio (Merck, Alemanha) 1% (50/1). Após homogeneização cuidada, deixou-se permanecer a mistura à temperatura ambiente durante 10 minutos. De seguida, adicionou-se 0,5 ml de reagente Folin-Ciocalteu (Biorad, EUA), homogeneizou-se e deixou-se à temperatura ambiente entre 30 a 120 minutos até fazer a leitura no espectrofotómetro UV-1800 (Shimadzu, Japão), no comprimento de onda de 750 nm. Com os valores obtidos para a BSA, construiu-se uma curva padrão a partir da qual se iterou a concentração de proteína presente nas amostras a eletroforetar, permitindo assim ajustar o volume de cada amostra a utilizar na eletroforese, para que a quantidade de proteína fosse similar entre elas.

As alíquotas das amostras a submeter a eletroforese foram desnaturadas a 95°C durante 5 minutos, após adição de solução desnaturante comercial (Biorad, EUA) em volume correspondente a 25% do volume



de cada alíquota. Findo este tempo, e até à aplicação no gel para eletroforese, as alíquotas foram preservadas em gelo.

### **6.3.2.2. Separação eletroforética das amostras**

As amostras desnaturadas foram sujeitas a um processo de separação eletroforético em gel de acrilamida [acrilamida (Sigma, EUA) 4,2%, bisacrilamida (Sigma, EUA) 0,11%, Tris-HCl (Merck, Alemanha) 0,4 M pH=8,8, SDS (Sigma, EUA) 1%], mergulhado em tampão de Tris-glicina [Tris-HCl (Merck, Alemanha) 0,125 M, glicina (Merck, Alemanha) 0,96 M, pH=8,3, SDS (Merck, Alemanha) 10%], num sistema de eletroforese vertical (Biorad, EUA), a uma voltagem constante de 150 V e intensidade de corrente constante de 250 mA, durante 1 a 2 horas. No primeiro poço de cada gel foi colocado um padrão proteico (Biorad, EUA) de massas moleculares conhecidas: 231, 86, 70, 47, 26, 22 e 17 kDa.

### **6.3.2.3. Revelação dos géis e interpretação dos resultados**

Terminada a eletroforese, os géis foram submetidos durante 45 minutos a tratamento com uma solução de corante Comassie Brilliant Blue (Merck, Alemanha) a 0,25% dissolvido em metanol (Merck, Alemanha) a 45% e ácido acético (Acros Organics, EUA) a 10%, para fixar e corar as proteínas. De seguida, procedeu-se à lavagem do corante não fixado por sucessivas imersões de duas horas do gel corado em solução de metanol/ácido acético (5/1) até que as bandas proteicas se tornassem visíveis.

Os perfis eletroforéticos obtidos para cada amostra foram então comparados entre si e com o perfil obtido para o padrão proteico, a fim de verificar a ausência ou diminuição da quantidade da proteína correspondente à porina OprD nas amostras-alvo deste ensaio experimental.

## 7. Pesquisa de elementos genéticos móveis

Por serem os EGMs mais frequentemente detetados e melhor descritos na literatura, foi feita apenas a pesquisa de ilhas genômicas, integrões e plasmídeos nos isolados em estudo, não se pesquisando a presença de transposões, sequências de inserção ou de fagos no genoma das bactérias estudadas.

### 7.1. Pesquisa genotípica de ilhas genômicas

Foi feita a pesquisa das ilhas genômicas PAGI-1, PAGI-2 e PAGI-3, por PCR, nas amostras em estudo, conforme descrito no ponto 3.2.2. deste capítulo, utilizando as mesmas suspensões de ADN aí utilizadas e os *primers* indicados na tabela 6. A observação e interpretação dos resultados obtidos foi feita conforme descrito nos pontos 3.2.3. e 3.2.4., seguida, quando aplicável, pela sequenciação e interpretação dos resultados de sequenciação dos produtos de PCR, conforme descrito nos pontos 3.2.5. e 3.2.6. do presente capítulo.

**Tabela 6** – *Primers* utilizados na pesquisa genotípica de ilhas genômicas.

Ilha genômica	Primer	Sequência	Temperatura de <i>annealing</i> (°C)	Tamanho do produto PCR (bp)	Referência bibliográfica
PAGI 1	<i>orf3</i>	F: 5'-TGGTGCTGACCAGCGACAAAG-3' R: 5'-TCCATCGACTCGGTGCGTAG-3'	59	958	Finnan <i>et al.</i> (2004)
	<i>orf18</i>	F: 5'-ATTCCTCCACTGCCGTTCAACAACG-3' R: 5'-CCTTGCTCATCTGGAACAGGTAGC-3'	58	1039	Finnan <i>et al.</i> (2004)
	<i>orf42</i>	F: 5'-CGGAGAACCATCTCTCGAACTC-3' R: 5'-GGCTAAGACGTTCTCGACTGATTCC-3'	58	675	Finnan <i>et al.</i> (2004)
PAGI 2	<i>c22</i>	F: 5'-CCTTCGTCCATTACCTGTGAAC-3' R: 5'-AACTTGCGAGCCAACCTCACG-3'	62,4	943	Finnan <i>et al.</i> (2004)
	<i>c105</i>	F: 5'-GATTGATGCTCAACGACGATGG-3' R: 5'-GCTGTTCCGCCTTCAAGTTCC-3'	59	681	Finnan <i>et al.</i> (2004)
PAGI 3	<i>sg8</i>	F: 5'-TACAGAGTGCCCGAGCTGATG-3' R: 5'-GTGGCTTCCCTGAGAGACAGACG-3'	61	732	Finnan <i>et al.</i> (2004)
	<i>sg100</i>	F: 5'-GCAATCTGTACGCTCCTGCACG-3' R: 5'-AGCACGGCTTGTCGCTGTTCC-3'	60,4	553	Finnan <i>et al.</i> (2004)

bp – pares de bases; F – *forward*; R – *reverse*

### 7.2. Pesquisa genotípica de integrões

Conforme descrito no ponto 3.2.2. do presente capítulo, pesquisou-se por PCR a presença de integrões de classe 1, 2 e 3 nas populações em estudo, através da pesquisa das suas integrases, *intl1*, *intl2* e *intl3*, utilizando as suspensões de ADN de cada isolado em estudo, obtidas conforme descrito no ponto 3.2.1.



do presente capítulo. A tabela 7 apresenta a informação relativa aos *primers* usados para esse fim. A observação e interpretação dos resultados obtidos foi feita conforme descrito nos pontos 3.2.3 e 3.2.4., seguida, quando aplicável, pela sequenciação e interpretação dos resultados de sequenciação dos produtos de PCR, conforme descrito nos pontos 3.2.5. e 3.2.6. do presente capítulo.

**Tabela 7** – *Primers* utilizados na pesquisa genotípica de integrases.

Integrase	Primer	Sequência	Temperatura de annealing (°C)	Tamanho do produto PCR (bp)	Referência bibliográfica
Classe 1	<i>intl1</i>	F: 5'-GGGTCAAGGATCTGGATTTTCG-3' R: 5'-ACATGCGTGTAATCATCGTCG-3'	62	483	Mazel <i>et al.</i> (2000)
Classe 2	<i>intl2</i>	F: 5'-CACGGATATGCGACAAAAAGGT-3' R: 5'-GTAGCAAACGAGTGACGAAATG-3'	62	788	Mazel <i>et al.</i> (2000)
Classe 3	<i>intl3</i>	F: 5'-GCCTCCGGCAGCGACTTTCAAG-3' R: 5'-ACGGATCTGCCAAACCTGACG-3'	62	979	Mazel <i>et al.</i> (2000)

bp – pares de bases; F – *forward*; R – *reverse*

Sempre que foi obtido um resultado positivo na pesquisa de integrases, um segundo PCR, e respetiva análise, foi feito usando os *primers* específicos do integrão presuntivamente presente. Apenas os *primers* relativos a integrões de classe 1 foram necessários utilizar: 5'-CS (5'-GGCATCCAAGCAGCAAG-3') e 3'-CS (5'-AAGCAGACTTGACCTGA-3'), à temperatura de “annealing” de 53°C (Cardoso *et al.*, 2008).

Foi feita ainda a comparação das sequências dos diferentes integrões sequenciados, utilizando a função “align two or more sequences” disponível na ferramenta BLAST® (NCBI, EUA), de modo a determinar a sua similaridade e conseqüente interpretação da possível disseminação clonal ou geográfica.

### 7.3. Pesquisa de plasmídeos

A presença de plasmídeos nos isolados em estudo foi feita pelos métodos descritos em Crosa *et al.* (1994) e Barton *et al.* (1995).

#### 7.3.1. Extração e detecção de plasmídeos pelo método de Crosa *et al.* (1994)

Num tubo eppendorf previamente identificado, centrifugou-se 2 ml de uma cultura líquida de cada isolado em estudo numa centrífuga de bancada Espresso (Thermo Scientific, EUA), a 14300 rpm/min, durante 10 minutos, e descartou-se o sobrenadante. Ressuspendeu-se o sedimento celular em 2 ml de tampão TE e procedeu-se a nova centrifugação, nas condições anteriores. O sedimento celular foi ressuspensão em 40 µl de tampão TE, adicionou-se 0,6 ml de tampão de lise [tampão TE suplementado com

SDS (Merck, Alemanha) a 4% e pH ajustado a 12,5], preparado no momento, e colocou-se a mistura a incubar a 37°C, durante 30 minutos, para lisar as células. De seguida, adicionou-se a cada mistura 30 µl de Tris-HCl (Merck, Alemanha) 2 M, pH=7,0 e misturou-se suavemente. Adicionou-se depois 24 µl de NaCl (Panreac, Espanha) 5 M e incubou-se em gelo durante 4 horas, para precipitar as proteínas e o ADN cromossomal. Findo este período, centrifugaram-se os tubos nas condições anteriores e transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo eppendorf previamente identificado, contendo 1 ml de etanol absoluto (Merck, Alemanha) arrefecido a -20°C. Misturou-se gentilmente cada tubo, a fim de promover a precipitação do ADN plasmídico e de seguida procedeu-se a nova centrifugação, nas mesmas condições, mas durante 30 minutos, para deposição do ADN plasmídico. Descartou-se o sobrenadante e deixou-se secar os tubos à temperatura ambiente. Após secagem, adicionou-se a cada tubo 20 µl de tampão TE e verificou-se o seu conteúdo por eletroforese horizontal, conforme descrito nos pontos 2.2.1.1 e 2.2.1.2. deste capítulo.

### **7.3.2. Detecção de plasmídeos pelo método de Barton *et al.* (1995)**

O método descrito por Barton *et al.* (1995) envolve a realização de PFGE, pelo que o procedimento utilizado foi em tudo semelhante ao descrito nos pontos 2.2.2.1. ao 2.2.2.4. do presente capítulo, exceto na enzima de restrição utilizada e nas condições da eletroforese.

A enzima de restrição utilizada neste caso foi a enzima S1 nuclease (Invitrogen, EUA), preparada conforme as instruções do fabricante, à concentração de 40 unidades por disco.

A eletroforese em campo pulsado decorreu durante 16 horas, a 14°C, com uma voltagem constante de 6 V/cm, a um ângulo de 120° e impulso inicial de 5 segundos e final de 45 segundos.





## 8. Análise estatística

Os dados obtidos neste estudo, nominais e ordinais, foram compilados numa base de dados, comparados e analisados estatisticamente utilizando o *software* SPSS versão 21.0 (IBM, EUA). A inferência estatística foi feita através de testes qui-quadrado de homogeneidade (comparação de populações) e de independência (comparação intra-populações), ao nível de significância de 5%, para os diversos fatores de virulência e unidades genéticas móveis. O teste de Mann-Whitney foi utilizado com o mesmo objetivo e nível de significância, para a análise entre populações dos resultados do ensaio de resistência à desinfeção por hipoclorito de sódio e por radiação ultravioleta. Para o ensaio de desinfeção por radiação ultravioleta, realizaram-se ainda testes qui-quadrado de independência para analisar as diferenças de comportamento dos isolados em função da sua origem (comparação intra-população).

A estrutura global das relações de dependência dos fatores de virulência entre si, nas duas amostras, foi estudada por análise de correspondência múltipla (ACM). Esta é uma técnica estatística descritiva que permite analisar simultaneamente um conjunto grande de dados categóricos, sobretudo no caso de amostras complexas, como é o caso dos dados de virulência do presente trabalho, com um elevado número de variáveis com proporções distintas. Os gráficos produzidos permitem avaliar visualmente as eventuais relações das variáveis entre si. As modalidades das variáveis (presente/ausente, no caso do presente trabalho) assumem posições relativas nos gráficos, sugerindo possíveis associações entre elas, facilitando a visualização global das mesmas, e ainda permitem perceber em que sentido se dá essa associação (presente/presente, presente/ausente, ausente/ausente) (Greenacre, 2008). Na amostra termal foi também estudada, por esta técnica, a distribuição dos fenótipos e genes associados à virulência em função do local de origem do isolado, representados como variáveis suplementares (Carvalho, 2008; Pestana e Gajeiro, 2008), de modo a avaliar possíveis relações entre as características presentes nos isolados e os diferentes locais do sistema de adução e distribuição da água mineral natural e equipamentos. Atendendo aos princípios definidos por Le Roux e Rouanet (2004), apenas se incluíram em cada uma das ACMs realizadas as variáveis ativas que apresentavam percentagens de observações inferiores a 90% ou superiores a 10%, para cada modalidade, uma vez que acima ou abaixo desses valores não é possível interpretar adequadamente as relações dessas variáveis com as restantes, dada a sua elevada prevalência (ou ausência) na amostra. Depois desta análise exploratória, foi feita a inferência estatística das relações dos fenótipos e genes associados à virulência através de testes qui-quadrado de independência, 2 a 2, interpretados ao nível de significância de 5%, para confirmar e validar as relações observadas nos gráficos percentuais das ACMs. Acresceu ainda a avaliação da intensidade e sentido das associações observadas, obtida através da interpretação do coeficiente Phi, convencionando-se como associação robusta, ou forte, valores em módulo superiores a 0,4 (muito fortes se acima de 0,6) e associações fracas aquelas cujos



valores do coeficiente Phi, em módulo, foram inferiores a 0,4 (Osborn, 2006). Integrando os resultados obtidos nos testes inferenciais e coeficiente Phi, melhorou-se a visualização das representações gráficas das modalidades presente/ausente dos fenótipos e genes associados à virulência, através da delimitação de grupos de modalidades por círculos de traço contínuo, ponteados ou tracejados em função de apresentarem associações estatisticamente significativas fortes, fracas ou de sentido negativo, respetivamente, entre si.

A estrutura global das relações de dependência do comportamento dos isolados clínicos face à presença de antibióticos (resistentes ou suscetíveis) foi também estudada por análise de correspondência múltipla e validada por testes de qui-quadrado de independência ao nível de significância de 5%. O estudo do impacto dos fatores de virulência (fenótipos ou genes) na resistência, ou suscetibilidade, aos antibióticos da população clínica foi realizado por análise de regressão logística múltipla (RLM), a fim de construir modelos de previsão da resistência antibiótica em função da presença ou ausência de um ou vários dos fatores de virulência em conjunto. Esta modelação foi feita recorrendo também ao *software* SPSS versão 21.0 (IBM, EUA), seguindo a metodologia sugerida em Peng e So (2002). Os modelos foram selecionados com base nos critérios usuais de qualidade do ajustamento: a significância estatística em relação ao modelo nulo ( $p < 0,05$ ), os valores dos coeficientes de Cox e Snell e de Nagelkerke, os resultados dos testes de Hosmer e Lemeshow ( $p > 0,05$ ), bem como a percentagem de casos corretamente classificados (Field, 2005).

O tratamento estatístico dos resultados obtidos nos ensaios de infeção aguda encontra-se descrito no respetivo ponto do presente capítulo e foi feito recorrendo ao *software* Sigmaplot, versão 10.0 (Systat, EUA).

## **CAPÍTULO III**

---



## **RESULTADOS**



# I. Descrição e diversidade genética das amostras em estudo

## I.1. Amostra termal

Os isolados ambientais de *Pseudomonas aeruginosa* foram obtidos ao longo de 4 anos, entre 2006 e 2009, inclusive, a partir de amostras de água recolhidas com uma frequência semanal e a partir de amostras da superfície húmida de todas as peças internas de um exemplar, aleatoriamente escolhido, de cada tipo de equipamento termal, colhidas uma única vez. Foram recolhidas e analisadas 2200 amostras de água e um número indeterminado de amostras de superfície dos diversos equipamentos termais testados. Destas amostras, apenas uma parte, aleatoriamente escolhida, dos isolados das superfícies internas dos equipamentos de aerossol sónico e manossónico e do equipamento de nebulização coletiva foi preservada e incluída no estudo, pelo que não representam a totalidade dos isolados de biofilme efetivamente amostrados.

### I.1.1. Prevalência e distribuição dos isolados termais

Ao longo dos 4 anos preservou-se um total de 154 isolados de origem planctónica: 32 das captações e 122 dos circuitos de distribuição. Todos os isolados das captações foram obtidos em 2006, exceto um isolado da captação 2, colhido em 2009. 72,1% dos isolados dos circuitos de distribuição foram obtidos em 2006, 13,9% em 2007, 11,5% em 2008 e 2,5% em 2009. A estes acresceram 72 isolados de biofilmes dos equipamentos de nebulizador coletivo e aerossol manossónico e sónico, colhidos em 2008 e 2009, obtendo-se assim um total de 226 isolados de *P. aeruginosa* de origem termal (tabela 8).

**Tabela 8** – Coleção de isolados de *P. aeruginosa* de origem termal preservados para o estudo, identificados segundo a origem e a temperatura média do local de colheita.

Isolados planctónicos	Temperatura média (°C)	Número de isolados	Isolados de biofilme	Temperatura média (°C)	Número de isolados
<b>Captações</b>			<b>Nebulizador coletivo</b>	38	
Captação 1	35	20	Cone de dispersão		1
Captação 2	35	12	Placas da base (C, E, D, Ci, B)		20
<b>Circuitos</b>			Placas do topo (C, E, D, Ci, B)		20
Depósito de água fria	33	17	<b>Aerossol manossónico</b>	37	
Duche faríngeo	38	13	Base interna		4
Irrigação nasal/aerossol	42	10	O' ring		4
Nebulização individual	55	0	Saída do aerossol		4
Ingestão (hidropínia)	33	16	Topo interno		4
Hidromassagem	38	15	Entrada da água		4
Duche de Vichy	38	19	<b>Aerossol sónico</b>	37	
Vapor	60	0	Base interna		4
Piscina terapêutica	33	32	Rede de dispersão (Ci-4 is, B-3 is)		7

C – centro; E – esquerda; D – direita; Ci – cima; B – baixo; is – isolados.

As placas da base e do topo do nebulizador coletivo são separadas em 5 peças. De cada peça foram preservados 4 isolados, aleatoriamente selecionados, num total de 20 isolados por cada placa.



Outros isolados de *P. aeruginosa* obtidos a partir de amostras de biofilme de algumas peças dos equipamentos de hidromassagem, duche de Vichy e Aix e duche de jato, abastecidos, respetivamente, pelos circuitos banheiras e duche de Vichy (figura 11 – setas azuis), não foram preservados para este estudo. A quantificação de UFC derivadas destas amostras não foi efetuada, pelo que não foi possível quantificar a população de *P. aeruginosa* alocada a biofilmes presentes nos equipamentos termais. Os restantes equipamentos amostrados (vapores, duche faríngeo, irrigação nasal e nebulizador individual) não apresentaram *P. aeruginosa* (figura 11 – setas amarelas).

O gráfico da figura 12 evidencia a proporção percentual do número de isolados planctónicos preservados para este estudo, por local de colheita. Os circuitos da piscina terapêutica e as captações representaram 42% do total de isolados, distribuindo-se os restantes 58% por 6 circuitos. O contributo da captação 1 para o número de isolados obtidos nas captações foi cerca de 2/3 maior que o da captação 2.

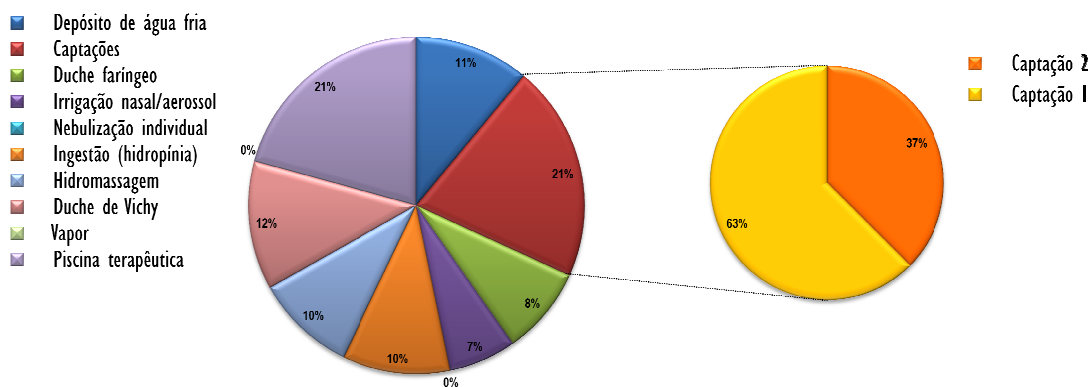


Figura 12 – Proporção percentual da distribuição de *P. aeruginosa* pelo sistema de adução e distribuição da água mineral natural.

## 1.1.2. Diversidade genética da população termal

Previamente à realização dos estudos de virulência e resistência a antibióticos dos isolados termais, foi estudada a diversidade genética da população, por dois métodos moleculares distintos: RAPD e PFGE.

### 1.1.2.1. Diversidade genética estudada por RAPD

A técnica de RAPD foi executada em 40 isolados, representando 17,7% da amostra total de *P. aeruginosa* obtida no estabelecimento termal, selecionados de modo a representar a diversidade da amostra em função das datas e locais de colheita: 17 isolados das captações (8 da captação 1 e 9 da captação 2, todos de datas diferentes), 2 isolados de cada circuito de distribuição (3 dos circuitos da piscina), de datas

diferentes, num total de 15 isolados, e 4 isolados de 4 peças diferentes do equipamento de aerossol manossónico e 4 isolados de 4 peças diferentes do equipamento de nebulização coletiva, num total de 8 isolados de biofilmes por equipamento. A tabela 9 apresenta os dados desta tipagem genética, tendo-se observado a formação de 6 grupos distintos, dentro dos quais se evidencia a persistência no tempo de isolados geneticamente idênticos, e a concomitância de isolados planctónicos e de biofilmes dentro do mesmo grupo.

**Tabela 9** – Identificação, data de colheita e perfil de RAPD dos 40 isolados termais de *P. aeruginosa* selecionados.

Có-digo	Origem isolado (local de colheita)	Data da colheita	Perfil de RAPD	Có-digo	Origem isolado (local de colheita)	Data da colheita	Perfil de RAPD
F2	Captação 1	29-03-06	A	F40	Captação 1	14-09-06	C
F14	Captação 1	16-08-06	A *	F43	Captação 1	15-09-06	C
F35	Captação 1	26-08-06	A	F66	Captação 1	11-12-06	C
F39	Captação 1	05-09-06	A	F11	Captação 2	21-06-06	D
C84	Ingestão (hidropínia)	15-07-06	A *	F9	Captação 2	28-06-06	D
C288	Ingestão (hidropínia)	21-04-07	A *	C10	Depósito de água fria	13-03-06	D
C27	Duche faríngeo	22-04-06	A *	C188	Depósito de água fria	04-10-06	D
C314	Duche faríngeo	10-07-08	A	C103	Piscina terapêutica	05-08-06	D *
C2	Ir. nasal/Aerossol	24-02-06	A	C299	Piscina terapêutica	05-09-07	D
C331	Ir. nasal/Aerossol	13-06-09	A *	F38	Captação 2	16-08-06	E
C13	Banheiras	13-03-06	A	F46	Captação 2	23-09-06	E
C228	Banheiras	11-11-06	A	F50	Captação 2	30-09-06	E
C11	Duche de Vichy	29-04-06	A *	F57	Captação 2	21-10-06	E
C318	Duche de Vichy	10-11-08	A	F60	Captação 2	26-10-06	E
C22	Piscina terapêutica	22-03-06	A	F61	Captação 2	18-11-06	E
B83	BAM – O´ring is. 1	26-01-09	A	F68	Captação 2	01-08-09	E
B85	BAM – topo is. 1	26-01-09	A *	B51	BNC – peb is. 1	17-09-08	E
F18	Captação 1	26-08-06	B	B60	BNC – pdb is. 1	17-09-08	E
B108	BAM – base is. 1	26-01-09	B *	B52	BNC – peb is. 2	17-09-08	F *
B109	BAM – base is. 2	26-01-09	B	B20	BNC – cone dispersão	17-09-08	F *

Ir. nasal – irrigação nasal; BAM – biofilme do equipamento aerossol manossónico; is. – isolado; BNC – biofilme do equipamento nebulizador coletivo; peb – placa esquerda da base; pdb – placa direita da base; \* – isolado tipado por PFGE

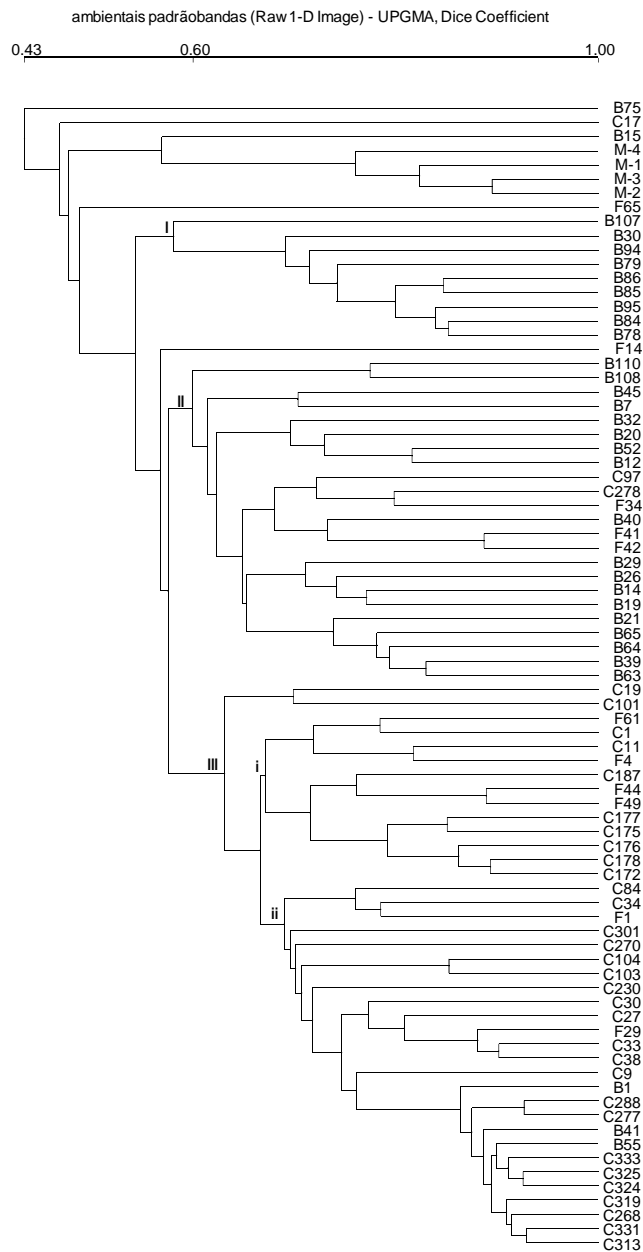
O perfil A foi o mais observado, representando 42,5% da amostra tipada por RAPD, e incluiu isolados planctónicos obtidos na captação 1 em 2006 e de diversos circuitos de distribuição, obtidos em 2007 e 2008, e ainda isolados de biofilme, do equipamento aerossol manossónico, colhidos em 2009. O perfil B constituiu-se por um isolado da captação 1, de 2006, e 2 isolados de biofilme do equipamento aerossol manossónico, de 2009. O perfil C foi representado apenas por isolados da captação 1, todos de 2006. O perfil D compôs-se por isolados colhidos em 2006 da captação 2 e alguns isolados de circuitos de distribuição, tendo sido um deles obtido em 2007. O perfil E foi o segundo perfil com maior representação, correspondendo a 22,5% do total amostrado, sendo caracterizado por isolados da captação 1, colhidos em 2006 e 2009, e ainda por 2 isolados de biofilme de duas peças distintas do equipamento nebulizador coletivo. Por último, o perfil de RAPD ao qual foi atribuída a letra F conteve os outros 2 isolados do equipamento nebulizador coletivo, também de duas peças distintas do aparelho. Estes resultados sugerem a diversidade genética, com persistência temporal e disseminação pelo sistema, da população termal de *P. aeruginosa*.





### I.1.2.2. Diversidade genética estudada por PFGE

Da amostra total de *P. aeruginosa* obtida em ambiente termal, foram selecionados aleatoriamente 77 isolados termais, por amostragem estratificada usando uma estratégia de alocação proporcional segundo o tipo de isolado, representando 1/3 da população total. Esta amostra foi sujeita a PFGE e a figura 13 apresenta o dendrograma resultante do método UPGMA aplicado aos eletroforegramas obtidos.



**Figura 13** – Dendrograma formado a partir da análise automática dos padrões eletroforéticos obtidos através de PFGE nos 77 isolados termais de *P. aeruginosa* selecionados. M-1 a M-4 correspondem aos eletroforegramas do padrão utilizado para calibrar os diferentes géis para a análise. Os restantes códigos correspondem à identificação dos isolados: F – isolados das captações; C – isolados de circuitos; B – isolados de biofilmes; I, II, III – grupos de similaridade (cerca de 60%); i, ii – sub-grupos de similaridade (cerca de 52%).

O “cut-off” para a determinação dos perfis de PFGE foi definido ao nível mais baixo de similaridade observado para os eletroforegramas dos padrões de ADN, a cerca de 80% segundo a escala representada na figura 13. A tabela 10 discrimina os isolados de cada genótipo em função do local e data de colheita.

**Tabela 10** – Identificação, data de colheita e perfil de PFGE dos 77 isolados termais de *P. aeruginosa* selecionados.

Có-digo	Origem isolado (local de colheita)	Data da colheita	Perfil de PFGE	Có-digo	Origem isolado (local de colheita)	Data da colheita	Perfil de PFGE
B75	BNC – pcb is. 3	17-09-08	<b>1</b>	F61	Captação 1	18-11-06	<b>34</b>
C17	Depósito água fria	15-05-06	<b>2</b>	C1	Irrigação nasal/Aerossol	29-04-06	<b>35</b>
B15	BNC – pdt is. 3	17-09-08	<b>3</b>	C11	Duche de Vichy	29-04-06	<b>36 *</b>
F65	Captação 2	11-12-06	<b>4</b>	F4	Captação 1	21-06-06	<b>36</b>
B107	BNC – pcb is. 4	17-09-08	<b>5</b>	C187	Depósito água fria	04-10-06	<b>37</b>
B30	BAM – o’ring is. 4	26-01-09	<b>6</b>	F44	Captação 1	23-09-06	<b>38</b>
B94	BAM – topo is. 3	26-01-09	<b>7</b>	F49	Captação 1	30-09-06	<b>38</b>
B79	BAM – base is. 4	26-01-09	<b>8</b>	C177	Duche faríngeo	27-09-06	<b>39</b>
B86	BAM – topo is. 2	26-01-09	<b>9</b>	C175	Duche faríngeo	27-09-06	<b>39</b>
B85	BAM – topo is. 1	26-01-09	<b>9 *</b>	C176	Duche faríngeo	27-09-06	<b>40</b>
B95	BAM – e. ág. is. 1	26-01-09	<b>10</b>	C178	Duche faríngeo	27-09-06	<b>40</b>
B84	BAM – base is. 2	26-01-09	<b>10</b>	C172	Banheiras	23-09-06	<b>40</b>
B78	BAM – e. ág. is. 4	26-01-09	<b>10</b>	C84	Ingestão (Hidropínia)	15-07-06	<b>41 *</b>
F14	Captação 1	16-08-06	<b>11 *</b>	C34	Irrigação nasal/Aerossol	22-04-06	<b>42</b>
B110	BAM – s. aer. is. 3	26-01-09	<b>12</b>	F1	Captação 2	29-03-06	<b>43</b>
B108	BAM – base is. 1	26-01-09	<b>13 *</b>	C301	Piscina terapêutica	26-05-07	<b>44</b>
B45	BAM – o’ring is. 3	26-01-09	<b>14</b>	C270	Banheiras	16-08-06	<b>45</b>
B7	BAM – s. aer. is. 1	26-01-09	<b>15</b>	C104	Piscina terapêutica	05-08-06	<b>46</b>
B32	BNC – pcb is. 1	17-09-08	<b>16</b>	C103	Piscina terapêutica	05-08-06	<b>46 *</b>
B20	BNC – cone disp.	17-09-08	<b>17 *</b>	C230	Banheiras	30-03-07	<b>47</b>
B52	BNC – peb is. 2	17-09-08	<b>18 *</b>	C30	Duche de Vichy	22-04-06	<b>48</b>
B12	BNC – pcb is. 3	17-09-08	<b>18</b>	C27	Duche faríngeo	22-04-06	<b>49 *</b>
C97	Duche de Vichy	16-08-06	<b>19</b>	F29	Captação 2	05-09-06	<b>49</b>
C278	Piscina terapêutica	27-05-07	<b>20</b>	C33	Irrigação nasal/Aerossol	22-04-06	<b>49</b>
F34	Captação 2	23-08-06	<b>21</b>	C38	Banheiras	13-03-06	<b>49</b>
B40	BNC – pcb is. 4	17-09-08	<b>22</b>	C9	Depósito água fria	13-03-06	<b>50</b>
F41	Captação 2	15-09-06	<b>23</b>	B1	BNC – pbb is. 1	17-09-08	<b>51</b>
F42	Captação 2	15-09-06	<b>23</b>	C288	Ingestão (Hidropínia)	21-04-07	<b>51 *</b>
B29	BNC – pbt is. 1	17-09-08	<b>24</b>	C277	Ingestão (Hidropínia)	22-05-07	<b>51</b>
B26	BNC – pet is. 1	17-09-08	<b>25</b>	B41	BAS – rdci is. 1	21-04-09	<b>51</b>
B14	BNC – pbb is. 2	17-09-08	<b>26</b>	B55	BAS – rdb is. 1	21-04-09	<b>51</b>
B19	BNC – pdt is. 1	17-09-08	<b>27</b>	C333	Duche faríngeo	02-05-09	<b>51</b>
B21	BNC – pdb is. 4	17-09-08	<b>28</b>	C325	Duche faríngeo	17-11-08	<b>51</b>
B65	BNC – pdt is. 3	17-09-08	<b>29</b>	C324	Duche de Vichy	17-11-08	<b>51</b>
B64	BNC – pdb is. 2	17-09-08	<b>30</b>	C319	Duche de Vichy	17-11-08	<b>51</b>
B39	BNC – pet is. 4	17-09-08	<b>31</b>	C268	Piscina terapêutica	30-03-07	<b>51</b>
B63	BNC – pet is. 3	17-09-08	<b>31</b>	C331	Irrigação nasal/Aerossol	13-06-09	<b>51 *</b>
C19	Banheiras	04-03-06	<b>32</b>	C313	Duche faríngeo	10-07-08	<b>51</b>
C101	Piscina terapêutica	22-07-06	<b>33</b>				

BNC – biofilme do equipamento nebulizador coletivo; pcb – placa central da base; is. – isolado; pdt – placa direita do topo; BAM – biofilme do equipamento aerossol manossónico; s. aer. – saída do aerossol; e. ág. – entrada da água; cone disp – cone dispersão; pbb – placa de baixo da base; peb – placa esquerda da base; placa de cima da base; pdb – placa direita da base; pet – placa esquerda do topo; BAS – biofilme do equipamento aerossol sónico; rdci – rede de dispersão de cima; rdb – rede de dispersão de baixo; \* – isolado tipado por RAPD.

O último perfil determinado, 51, foi o mais frequente, contendo 9 isolados de origem planctónica e 3 de biofilmes, de 2 equipamentos distintos, obtidos entre 2007 e 2009, representando 15,6% da amostra. O perfil de PFGE 49 apresentou 4 isolados planctónicos, todos de 2006. Os perfis 10 e 40 apresentaram 3



isolados cada, sendo que o primeiro era relativo a isolados de biofilmes do aerossol manossónico, e o segundo a isolados planctónicos, de 2006. Oito perfis de PFGE apresentaram 2 isolados: perfis 9, 18, 23, 31, 36, 38, 39 e 46. O perfil 9 continha isolados de biofilmes da mesma peça do aerossol manossónico. Os perfis 18 e 31 reportaram a isolados do nebulizador coletivo, o primeiro de peças diferentes e o segundo da mesma peça. O perfil 23 conteve isolados da captação 2, colhidos na mesma data, enquanto o perfil 36 apresentou isolados da captação 1 colhidos com 3 meses de diferença. O perfil 38 reportou isolados colhidos na mesma data mas em locais diferentes. Os perfis 39 e 46 apresentaram isolados planctónicos do mesmo local e da mesma data. Os restantes perfis constituíram-se por um único isolado, e reportaram a diversos locais e datas de colheita, evidenciando, em conjunto com os perfis acima descritos, a diversidade genética da população termal de *P. aeruginosa*, bem como a persistência e disseminação clonal pelo sistema e ainda a múltipla colonização, sobretudo dos equipamentos termais.

Analisando as relações de similaridade entre os isolados foi possível observar 3 grupos principais, com uma percentagem de similaridade de cerca de 60%, assinalados no dendrograma pelos números I, II e III. Excluindo os 3 isolados de biofilmes contidos no perfil 51, é interessante verificar que todos os isolados de biofilmes se encontram nos grupos I e II. O grupo III contém a maioria dos isolados planctónicos. Subdividindo este grupo a cerca de 52% de similaridade, obtêm-se dois sub-grupos, identificados no dendrograma pelas siglas i e ii. O sub-grupo i contém apenas isolados planctónicos colhidos em 2006, enquanto o sub-grupo ii contém isolados planctónicos, e de biofilme, colhidos entre 2006 e 2009, além do perfil de PFGE 51, com maior número de isolados, sendo o sub-grupo mais heterogéneo da amostra termal.

Comparativamente aos resultados obtidos na tipagem por RAPD, importa reter que não se verificou qualquer associação da captação 1 com outros locais, situação distinta daquela observada por RAPD. Na análise por PFGE, foram poucos os isolados de biofilmes que se agruparam com isolados planctónicos, tendo-se tal observado apenas no perfil 51. Contudo, o isolado F14, da captação 1, localizou-se no dendrograma entre os grupos I e II, constituídos sobretudo por isolados de biofilmes, sugerindo alguma relação com estes isolados. Este isolado foi também tipado por RAPD, tendo-se agrupado no perfil A de RAPD com isolados de biofilmes. Outros 10 dos 77 isolados tipados por PFGE foram também tipados por RAPD (assinalados na tabela com \*), 6 pertencendo ao perfil A de RAPD, 2 ao perfil F, 1 ao perfil B e outro ao perfil D. 5 dos 6 isolados tipados com o perfil A de RAPD encontraram-se no grupo III: 1 no sub-grupo i e os restantes 4 no sub-grupo ii (2 no perfil 51). Os isolados com os perfis F e B de RAPD inseriram-se no grupo II de PFGE e o isolado com perfil D de RAPD situou-se no sub-grupo ii do grupo III do dendrograma de PFGE. Estes resultados evidenciam uma concordância geral ao nível de similaridade de cerca de 60% entre o observado por RAPD e por PFGE, demonstrando o maior poder discriminatório da técnica de PFGE face à técnica de RAPD.

## 1.2. Amostra clínica

A amostra clínica inicial de *P. aeruginosa* utilizada neste estudo foi obtida a partir de amostras de produtos biológicos colhidos num hospital central da zona centro do país, constituído por um edifício central, uma maternidade, um hospital pediátrico e ainda por um segundo hospital, localizado a cerca de 30 km do edifício central. Todos os isolados clínicos de *P. aeruginosa* obtidos nestas unidades hospitalares foram cedidos à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e incluídos na coleção de cultura de *P. aeruginosa* aí existente.

Para o presente estudo considerou-se como amostra clínica os isolados dessa coleção de cultura, pertencentes ao hospital central acima indicado, recolhidos no ano de 2009.

### 1.2.1. Prevalência e distribuição dos isolados clínicos

Em 2009 foram obtidos 454 isolados de *P. aeruginosa* com origem em diversos produtos biológicos (figura 14). Estes isolados foram recolhidos de diversos serviços de cada uma das unidades hospitalares, contudo, atendendo aos objetivos do presente estudo, a prevalência de *P. aeruginosa* em função dos serviços hospitalares não é relevante e por isso, não é apresentada.

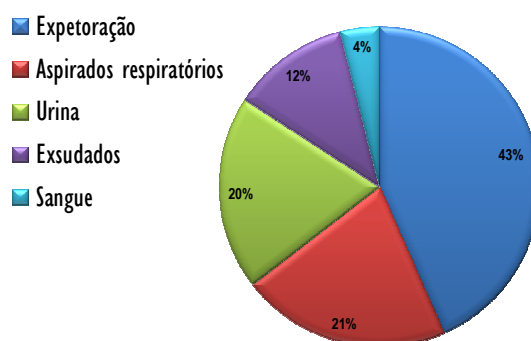
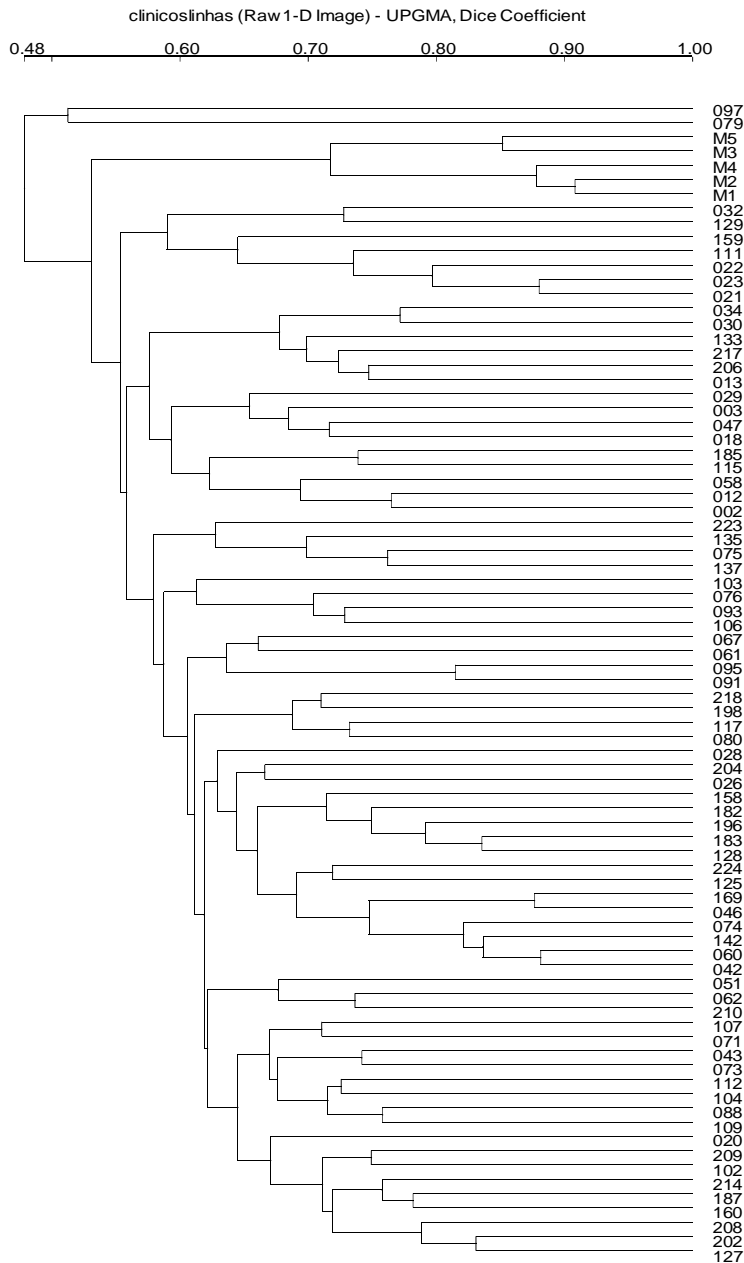


Figura 14 – Proporção percentual da distribuição de *P. aeruginosa* em função dos produtos biológicos de colheita.

### 1.2.2. Diversidade genética da população clínica

Desta amostra inicial foram selecionados, por amostragem aleatória estratificada com alocação proporcional segundo o tipo de isolado, 76 isolados (17% da amostra total inicial). Esta seleção foi sujeita a PFGE e a figura 15 apresenta o dendrograma resultante do método UPGMA aplicado aos eletroforegramas obtidos.



**Figura 15** – Dendrograma formado a partir da análise automática dos padrões eletroforéticos obtidos através de PFGE nos 76 isolados clínicos de *P. aeruginosa* selecionados. M1 a M5 correspondem aos eletroforegramas do padrão utilizado para calibrar os diferentes géis para a análise.

O “cut-off” para a determinação dos perfis de PFGE foi definido ao nível mais baixo de similaridade obtido para os eletroforegramas dos padrões de ADN de cada gel, a cerca de 72% segundo a escala representada na figura 15. A tabela 11 discrimina os isolados contidos em cada perfil.

**Tabela 11** – Identificação, data de colheita e perfil de PFGE dos 76 isolados clínicos de *P. aeruginosa* selecionados.

<b>Có-digo</b>	<b>Tipo</b>	<b>Serviço de origem</b>	<b>Data da colheita</b>	<b>Perfil de PFGE</b>	<b>Có-digo</b>	<b>Tipo</b>	<b>Serviço de origem</b>	<b>Data da colheita</b>	<b>Perfil de PFGE</b>
097	Asp	C.Externa	17-06-09	<b>1</b>	117	Exsu	Gastroenter.	22-07-09	<b>26</b>
079	Asp	Medicina	13-05-09	<b>2</b>	080	Exp	C. Externa	13-05-09	<b>26</b>
032	Exsu	H. Ped. – UCI	18-03-09	<b>3</b>	005	Exsu	Medicina	18-03-09	<b>27</b>
129	Exp	Neurologia	09-09-09	<b>3</b>	204	Exp	Infeciosas	05-11-09	<b>28</b>
159	Exp	Urgência	09-09-09	<b>4</b>	026	Uri	Hospital 2	18-03-09	<b>29</b>
111	Exp	Neurologia	14-07-09	<b>5</b>	158	Asp	UCI	09-09-09	<b>30</b>
022	Exp	Neurologia	18-03-09	<b>5</b>	182	Exp	Pneumologia	15-10-09	<b>31</b>
023	Exp	Neurologia	18-03-09	<b>5</b>	196	Exp	Pneumologia	15-10-09	<b>31</b>
021	Exp	Neurologia	18-03-09	<b>5</b>	183	Exp	Pneumologia	15-10-09	<b>31</b>
034	Sang	Neurologia	18-03-09	<b>6</b>	128	Exp	Pneumologia	09-09-09	<b>31</b>
030	Exp	Neurologia	18-03-09	<b>6</b>	224	Exp	Hospital 2	12-11-09	<b>32</b>
133	Exp	Neurologia	09-09-09	<b>7</b>	125	Asp	UCI	28-07-09	<b>32</b>
217	Exsu	Urgência	05-11-09	<b>8</b>	169	Uri	Urgência	07-10-09	<b>33</b>
206	Exsu	Nefrologia	12-11-09	<b>8</b>	046	Uri	Infeciosas	14-04-09	<b>33</b>
013	Exp	Neurologia	18-03-09	<b>8</b>	074	Uri	Urgência	14-04-09	<b>33</b>
029	Exp	Neurologia	18-03-09	<b>9</b>	142	Exp	Neurologia	09-09-09	<b>33</b>
003	Asp	UCI	18-03-09	<b>10</b>	060	Exsu	Obstetrícia	23-04-09	<b>33</b>
047	Exsu	Cirurgia	14-04-09	<b>11</b>	042	Uri	Urgência	18-03-09	<b>33</b>
018	Sang	UCI	18-03-09	<b>11</b>	051	Exp	Pneumologia	14-04-09	<b>34</b>
185	Exsu	H. Ped. – Cir.	15-10-09	<b>12</b>	062	Exp	Neurocirurgia	13-05-09	<b>35</b>
115	Exp	Pneumologia	22-07-09	<b>12</b>	210	Uri	Hospital 2	12-11-09	<b>35</b>
058	Asp	Neurocirurgia	14-04-09	<b>13</b>	107	Exp	Medicina	14-07-09	<b>36</b>
012	Exp	Neurologia	18-03-09	<b>14</b>	071	Exp	Hospital 2	07-04-09	<b>37</b>
002	Exp	Neurologia	18-03-09	<b>14</b>	043	Asp	UCI	18-03-09	<b>38</b>
223	Exp	Infeciosas	12-11-09	<b>15</b>	073	Uri	Urgência	14-04-09	<b>38</b>
135	Asp	UCI	09-09-09	<b>16</b>	112	Uri	Medicina	14-07-09	<b>39</b>
075	Uri	Urgência	14-04-09	<b>17</b>	104	Asp	Pneumologia	02-07-09	<b>39</b>
137	Asp	Hospital 2	09-09-09	<b>17</b>	088	Uri	Hospital 2	27-05-09	<b>40</b>
103	Exp	Neurocirurgia	02-07-09	<b>18</b>	109	Asp	Hospital Dia	14-07-09	<b>40</b>
076	Exp	Medicina	14-04-09	<b>19</b>	020	Uri	Medicina	18-03-09	<b>41</b>
093	Uri	Neurocirurgia	17-06-09	<b>20</b>	209	Exp	Pneumologia	12-11-09	<b>42</b>
106	Exsu	H. Ped. – UCI	14-07-09	<b>20</b>	102	Sang	H.Ped. – Med.	02-07-09	<b>42</b>
067	Asp	Medicina	13-05-09	<b>21</b>	214	Exp	Neurocirurgia	12-11-09	<b>43</b>
061	Exp	Neurologia	23-04-09	<b>22</b>	187	Uri	Pneumologia	15-10-09	<b>43</b>
095	Asp	Medicina	17-06-09	<b>23</b>	160	Exp	Neurocirurgia	09-09-09	<b>43</b>
091	Asp	Medicina	27-05-09	<b>23</b>	208	Uri	Urgência	12-11-09	<b>44</b>
218	Asp	Infeciosas	05-11-09	<b>24</b>	202	Uri	Urgência	29-10-09	<b>44</b>
198	Asp	Medicina	29-10-09	<b>25</b>	127	Exp	Infeciosas	09-09-09	<b>44</b>

Asp – aspirado; C. Externa – consulta externa; Exsu – exsudado; H. Ped. – Hospital Pediátrico; UCI – unidade de cuidados intensivos; Exp – expetoração; Sang – sangue; Cir. – cirurgia; Uri – urina; Gastroenter. – gastroenterologia; Med. - medicina

A amostra de isolados clínicos foi dividida em 44 genótipos, 39 contendo isolados de produtos associados a infecções respiratórias (24 de expetoração e 15 de aspirados respiratórios). O perfil de PFGE com maior número de isolados foi o 33, contendo 6 isolados de diversos produtos biológicos, serviços hospitalares e datas de isolamento. Os perfis 5 e 33 apresentaram 4 isolados cada. O perfil 5 apresentou apenas isolados de expetoração obtidos no serviço de Neurologia em março e setembro de 2009. O perfil 33 conteve também apenas isolados de expetoração, mas do serviço de Pneumologia, colhidos em setembro e outubro de 2009. Os perfis 8, 43 e 44 apresentaram 3 isolados cada, de diferentes serviços e datas de colheita. Quinze perfis de PFGE apresentaram apenas 2 isolados, também de serviços e datas diferentes (exceto 3 perfis, 2 do mesmo local e data e 1 do mesmo local e de datas diferentes) e 23 perfis foram representados por apenas 1 isolado. Estes resultados evidenciam uma elevada diversidade genética na



---

## RESULTADOS

população clínica mas também a persistência clonal em alguns serviços (perfis 8, 23, 31 e 43) bem como a disseminação clonal por diferentes serviços do mesmo hospital (perfis 8, 11, 26, 33, 38, 39, 43 e 44) e por diferentes unidades hospitalares (perfis 3, 12, 17, 20, 32, 35, 40, 42). A presença múltipla de diferentes clones no mesmo serviço hospitalar foi observada na maioria dos serviços amostrados do bloco principal do hospital: Medicina (perfis 2 e 21 e perfis 27 e 41), Neurologia (perfis 5, 6, 8, 9 e 14 e perfis 3, 7 e 33), UCI (perfis 10 e 38 e perfis 16 e 30), Pneumologia (perfis 31 e 43), Infeciosas (perfis 2 e 28). No hospital 2 o mesmo foi observado (perfis 32 e 35). Os serviços do Hospital Pediátrico não apresentaram múltipla colonização. O serviço de Neurocirurgia também não evidenciou múltipla colonização, bem como a Urgência e Consulta Externa, sendo que estes dois últimos serviços foram provavelmente representados por isolados de origem comunitária e não nosocomial. Os serviços de Gastroenterologia, Obstetrícia e Hospital de Dia foram representados por apenas 1 isolado, pelo que não foi possível qualquer interpretação quanto à possível colonização múltipla de diferentes clones de *P. aeruginosa* nesses serviços.

## 2. Fatores de virulência

Vários fatores de virulência foram pesquisados nas duas amostras em estudo e os resultados comparados e interpretados estatisticamente. Por questões de simplificação, a produção de biofilmes será tratada como um fator de virulência, ainda que não o seja na realidade (ponto 1.3.1.3. do capítulo I).

### 2.1. Seleção das amostras para estudo

Para evitar a sobre-representação de clones nas amostras a estudar (Feltman *et al.*, 2001), foi apenas incluído 1 isolado representativo de cada perfil de PFGE. Na amostra termal a seleção foi aleatória enquanto na amostra clínica foi enviesada de modo a selecionar em cada genótipo um isolado de infecções respiratórias, excluindo os genótipos não representados por isolados de infecções respiratórias.

A amostra não clonal de *P. aeruginosa* de origem termal foi constituída por 51 isolados: 27 de origem planctônica e 24 de biofilmes (15 do nebulizador coletivo, 9 do aerossol manossônico e nenhum do aerossol sônico). Dos 44 genótipos observados na amostra clínica retiveram-se apenas 39 isolados: 24 pertenciam a amostras de expetoração e 15 a amostras de aspirados respiratórios.

### 2.2. Fenótipos associados à virulência

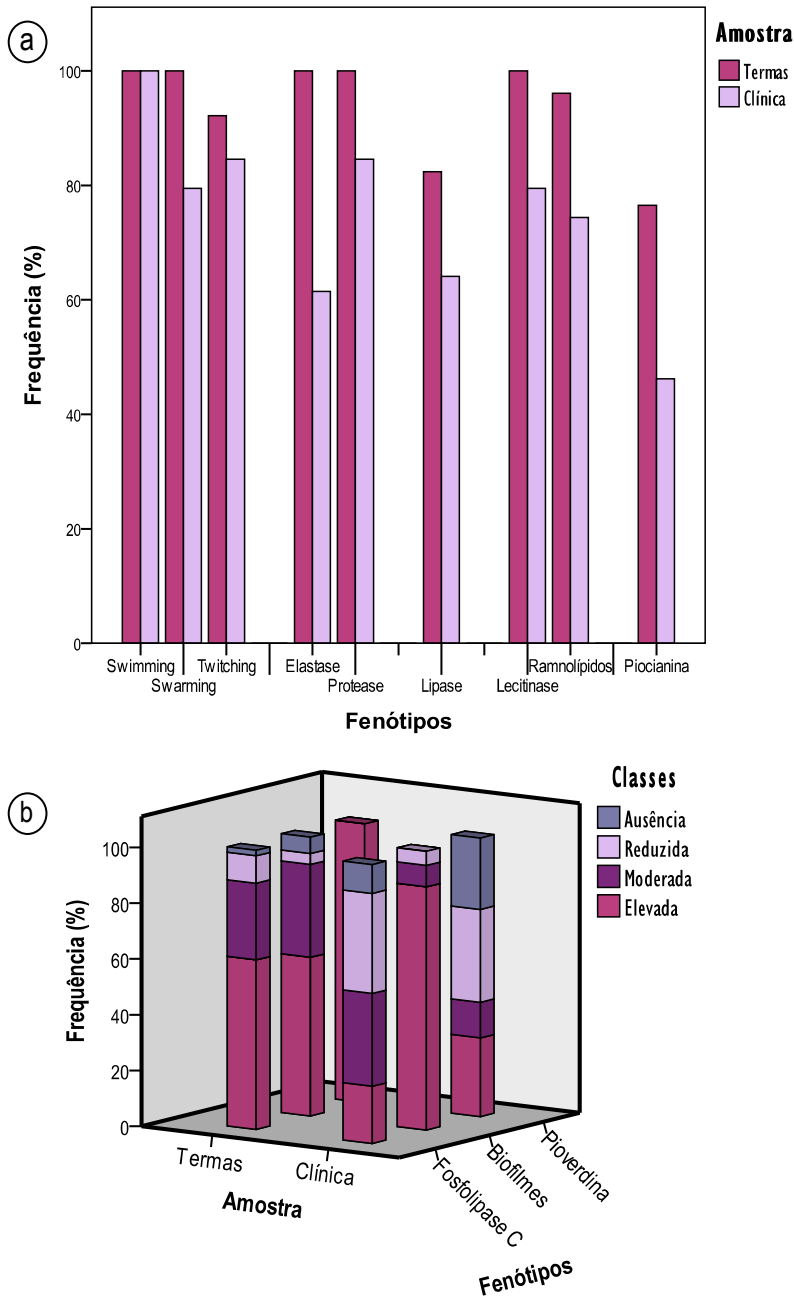
Foi feita a pesquisa fenotípica simples de 9 características associadas à virulência, com os resultados expressos na forma nominal (modalidades presente/ausente): “swimming”, “swarming”, “twitching”, elastase, protease, lipase, lecitinase, ramnolípidos e piocianina; e a pesquisa semi-quantitativa de 3 fenótipos associados à virulência, com os resultados expressos na forma ordinal, agrupados em 4 categorias (produção ausente, baixa, moderada ou elevada): fosfolipase C, formação de biofilmes e pioverdina.

#### 2.2.1. Distribuição e prevalência

##### 2.2.1.1. Entre amostras e entre populações

Todos os fenótipos de virulência estudados foram observados em ambas as amostras. A figura 16 apresenta, comparativamente, os resultados obtidos.





**Figura 16** – Frequência relativa (%) dos fenótipos de virulência (a – nominais; b – ordinais) nas duas amostras de *P. aeruginosa*.

Os fenótipos expressos em dados nominais apresentaram-se em maior percentagem na amostra termal, exceto “swimming”, presente em todos os isolados (figura 16a). Os 3 fenótipos ordinais também apresentaram maior percentagem da classe “produção elevada” nas termas, exceto nos biofilmes (figura 16b). Com base no teste do qui-quadrado de homogeneidade foi possível validar estatisticamente a heterogeneidade da distribuição dos fatores de virulência ordinais nas duas populações, conforme consta na tabela 12, onde se assinalam também as classes que mais contribuíram para essa diferença.

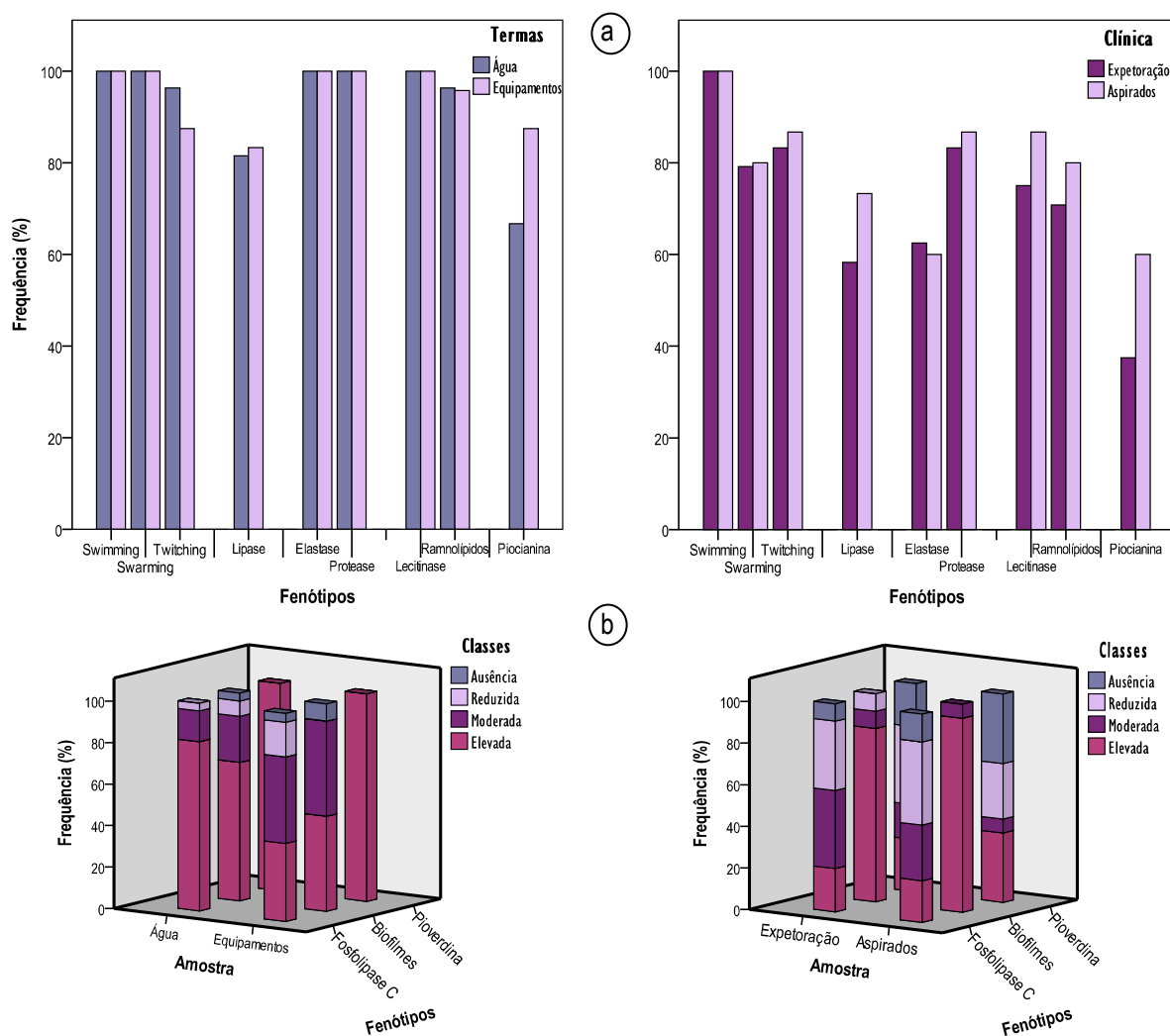
**Tabela 12** – P-valor dos testes do qui-quadrado que demonstraram uma distribuição heterogênea estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) dos fenótipos de virulência nas duas populações de *P. aeruginosa*.

Fenótipos de virulência (dados nominais)									
	Swimming	Swarming	Twitching	Elastase	Protease	Lipase	Lecitinase	Ramnolíp.	Piocianina
<b>P-valor</b>	---	0,001	<sup>a</sup>	<0,001	0,005	0,017	0,001	0,001	0,004
<b>Prevalência</b>	---	Termas	<sup>a</sup>	Termas	Termas	Termas	Termas	Termas	Termas
Fenótipos de virulência (dados ordinais)									
	Fosfolipase C			Biofilmes			Pioverdina		
<b>P-valor</b>	<0,001			0,008			<0,001		
<b>Prevalência</b>	Termas – produção elevada			Termas – produção moderada			Termas – produção elevada		

Ramnolíp. – ramnolípido; <sup>a</sup> – distribuição homogênea do fenótipo nas duas populações ( $p > 0,05$ ).

### 2.2.1.2. Intra-amostras e intra-populações

A distribuição dos fenótipos de virulência pelos diferentes tipos de isolados em cada amostra não apresentou diferenças expressivas, à exceção da piocianina em ambas as amostras, da lipase na amostra clínica e da produção de fosfolipase C e biofilmes na amostra termal (figura 17).



**Figura 17** – Frequência relativa (%) dos fenótipos de virulência (a – nominais; b – ordinais) nas duas subamostras de isolados termais (esquerda) e clínicos (direita) de *P. aeruginosa*.



---

## RESULTADOS

Os testes de independência realizados entre os fenótipos de virulência e os tipos de isolados, revelaram não haver associações estatisticamente significativas ( $p > 0,05$ ) entre a presença (ou produção) de cada fenótipo e o tipo de isolado, planctônico ou de biofilmes, na amostra termal, e expectoração ou aspirados respiratórios, na amostra clínica, exceto para a produção de fosfolipase C na amostra termal ( $p = 0,014$ ), com prevalência da produção elevada de fosfolipase C nos isolados planctônicos em relação aos isolados de biofilmes. Para os restantes fenótipos, incluindo os que graficamente apresentaram maiores diferenças na distribuição pelos diferentes tipos de isolados, os valores de prova foram superiores a 0,05 ( $p = 0,080$  e  $p = 0,170$  para a amostra termal e clínica, respetivamente, quanto à produção de piocianina;  $p = 0,231$  para a amostra clínica quanto à produção de lipase;  $p = 0,149$  para a amostra termal quanto à produção de biofilmes) demonstrando a independência da ocorrência desses fenótipos em relação ao tipo de isolados.

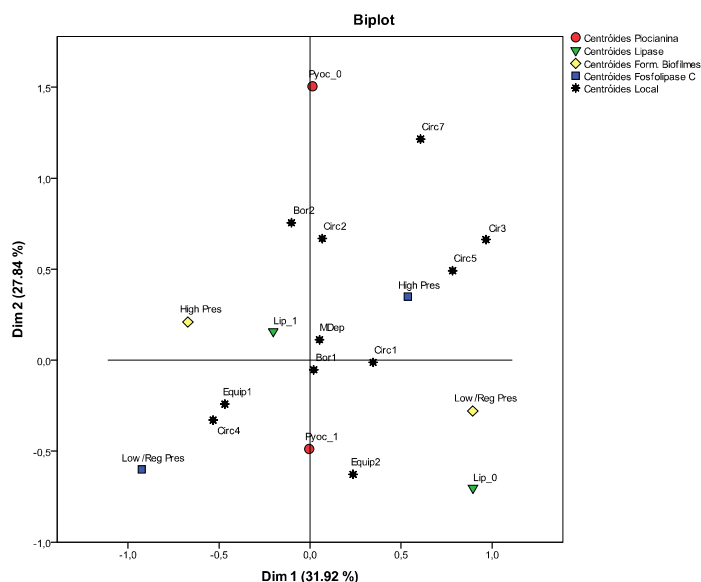
## 2.2.2. Relações globais entre os fenótipos de virulência

Para analisar as relações dos fenótipos de virulência num todo e não apenas dois a dois, procedeu-se a uma análise de correspondências múltiplas. As conclusões obtidas com esta técnica descritiva foram validadas e inferidas para as respetivas populações através de testes do qui-quadrado de independência, interpretados ao nível de significância de 5%. A intensidade e o sentido das associações encontradas foram avaliados através do coeficiente Phi.

### 2.2.2.1. Amostra termal e inferência para a população termal

A figura 18 representa o mapa perceptual resultante da ACM realizada apenas com os fenótipos que cumpriam o requisito definido por Le Roux e Rouanet (2004). Foram consideradas duas dimensões, que permitiram explicar 59,76% da variância total. Representaram-se ainda como variáveis suplementares os locais de origem dos isolados para detetar possíveis relações destes com os fenótipos neles presentes.

Os testes do qui-quadrado de independência efetuados demonstraram a inexistência de relações de dependência ( $p > 0,05$ ) dos fenótipos entre si ou com os locais de origem no sistema, em concordância com o observado na figura.



**Figura 18** – Mapa perceptual da ACM dos fenótipos de virulência da amostra termal de *P. aeruginosa*. “x”\_0 – ausência do fenótipo “x”; “x”\_1 – presença do fenótipo “x”; Abs/LowPres – ausência ou baixa produção do fenótipo; RegPres – produção moderada do fenótipo; HighPres – produção elevada do fenótipo; Bor1 – captação 1; Bor2 – captação 2; MDep – depósito principal; Circ1 – circuito irrigação nasal/aerossol; Circ2 – circuito hidromassagem; Circ3 – circuito duche faríngeo; Circ4 – circuito duche de Vichy; Circ5 – circuito de ingestão (hidropnia); Circ6 – circuito principal piscina terapêutica; Circ7 – circuito secundário piscina terapêutica; Equip1 – equipamento de nebulizador coletivo; Equip2 – equipamento de aerossol manossónico.



## RESULTADOS

Apenas a piocianina revelou alguma tendência para se relacionar com a localização ( $p=0,088$ ). A proximidade do centróide de Pyoc\_1 (presença de piocianina) com o do equipamento 2 no mapa sugere uma maior tendência para se encontrarem isolados produtores de piocianina neste local. Analisando o mapa percentual, a produção elevada de fosfolipase C parece relacionar-se com os circuitos 3 e 5 e a ausência ou baixa produção com o circuito 4 e o equipamento 1. Contudo, também não se verificou significância estatística desta relação, provavelmente devido ao número reduzido de observações, quer das modalidades do fenótipo, quer dos locais no sistema.

### 2.2.2.2. Amostra clínica e inferência para a população clínica

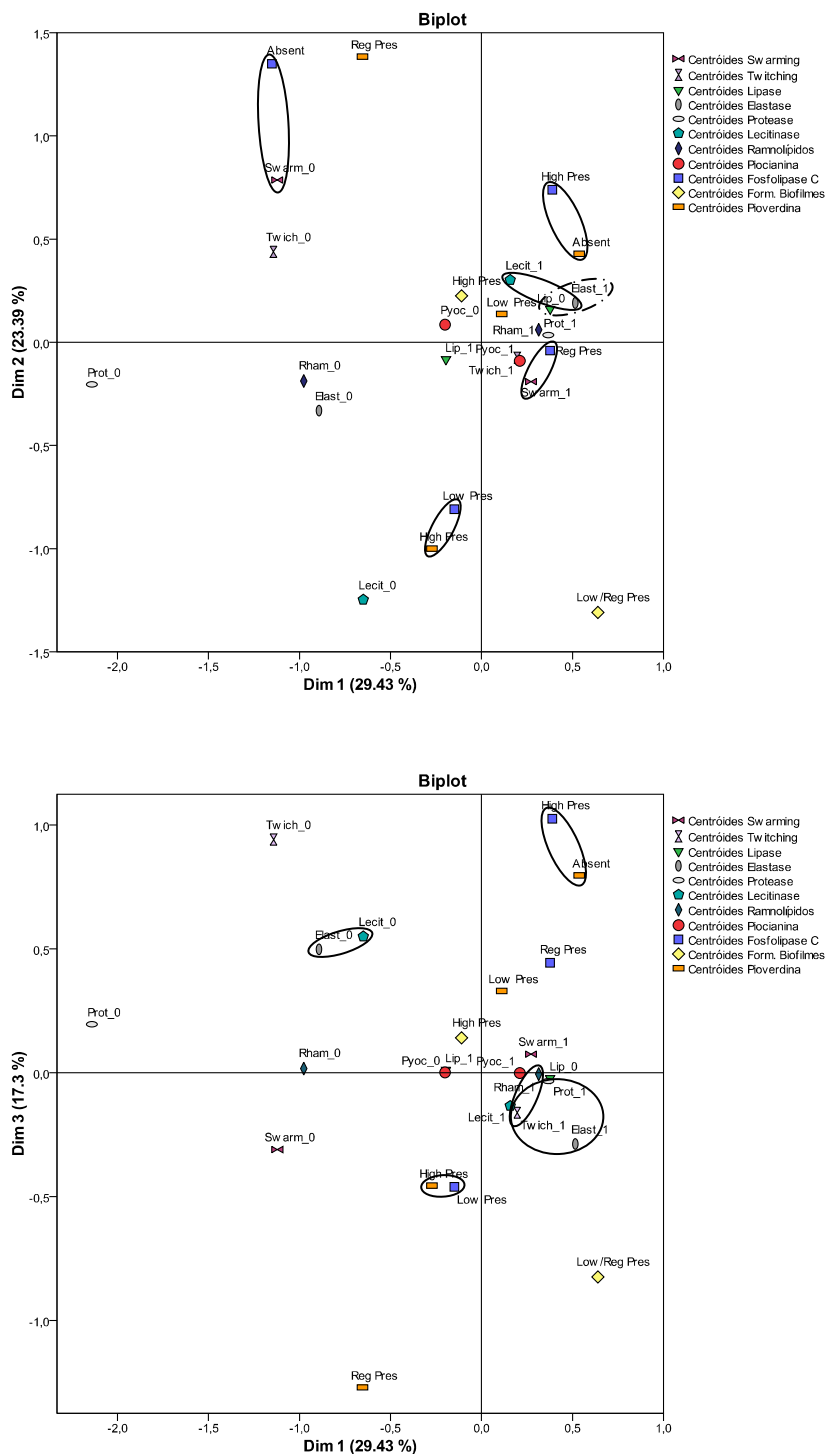
Idêntica estratégia de análise foi adotada para a amostra clínica, para fins comparativos. Foram retidas três dimensões, que permitiram explicar 70,12% da variância. A figura 19 representa os mapas percentuais mais relevantes resultantes da ACM realizada com todos os fenótipos, exceto “swimming” (Le Roux e Rouanet, 2004).

Os testes do qui-quadrado de independência validaram algumas relações de dependência ( $p<0,05$ ) dos fenótipos entre si (tabela 13), representadas na figura 19 por círculos. A elastase e a protease foram os fenótipos com maior número de associações. A elastase associou-se apenas com outras enzimas, enquanto a protease se associou a fenótipos de mobilidade e adesão. Os restantes fenótipos apresentaram poucas associações entre si, para além das que envolveram a protease ou a elastase.

**Tabela 13** – P-valor dos testes do qui-quadrado de independência que demonstraram associações estatisticamente significativas ( $p<0,05$ ) entre os fenótipos de virulência e respetivos valores do coeficiente Phi, na população clínica de *P. aeruginosa*.

		Twitch	Elast	Prot	Lipase	Lecitin	Ramno	Piocian	FosfoC	Biofilm	Pioverd
Swarm	p			0,002 <sup>a</sup>					0,030		
	Phi			0,487 <sup>a</sup>					0,478		
Twitch	p	---		0,011			0,012				
	Phi	---		0,409			0,401				
Elast	p	---	---	0,001	0,011	0,001					
	Phi	---	---	0,539	-0,408	0,512					
Prot	p	---	---	---							
	Phi	---	---	---							
Lipase	p	---	---	---	---						
	Phi	---	---	---	---						
Lecitin	p	---	---	---	---	---					
	Phi	---	---	---	---	---					
Ramno	p	---	---	---	---	---	---				
	Phi	---	---	---	---	---	---				
Piocian	p	---	---	---	---	---	---	---			
	Phi	---	---	---	---	---	---	---			
FosfoC	p	---	---	---	---	---	---	---	---		0,001
	Phi	---	---	---	---	---	---	---	---		0,829
Biofilm	p	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	Phi	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
Legenda das cores usadas		associação negativa			associação forte ( $ Phi >0,4$ )			$p$ próximo da significância estatística			

Twitch – twitching; Elast – elastase; Prot – protease; Lecitin – lecitinase; Ramno – ramnolípido; Piocian – piocianina; FosfoC – fosfolipase C; Biofilm – formação de biofilmes; Pioverdina – pioverdina; Swarm – swarming; <sup>a</sup> – associação não representada nos mapas percentuais da ACM.



**Figura 19** – Mapas perceptuais da ACM dos fenótipos de virulência da amostra clínica de *P. aeruginosa* (a – plano definido pelas dimensões 1 e 2; b – plano definido pelas dimensões 1 e 3). Os círculos destacam as relações entre modalidades correspondentes às variáveis que revelaram associação estatisticamente significativa ao nível de significância de 5%. Os círculos traçados a linha contínua assinalam associações fortes ( $|Pij|>0,4$ ) e o círculo a linha tracejada assinala a única associação negativa observada. “x”<sub>0</sub> – ausência do fenótipo “x”; “x”<sub>1</sub> – presença do fenótipo “x”; Absent – ausência do fenótipo; AbsLowPres – ausência ou produção reduzida do fenótipo; RegPres – produção moderada do fenótipo; HighPres – produção elevada do fenótipo.



A representação de grande parte das modalidades junto à origem nos mapas percetuais limita as interpretações, mas da análise conjunta da tabela 13 com a figura 19, é possível verificar que a associação observada entre a produção de pioverdina e de fosfolipase C se deve provavelmente à relação estreita entre a ausência de produção de pioverdina e a produção elevada de fosfolipase C e vice-versa. Idêntica conclusão é possível tirar quanto à associação deste fenótipo com “swarming”, estando a produção moderada de fosfolipase C relacionada com a presença de “swarming” e a ausência de fosfolipase C com a ausência desse movimento. Quanto às modalidades representadas longe da origem, também algumas apresentaram os seus centróides próximos de outros centróides relativos a fenótipos com os quais a variável não apresentou associação (tabela 13, figura 19). A dimensão reduzida da amostra clínica poderá ser a principal causa destes efeitos. Independentemente deste problema, esta representação gráfica permitiu observar que todas as associações se deram num sentido positivo (produção de um fenótipo associada à produção de outros fenótipos), exceto a associação entre a elastase e a lipase.

## 2.3. Genes associados à virulência

Em ambas as amostras foi feita a pesquisa por PCR de 19 genes, operões ou orfs associados a diferentes características de virulência, sendo os resultados expressos na forma nominal (modalidades presente/ausente): *flaG*, *orfF*, *pilA*, *pilB*, *lecA*, *lecB*, *phzH*, *phzM*, *phzS*, *phzI*, *phzII*, *apr*, *lasA*, *lasB*, *exoA*, *exoS*, *exoT*, *exoU*, *exoY*. Por questões de simplificação, utilizar-se-á apenas o termo gene para os identificar.

### 2.3.1. Distribuição e prevalência

#### 2.3.1.1. Entre amostras e entre populações

Todos os genes foram observados nas duas amostras, exceto *flaG* na amostra clínica. A figura 20 apresenta as frequências relativas correspondentes.

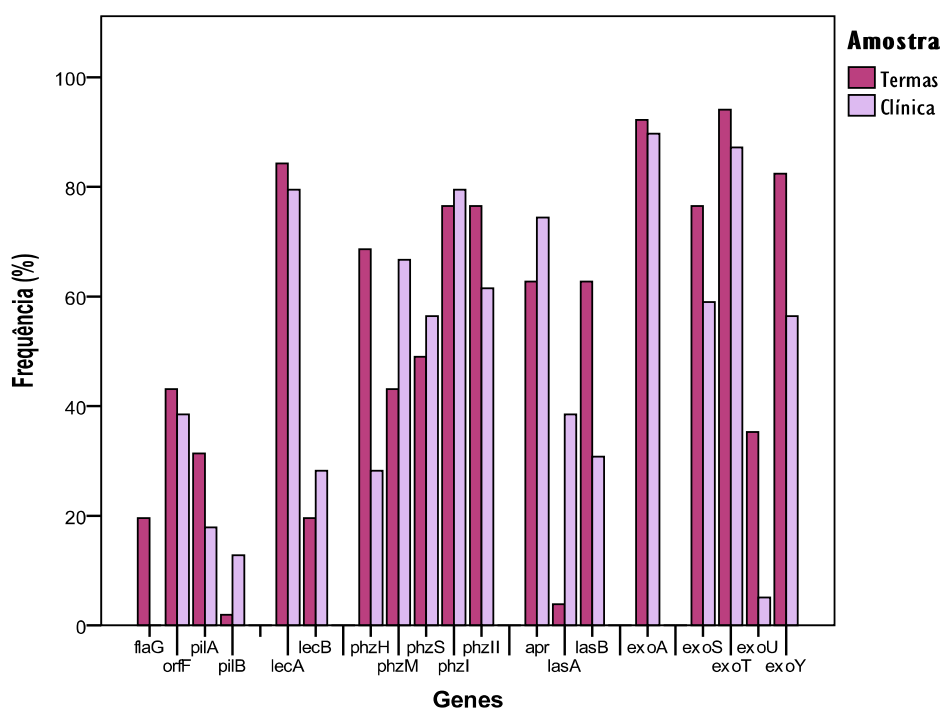


Figura 20 – Frequência relativa (%) dos genes associados a virulência nas duas amostras de *P. aeruginosa*.

Confirmando o observado na figura, os testes do qui-quadrado de homogeneidade validaram estatisticamente a homogeneidade da distribuição da maioria dos genes (cerca de 2/3) nas duas populações. Apenas 7 genes apresentaram uma distribuição heterogênea nas populações (tabela 14), sendo a maioria prevalentes na população termal, exceto os genes *phzM* e *lasA*.





RESULTADOS

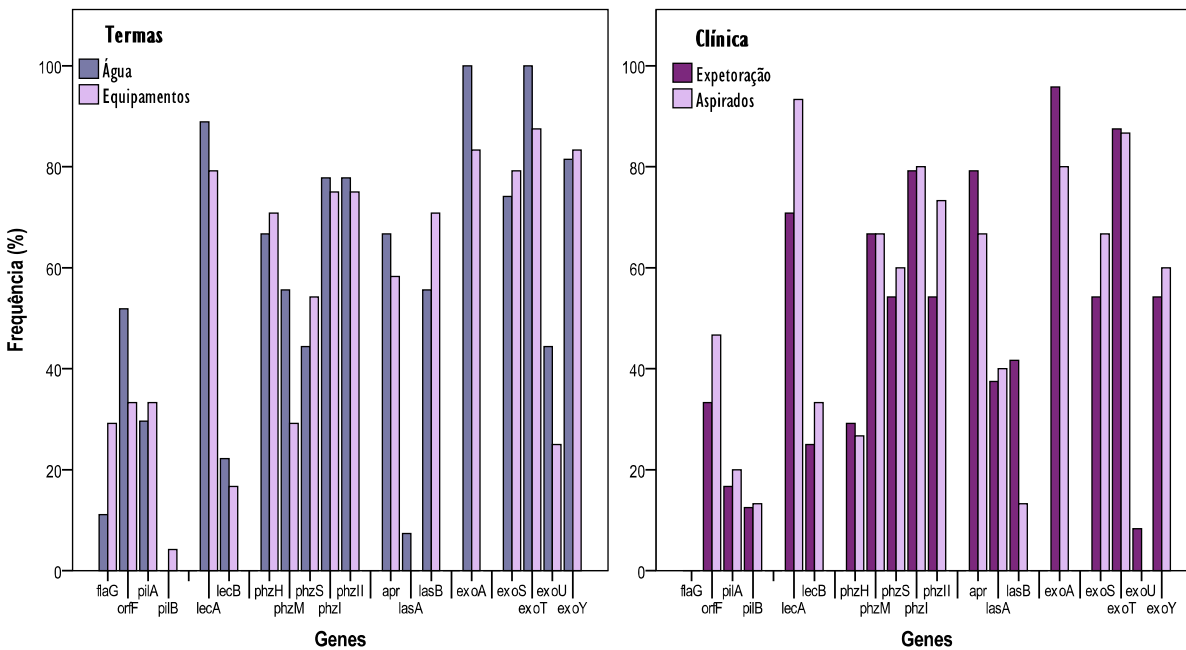
**Tabela 14** – P-valor dos testes do qui-quadrado que demonstraram uma distribuição heterogênea estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) dos genes associados a virulência nas duas populações de *P. aeruginosa*.

	<i>flaG</i>	<i>orfF</i>	<i>pilA</i>	<i>pilB</i>	<i>lecA</i>	<i>lecB</i>	<i>phzH</i>	<i>phzM</i>	<i>phzS</i>	<i>phzI</i>
<b>P-valor</b>	0,004	<sup>a</sup>	<sup>a</sup>	<sup>a</sup>	<sup>a</sup>	<sup>a</sup>	<0,0001	0,014	<sup>a</sup>	<sup>a</sup>
<b>Prevalência</b>	Termas			Termas			Clínica			
	<i>phzII</i>	<i>apr</i>	<i>lasA</i>	<i>lasB</i>	<i>exoA</i>	<i>exoS</i>	<i>exoT</i>	<i>exoY</i>	<i>exoU</i>	
<b>P-valor</b>	<sup>a</sup>	<sup>a</sup>	<0,0001	0,003	<sup>a</sup>	<sup>a</sup>	<sup>a</sup>	0,010	0,0001	
<b>Prevalência</b>			Clínica	Termas			Termas	Termas	Termas	

<sup>a</sup> – distribuição homogênea nas duas populações ( $p > 0,05$ ).

**2.3.1.2. Intra-amostras e intra-populações**

A distribuição dos genes associados a virulência quanto ao tipo de isolados em cada amostra revelou algumas diferenças (figura 21).



**Figura 21** – Frequência relativa (%) dos genes associados a virulência nas duas subamostras de isolados termais (esquerda) e clínicos (direita) de *P. aeruginosa*.

Os testes do qui-quadrado de independência demonstraram a ausência de associação entre os genes e o tipo de isolados, nas duas amostras. Apenas o gene *exoA* apresentou uma associação estatisticamente significativa com os isolados planctônicos, na amostra termal ( $p = 0,027$ ). Os resultados do teste para os genes *phzM* e *exoT* nessa amostra ficaram próximos do valor de significância de 5% ( $p = 0,058$  para ambos).

Não foi encontrada nenhuma associação estatisticamente significativa, ao nível de 5%, entre a distribuição dos genes e o tipo de isolados na amostra clínica.

## 2.3.2. Relações globais entre os genes associados à virulência

Para analisar as relações dos genes associados à virulência num todo e não apenas dois a dois, procedeu-se a uma análise de correspondências múltiplas. As conclusões obtidas com esta técnica descritiva foram validadas e inferidas para as respetivas populações através de testes do qui-quadrado de independência, interpretados ao nível de significância de 5%. A intensidade e o sentido das associações encontradas foram avaliados através do coeficiente Phi.

### 2.3.2.1. Amostra termal e inferência para a população termal

A figura 22 apresenta os mapas percutuais mais relevantes obtidos a partir da ACM realizada para a amostra termal, excluindo os genes *pilB*, *lasA*, *exoA*, *exoT* e *exoU* (Le Roux e Rouanet, 2004). Foram retidas três dimensões, que permitiram explicar 63,20% da variância. Representaram-se os locais de origem como variáveis suplementares, para detetar possíveis relações destes com os genes presentes nos isolados.

As associações estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os diversos genes analisados (tabela 15) cujas relações das modalidades eram evidentes no mapa percutual, foram representadas nesses gráficos por círculos a traço cheio ou ponteados, em função da sua intensidade e sentido (coeficiente Phi). Todos os genes, exceto *lecA*, revelaram uma diversidade de associações entre si, dentro e fora do seu grupo.

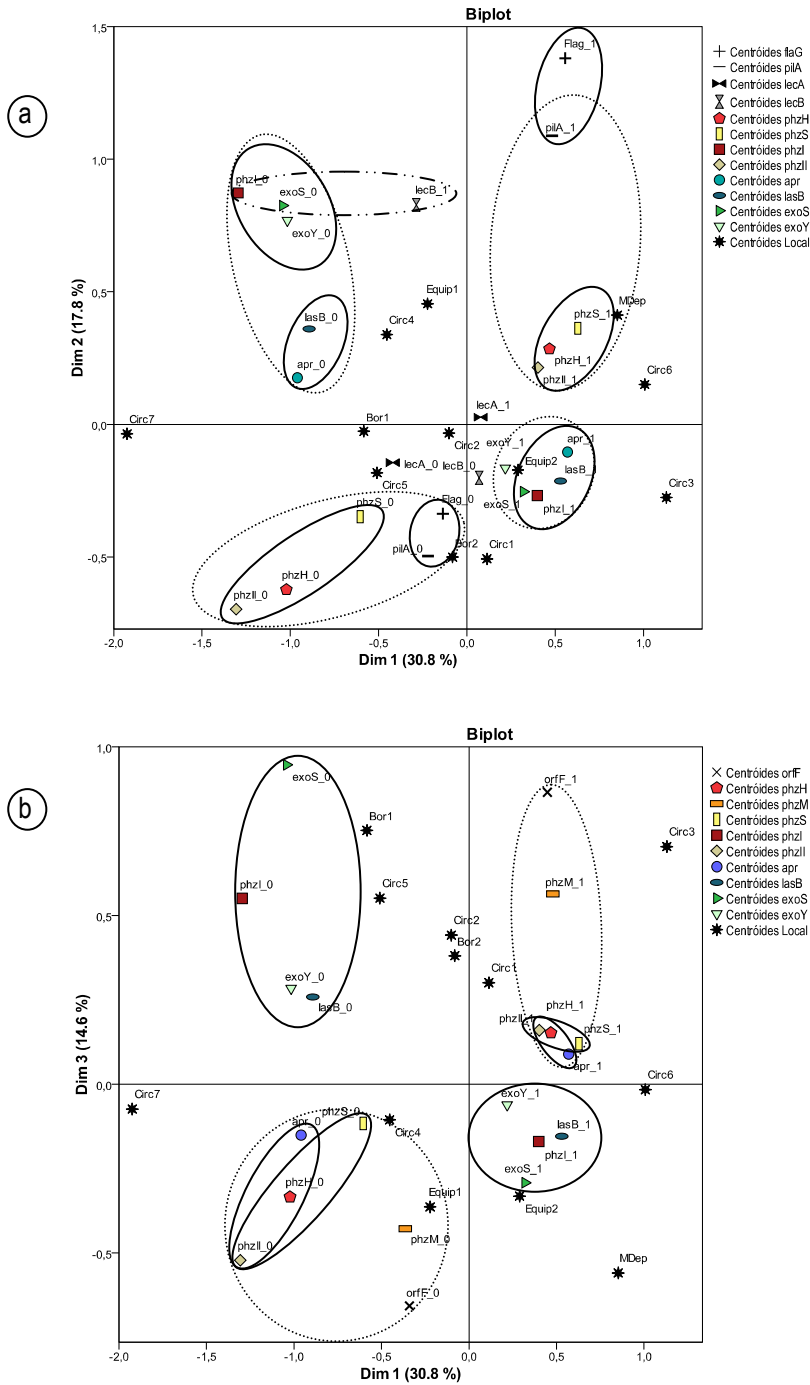
**Tabela 15** – P-valor dos testes do qui-quadrado de independência que demonstraram associações estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os genes associados a virulência e respetivo valor do coeficiente Phi, na população termal de *P. aeruginosa*.

		<i>orfF</i>	<i>pilA</i>	<i>lecA</i>	<i>lecB</i>	<i>phzH</i>	<i>phzM</i>	<i>phzS</i>	<i>phzI</i>	<i>phzII</i>	<i>apr</i>	<i>lasB</i>	<i>exoS</i>	<i>exoY</i>
<i>flaG</i>	P	0,003 <sup>a</sup>	<0,001					0,038						
	Phi	-0,43 <sup>a</sup>	0,730					0,306						
<i>orfF</i>	P					0,031	0,053	0,005 <sup>b</sup>		0,007	0,020			
	Phi					0,333	0,281	0,413 <sup>b</sup>		0,390	0,344			
<i>pilA</i>	P					0,010		0,017		0,010				
	Phi					0,366		0,351		0,375				
<i>lecA</i>	P													
	Phi													
<i>lecB</i>	P								0,042				0,042	
	Phi								-0,308				-0,308	
<i>phzH</i>	P						0,031	0,001		<0,001	0,016 <sup>c</sup>			
	Phi						0,333	0,494		0,721	0,353 <sup>c</sup>			
<i>phzM</i>	P									<0,001	0,003 <sup>b</sup>			
	Phi									0,544	0,425 <sup>b</sup>			
<i>phzS</i>	P									<0,001		0,020 <sup>a</sup>		
	Phi									0,544		0,350 <sup>a</sup>		
<i>phzI</i>	P										<0,001	<0,001	<0,001	0,003
	Phi										0,529	0,624	0,782	0,471
<i>phzII</i>	P										0,003			
	Phi										0,433			
<i>apr</i>	P											<0,001	0,022 <sup>c</sup>	0,062
	Phi											0,581	0,337 <sup>c</sup>	0,282
<i>lasB</i>	P												<0,001	0,062
	Phi												0,529	0,282
<i>exoS</i>	P													0,003
	Phi													0,471
Legenda das cores usadas		associação negativa			associação fraca (0,2< Phi <0,4)			associação forte ( Phi >0,4)			p próximo da significância estatística			

<sup>a</sup> – associação não representada nos mapas percutuais da ACM; <sup>b</sup> – associação “sub-representada” (círculo ponteados) nos mapas percutuais da ACM; <sup>c</sup> – associação “sobre-representada” (círculo contínuo) nos mapas percutuais da ACM (figura 22).



## RESULTADOS



**Figura 22** – Mapas perceptuais da ACM dos genes associados a virulência da amostra termal de *P. aeruginosa* (a – plano definido pelas dimensões 1 e 2; b – plano definido pelas dimensões 1 e 3). Os círculos destacam as relações entre modalidades correspondentes às variáveis que revelaram associação estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ). Os círculos traçados a linha contínua evidenciam as associações fortes ( $|\Phi| > 0,4$ ), os círculos a linha pontilhada as associações fracas ( $0,2 < |\Phi| < 0,4$ ). O círculo a linha tracejada representa a única associação negativa observada nos mapas. “x”\_0 – ausência do “gene x”; “x”\_1 – presença do “gene x”; Bor1 – captação 1; Bor2 – captação 2; MDep – depósito principal; Circ1 – circuito irrigação nasal/aerossol; Circ2 – circuito hidromassagem; Circ3 – circuito duche faríngeo; Circ4 – circuito duche de Vichy; Circ5 – circuito de ingestão (hidropínia); Circ6 – circuito principal piscina terapêutica; Circ7 – circuito secundário piscina terapêutica; Equip1 – equipamento de nebulizador coletivo; Equip2 – equipamento de aerossol manossônico.

Analisando de uma forma integrada a tabela 15 e a figura 22, é possível observar que todas as associações ocorreram num sentido positivo (presença do gene associada à presença de outro gene, ou ausência do gene associada à ausência de outro gene), exceto para *lecB* (figura 22) e entre *flaG* e *orfF* (tabela 15). O grupo dos genes envolvidos na biossíntese de fenazinas foi o que apresentou maior número de associações totais, sobretudo dentro do próprio grupo, à exceção de *phzI*, que se associou apenas com genes fora do seu grupo, sobretudo aqueles pertencentes ao grupo dos genes de proteases e das proteínas efetoras do T3SS (figura 22). Os restantes genes deste grupo, para além das associações internas, também se associaram com outros grupos de genes. As associações com os genes de proteases e das proteínas efetoras do T3SS foram, no geral, todas fortes, e com os genes de mobilidade, *orfF* e *pilA*, fracas (tabela 15). Estes apresentaram sobretudo associações fracas e quase exclusivamente com os genes envolvidos na biossíntese de fenazinas (tabela 15; figura 22). Os 2 genes que codificam as proteínas efetoras do T3SS, *exoS* e *exoY*, associaram-se fortemente entre si e com os genes das proteases e *phzI* (figura 22). Os genes das proteases, *apr* e *lasB*, apresentaram associações fortes entre si e com os genes acima referidos.

Da amostra termal inferiram-se 26 associações positivas, sendo 15 fortes e 11 fracas, e 3 associações negativas, uma forte e duas fracas (tabela 15). Destacam-se ainda 3 p-valores próximos do nível de significância, sugerindo a tendência para associação dos genes respetivos. A maioria destas associações 2x2 obtidas através dos testes do qui-quadrado de independência foram corretamente representadas nos mapas percetuais da ACM, facilitando assim a perceção integrada e simultânea das relações e associações estatisticamente significativas na população.

A posição dos centróides correspondentes aos diversos locais de origem dos isolados sugeriu haver diferenças na distribuição da carga genética associada à virulência dos isolados quanto a esses locais. Contudo, constatou-se que tais relações não eram estatisticamente significativas, talvez devido ao número reduzido de observações por local de origem. Analisando os mapas percetuais, observa-se a tendência dos isolados da captação 2 serem desprovidos dos genes *phzS*, *flaG* e *pilA* (figura 22a), e o equipamento 1 (nebulizador coletivo) e o circuito 4 ausentes de *phzH*, *phzS*, *phzII*, *orfF*, *lecA* e *apr* (figura 22b). O equipamento 2 (aerossol manossónico) relaciona-se com a presença de *phzI*, *phzII*, *exoS*, *exoY*, *lasB* e *apr* (figura 22) e o depósito principal com a presença de *phzH*, *phzS* e *phzII* (figura 22a). Os centróides da captação 1 e circuitos 5 e 7 situam-se nos quadrantes que representam as modalidades de ausência de genes, enquanto os dos circuitos 1, 3 e 6 estão situados no sentido oposto (figura 22), sugerindo possíveis relações com a ausência e presença, respetivamente, de genes associados a virulência. A posição do centróide representativo do circuito 2 é menos clara no que concerne às suas possíveis relações com a carga genética dos isolados que se encontram nesse circuito, dado ser representado próximo da origem (figura 22a) ou equidistante de centróides que representam modalidades de ausência e presença de genes (figura 22b).



### 2.3.2.2. Amostra clínica e inferência para a população clínica

A figura 23 apresenta os mapas perceptuais mais relevantes obtidos a partir da ACM realizada para a amostra clínica, excluindo os genes *flaG*, *exoA* e *exoU* (Le Roux e Rouanet, 2004). Foram retidas três dimensões, que permitiram explicar 65% da variância total.

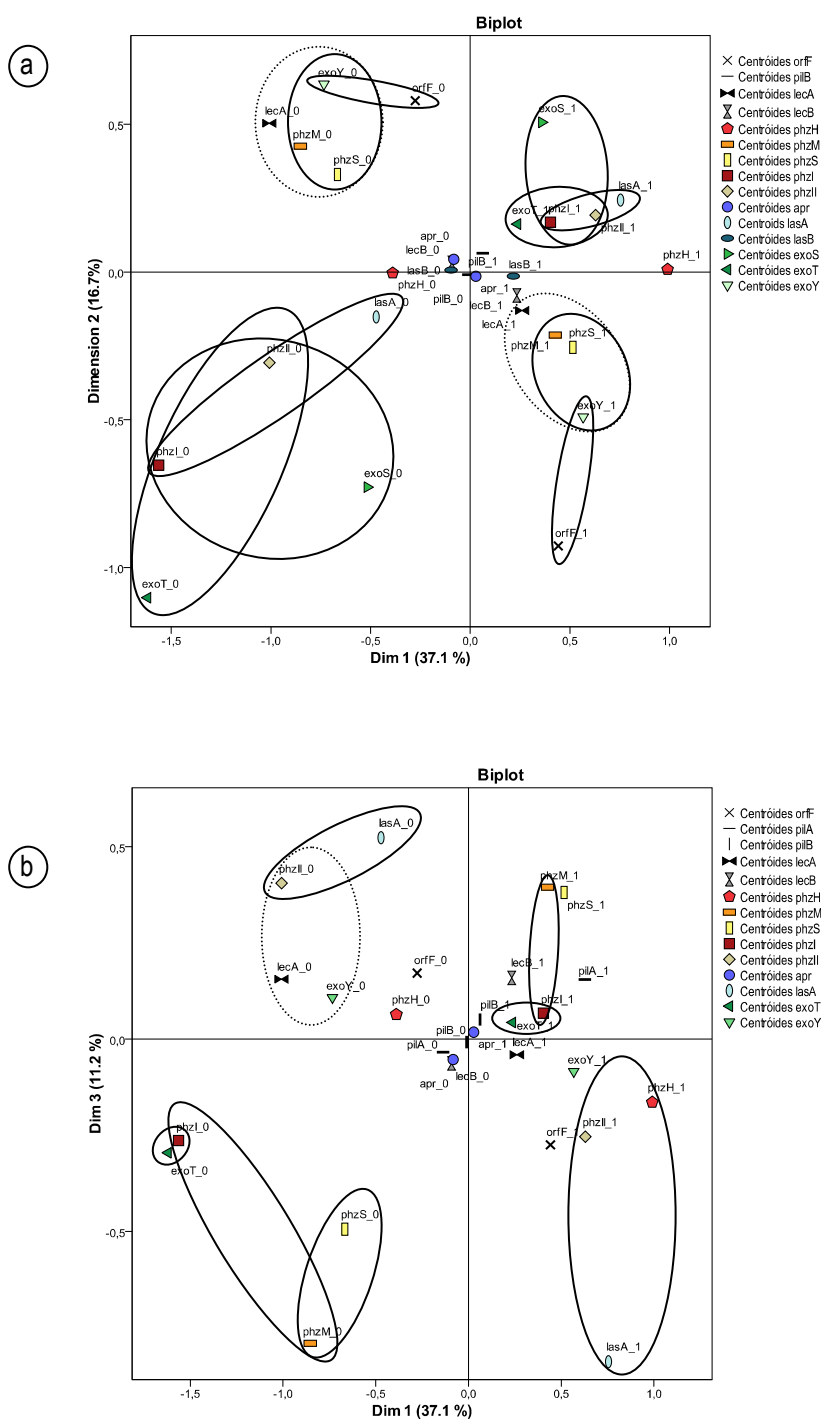
As associações estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os diversos genes (tabela 16) cujas relações das modalidades eram evidentes no mapa perceptual, foram assinaladas nesses gráficos por círculos a traço cheio ou ponteados, em função da sua intensidade e sentido (coeficiente Phi).

Os genes *pilA*, *pilB*, *lecB*, *apr* e *lasB* não apresentaram qualquer associação. *orfF* apresentou apenas uma associação, com *exoY*, bem como *lecA*, com *phzII*. Contudo, para este gene, obtiveram-se 3 valores de prova que seriam estatisticamente significativos ao nível de significância de 10% (para *phzM*, *phzS* e *exoY*), o que demonstra a tendência de *orfF* para se associar a esses genes. Os restantes genes apresentaram duas (*exoT*) a cinco associações (*phzI*, *phzII*), sendo, no geral, todas fortes (coeficiente  $\Phi > 0,4$ ). Destaca-se a associação entre *phzI* e *phzII*, entre *phzI* e *exoY* e entre *phzII* e *lasA*, com valores Phi acima de 0,6, indicando uma associação bastante forte entre estes genes, o que não se verificou na população termal.

**Tabela 16** – P-valor dos testes do qui-quadrado de independência que demonstraram associações estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre os genes associados a virulência e respetivo valor do coeficiente Phi, na população clínica de *P. aeruginosa*.

	<i>pilA</i>	<i>pilB</i>	<i>lecA</i>	<i>lecB</i>	<i>phzH</i>	<i>phzM</i>	<i>phzS</i>	<i>phzI</i>	<i>phzII</i>	<i>apr</i>	<i>lasA</i>	<i>lasB</i>	<i>exoS</i>	<i>exoT</i>	<i>exoY</i>
<i>orfF</i>															<0,001 0,589
<i>pilA</i>															
<i>pilB</i>															
<i>lecA</i>						0,082 0,314	0,059 0,322		0,037 0,382						0,059 0,322
<i>lecB</i>															
<i>phzH</i>						0,063 0,322	0,011 <sup>a</sup> 0,436 <sup>a</sup>		0,002 0,496		0,010 0,441				
<i>phzM</i>							0,005 0,475	0,010 0,449							0,005 0,475
<i>phzS</i>								0,059 <sup>a</sup> 0,322 <sup>a</sup>							0,004 0,479
<i>phzI</i>								<0,001 0,643			0,015 0,402		0,004 0,480	<0,001 0,755	0,059 <sup>a</sup> 0,322 <sup>a</sup>
<i>phzII</i>											<0,001 0,625		0,018 0,412	0,005 0,485	0,045 0,368
<i>apr</i>															
<i>lasA</i>															0,024 <sup>a</sup> 0,376 <sup>a</sup>
<i>lasB</i>															
<i>exoS</i>															
<i>exoT</i>															

<sup>a</sup> – associação não representada nos mapas perceptuais da ACM (figura 23).



**Figura 23** – Mapas perceptuais da ACM dos genes associados a virulência da amostra clínica de *P. aeruginosa* (a – plano definido pelas dimensões 1 e 2; b – plano definido pelas dimensões 1 e 3). Os círculos destacam as relações entre modalidades correspondentes às variáveis que revelaram associações estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ). Os círculos traçados a linha contínua evidenciam associações fortes ( $|\Phi_{ij}| > 0,4$ ) e os círculos a linha pontilhada associações fracas ( $0,2 < |\Phi_{ij}| < 0,4$ ). “x”<sub>0</sub> – ausência do “gene x”; “x”<sub>1</sub> – presença do “gene x”. Associações representadas no mapa das dimensões 1+2 que estão visíveis também no mapa das dimensões 1+3 não foram representadas neste último.



Todas as associações 2x2 obtidas através dos testes do qui-quadrado de independência, exceto uma, foram corretamente representadas nos mapas perceptuais da ACM, facilitando assim a percepção integrada e simultânea das relações e associações estatisticamente significativas na população. Da amostra clínica inferiram-se 18 associações positivas, sendo 15 fortes (2 muito fortes) e 3 fracas, e nenhuma associação negativa (tabela 15). Obtiveram-se 3 p-valores próximos do nível de significância, sugerindo a tendência para associação dos genes respectivos.

Quando comparadas com a população termal, as associações presentes na população clínica foram em menor número, mas mais fortes e mais específicas. O grupo dos genes de mobilidade e adesão não apresentou quaisquer associações (exceto *orfF*, fortemente associado a *exoY*, e *lecA*, fracamente associada a *phzII* e com proximidade, sem significância estatística a 5%, a *phzM*, *phzS* e *exoY*) (figura 23). Do grupo de genes codificadores de proteases, apenas *lasA* apresentou associações fortes com genes envolvidos na biossíntese de fenazinas (figura 23a) e uma associação fraca a *exoY*, não visível na figura 23. O grupo de genes codificadores das proteínas efetoras do T3SS apresentou-se fortemente associado apenas aos genes envolvidos na biossíntese de fenazinas (exceto *exoY*) e não apresentou qualquer associação com genes do seu próprio grupo (tabela 15, figura 23). Os genes envolvidos na biossíntese de fenazinas associaram-se fortemente entre si e com *lasA* assim como com todos os genes das proteínas efetoras do T3SS (tabela 15, figura 23). Os operões *phzI* e *phzII* foram aqueles que apresentaram maior número de associações e *lecA* o gene com menor número de associações, apenas uma, fraca.

### 3. Capacidade de causar infecção aguda

A produção *in vitro* de fenótipos de virulência e a evidência empírica do genoma de virulência de um isolado bacteriano não é sinónimo da sua real capacidade infetiva, uma vez que esta depende não só do arsenal de virulência que a bactéria dispõe mas também do hospedeiro que esta tenta colonizar. Assim, foram feitos ensaios de infecção aguda utilizando o modelo de infecção *Galleria mellonella*, descrito como um bom modelo para estudos de infetividade em *P. aeruginosa* (Jander *et al.*, 2000). Por motivos de constrangimento de ordem técnica, não foi possível testar um grande número de isolados, o que se revelou impeditivo de interpretação e inferência estatística dos dados obtidos nestes ensaios para as populações em estudo. Contudo, ainda que sem análise estatística inferencial, os testes realizados permitiram retirar algumas conclusões interessantes, suportadas nas observações efetuadas.

Cinco isolados termais e 5 isolados clínicos (3 associados a infeções respiratórias e 2 a outras infeções) foram sujeitos a testes de infecção aguda. Os isolados termais foram selecionados em função dos seus locais de origem, de modo a testar um isolado de cada equipamento termal amostrado (incluindo um isolado do equipamento de aerossol sónico, não incluído nos estudos de virulência) e um isolado das captações e outro do sistema de distribuição, todos não-clonais. Os 3 isolados clínicos de infeções respiratórias foram selecionados aleatoriamente entre os isolados utilizados nos estudos de virulência anteriormente descritos e os 2 isolados de infeções não respiratórias (não incluídos nos estudos de virulência) foram selecionados em função do tipo de infecção, respeitando a não clonalidade com qualquer outro isolado selecionado para este estudo.

A tabela 17 apresenta os resultados obtidos, expressos em UFC/ml, da dose letal para 50% dos indivíduos sujeitos à infecção (LD<sub>50</sub>).

**Tabela 17** – LD<sub>50</sub> dos isolados termais e clínicos de *P. aeruginosa*.

Código	Origem	LD <sub>50</sub> (UFC/ml)	Erro	p-valor
<b>Isolados da amostra termal</b>				
B12	Nebulizador Coletivo	4172	131	<0,0001
B45	Aerossol manossónico	2034	35	<0,0001
C9	Depósito principal	1267	22	0,0003
F1	Captação 2	1243	18	<0,0001
B41	Aerossol sónico	458	57	<0,0001
<b>Isolados da amostra clínica</b>				
003/09	Aspirado respiratório	734	15	<0,0001
012/09	Expetoração	3607	24	<0,0001
095/09	Aspirado respiratório	2779	4	<0,0001
005/09	Exsudado	76401	1007	<0,0001
042/09	Urina	ind. – LD <sub>100</sub> >8x10 <sup>8</sup>	---	---

UFC/ml – unidades formadoras de colónias/mililitro; ind. – indeterminado; LD<sub>100</sub> – dose letal para 100% dos indivíduos sujeitos à infecção.





Os resultados obtidos sugerem uma maior capacidade infetiva dos isolados planctónicos de *P. aeruginosa* comparativamente à média da LD<sub>50</sub> (2220 UFC/ml) dos isolados obtidos nos equipamentos termais. Analisando os resultados um a um, verifica-se uma diferença nos valores de LD<sub>50</sub> dos isolados dos equipamentos termais que poderá ser sugestiva de uma diversa capacidade infetiva dos isolados que colonizam distintos equipamentos termais. As LD<sub>50</sub> dos isolados dos diferentes equipamentos termais apresentaram proporções de 2x, 4x e 10x quando comparando os isolados do nebulizador coletivo com o aerossol manossónico, o aerossol manossónico com o aerossol sónico e o nebulizador coletivo com o aerossol sónico, respetivamente.

Os resultados obtidos para os isolados clínicos revelaram também alguma disparidade, uma vez que os valores de LD<sub>50</sub> obtidos para os 2 isolados de aspirados respiratórios apresentaram uma diferença da ordem de grandeza de 4x e de cerca de 5x e 1,3x face aos valores obtidos para o isolado de expetoração. Contudo, importa reter que a falta de dados relativos à severidade e duração da infeção respiratória aquando da colheita dos isolados é impeditiva de qualquer interpretação. Ainda assim, é interessante verificar que a LD<sub>50</sub> média dos isolados associados a infeções respiratórias é cerca de 32x menor que a do isolado obtido a partir de um exsudado, o que sugere possíveis capacidades infetivas muito distintas em função dos tecidos colonizados, ainda que se desconheça a origem do exsudado em causa.

Por último, a média dos valores de LD<sub>50</sub> dos isolados dos equipamentos termais (2220 UFC/ml) quando comparada com a média dos valores de LD<sub>50</sub> dos isolados de infeções respiratórias (2373 UFC/ml), sugere uma capacidade de infeção aguda média semelhante entre os isolados presentes nos equipamentos termais e a verificada nos isolados que estão efetivamente a causar infeções respiratórias. Considerando os valores de LD<sub>50</sub> de cada isolado testado, e excluindo os valores de LD<sub>50</sub> extremos de ambas as amostras (B12, para a amostra termal, e 003/09, para a amostra clínica), pode-se admitir uma maior capacidade infetiva dos isolados termais relativamente aos isolados clínicos de infeções respiratórias.

Mais ensaios de infeção aguda com outros isolados termais, sobretudo de equipamentos, poderiam ter sido feitos para permitir conclusões mais robustas acerca das diferenças na capacidade infetiva dos isolados que colonizam diferentes equipamentos termais. O mesmo teria sido também importante para os isolados clínicos, no sentido de permitir uma melhor comparação da capacidade infetiva de isolados de diferentes tipos de infeção, e para melhor os comparar com os isolados termais.

## 4. Resistência à desinfecção

Dois tipos de desinfecção, química (por cloração com hipoclorito de sódio) e física (por radiação ultravioleta) foram testados na maioria dos isolados termais e clínicos inicialmente selecionados para este estudo.

### 4.1. Resistência à desinfecção química por hipoclorito de sódio

Sessenta e nove dos 77 isolados termais iniciais e 73 dos 76 isolados clínicos iniciais foram sujeitos a diferentes concentrações, gradualmente menores, de hipoclorito de sódio: 4% (v/v), 2% (v/v), 1% (v/v), 0,5% (v/v), 0,25% (v/v), 0,125% (v/v) e 0,0625% (v/v) em meio de cultura MH (Scharlau, Espanha) e os resultados foram registrados em termos da concentração a partir da qual se detetou crescimento bacteriano, conforme descrito no ponto 4.1 do capítulo II.

A tabela 18 apresenta os dados obtidos, discriminados pelos tipos de isolados, para ambas as amostras. A 4% (v/v) e a 2% (v/v) de hipoclorito de sódio não se observou crescimento de nenhum isolado, e a 0,125% (v/v) e 0,0625% (v/v) todos os isolados testados apresentaram crescimento.

**Tabela 18** – Número de isolados das amostras termal e clínica de *P. aeruginosa* que apresentaram uma concentração mínima inibitória de 1% (v/v), 0,5% (v/v) ou 0,25% (v/v) de hipoclorito de sódio.

Tipos de isolados	Termas			Tipos de isolados	Clínica		
	Hipoclorito de sódio (v/v)				Hipoclorito de sódio (v/v)		
	1%	0,5%	0,25%		1%	0,5%	0,25%
Captações	7	5	---	Aspirados respiratórios	0	15	---
Circuitos	15	17	---	Expetoração	4	26	1
Equipamentos	11	12	2	Outros*	1	26	---
<b>Sub-Total</b>	<b>33</b>	<b>34</b>	<b>2</b>	<b>Sub-Total</b>	<b>5</b>	<b>67</b>	<b>1</b>
<b>Total</b>		<b>69</b>		<b>Total</b>		<b>73</b>	

\* – inclui isolados de urina, exsudados e sangue.

É evidente a diferença na capacidade de crescimento a 1% de hipoclorito entre os isolados das duas amostras: 33 de 69 isolados termais (47,8%) conseguiram crescer nesta concentração de desinfetante, enquanto na amostra clínica apenas 5 de 73 isolados testados (6,8%) cresceram a esta concentração, tendo a maioria (91,8%) apenas apresentado crescimento na presença de 0,5%, ou menos, de hipoclorito de sódio (tabela 18). Ao nível de significância de 5%, o teste de Mann-Whitney permitiu inferir para as respetivas populações esta diferença de comportamento perante as diferentes concentrações de hipoclorito:  $p < 0,0001$ , sendo a população termal mais resistente a maiores concentrações de hipoclorito que a população clínica [mean rank (termas)=85,73 > mean rank (clínica)=58,05].



## 4.2. Resistência à desinfecção física por radiação ultravioleta

Setenta e cinco dos 77 isolados termais e todos os 76 isolados clínicos foram sujeitos a radiação ultravioleta, durante 30 segundos e 1 minuto, e os resultados lidos, e interpretados, às 24 e 48 horas de incubação.

Os resultados obtidos encontram-se resumidos nas figuras 24, 25 e 26, comparando as amostras entre si (figura 24) e comparando os diferentes tipos de isolados de cada amostra (figuras 25 e 26) quanto ao período de exposição a UV e ao tempo de incubação. A inferência estatística dos resultados foi baseada nos testes de Mann-Whitney (entre populações) e do qui-quadrado de independência (intra-populações), ao nível de significância de 5%.

Diferenças no comportamento dos isolados termais e clínicos quando expostos à radiação durante 30 segundos são evidentes, mas não tão óbvias quando se consideram os resultados obtidos após 1 minuto de exposição à radiação (figura 24). Semelhantes resultados foram observados nos isolados termais quando divididos em função do local de origem, sobretudo para os isolados recolhidos nos circuitos de distribuição e nas captações, dado que quando sujeitos a 30 segundos de exposição se registou crescimento até à classe 5, após 48 horas de incubação, e após 1 minuto de exposição os mesmos isolados não conseguiram apresentar crescimento acima da classe 3, após 48 horas de incubação (figura 25). Na amostra clínica verificou-se serem os isolados derivados de aspirados respiratórios os mais vulneráveis à desinfecção física por radiação UV, por terem a maior proporção de isolados na classe 1 (figura 26).

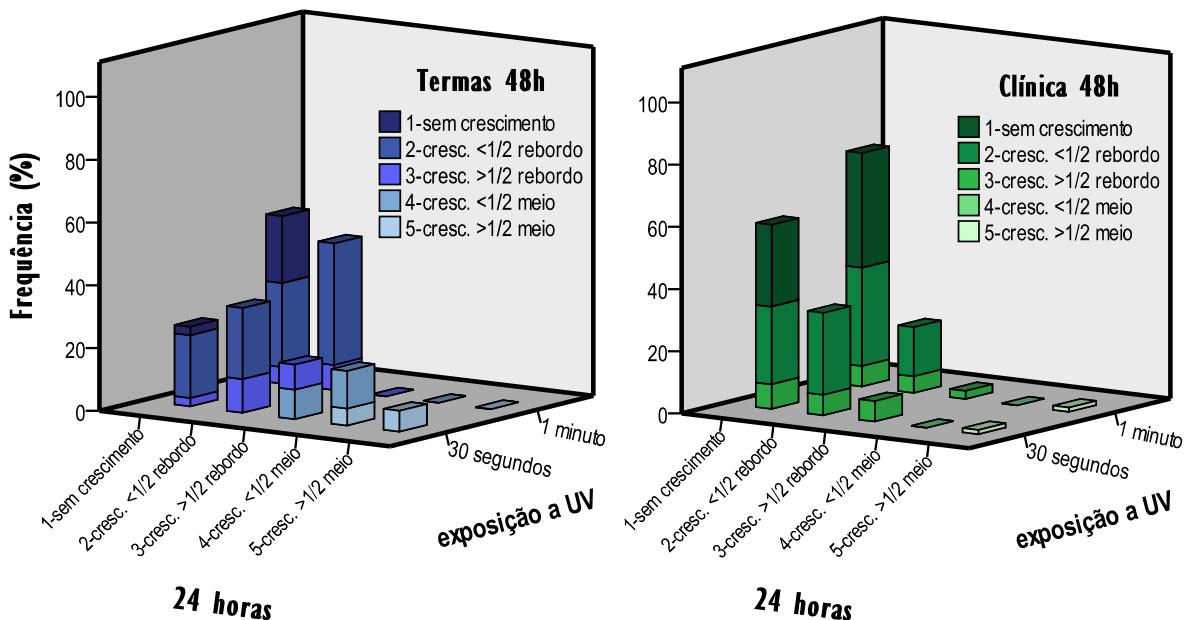
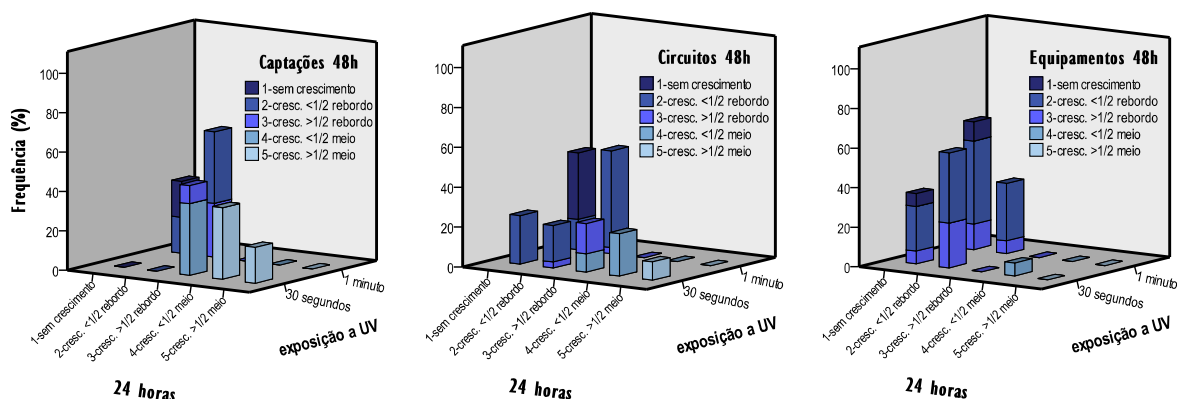
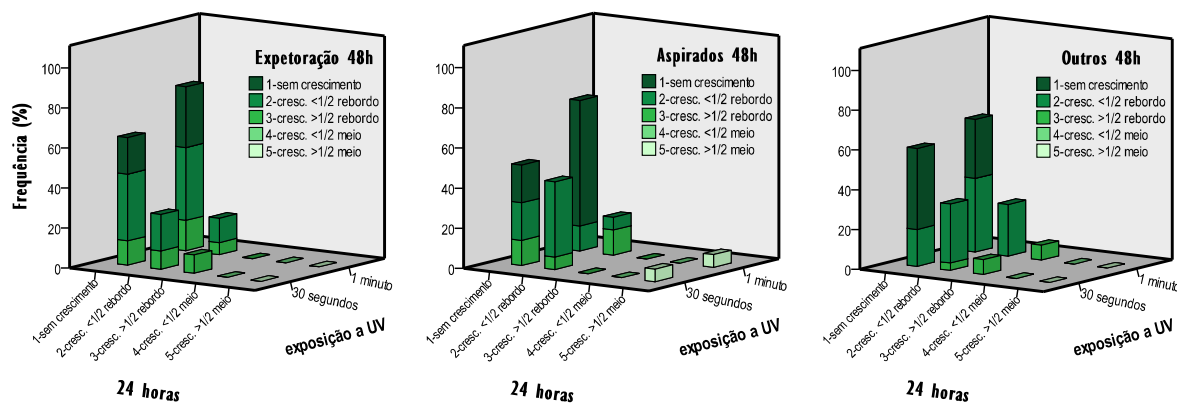


Figura 24 – Frequência relativa (%) do crescimento às 24 e 48 horas de incubação dos isolados termais (esquerda) e clínicos (direita) de *P. aeruginosa* após incidência de UV durante 30 segundos e 1 minuto.



**Figura 25** – Frequência relativa (%) do crescimento às 24 e 48 horas de incubação dos isolados termais de *P. aeruginosa* em função dos seus locais de origem após incidência de UV durante 30 segundos e 1 minuto.



**Figura 26** – Frequência relativa (%) do crescimento às 24 e 48 horas de incubação dos isolados clínicos de *P. aeruginosa* em função dos seus locais de origem após incidência de UV durante 30 segundos e 1 minuto.

A amostra termal apresentou uma grande variabilidade no comportamento dos isolados face à agressão por UV. A maioria dos isolados termais apresentou resistência a UV após 30 segundos de exposição, perdendo essa capacidade quando sujeitos a 1 minuto de radiação (figura 24). Ainda que cerca de metade dos isolados que não apresentaram crescimento após 24 horas de incubação a 37°C tenha conseguido crescer após segundo ciclo de incubação, não se verificaram crescimentos da classe 4 ou 5 na amostra termal quando sujeita a 1 minuto de radiação UV (figura 24). Analisando o comportamento dos isolados termais segundo o local de origem, é evidente a diferença de comportamento dos isolados das captações uma vez que, após 30 segundos de incidência de UV, todos apresentaram elevado crescimento em placa logo às 24 horas (classes 3, 4 e 5), enquanto que após 1 minuto de incidência com UV 1/3 não apresentou qualquer crescimento e 2/3 apresentaram crescimento do tipo 2 às 24 horas de incubação. Após 48 horas a 37°C, metade dos isolados aumentaram uma classe, mas não atingiram a classe 4 de crescimento (figura 25). Os isolados dos circuitos distribuíram-se numa forma relativamente homogênea



pelas classes de crescimento quando sujeitos a 30 segundos de UV e apresentaram comportamento semelhante aos isolados das captações quando sujeitos a UV durante 1 minuto (figura 25). Os isolados dos equipamentos apresentaram um comportamento semelhante aos 30 segundos e 1 minuto de exposição a UV, distribuindo-se pelas classes 1 e 2 e a maioria aumentou de classe após 48 horas de incubação (figura 25), o que poderá sugerir uma menor resistência a UV destes isolados comparativamente aos restantes isolados termais, ainda que cerca de 1/3 tenha sido classificado no nível 3 após 48 horas de incubação.

A amostra clínica revelou um comportamento distinto da amostra termal quando sujeita a radiação UV. Todos os isolados clínicos, à exceção de um obtido a partir de uma amostra de aspirado respiratório, foram classificados nos tipos 1, 2 ou 3, após 30 segundos ou 1 minuto de exposição a UV, decorridas 24 ou 48 horas de incubação. Apenas metade dos isolados sem crescimento às 24 horas apresentou crescimento após 48 horas de incubação e poucos transitaram da classe 2 para a classe 3 às 48 horas de incubação (figura 26), o que representa menos de 20% da amostra clínica total. Não foram detetadas diferenças expressivas no comportamento dos isolados em função do produto biológico de origem (figura 26).

Testes de Mann-Whitney permitiram inferir para as respetivas populações as diferenças observadas nas amostras quanto ao comportamento dos isolados termais e clínicos quando expostos a 30 segundos de UV após incubação de 24 horas ( $p < 0,001$ ) e 48 horas ( $p < 0,001$ ), sendo a população termal mais resistente à radiação em ambos os tempos de incubação [mean rank (termas)=93,47 > mean rank (clínica)=58,76, às 24 horas de incubação; mean rank (termas)=94,26 > mean rank (clínica)=57,98, às 48 horas de incubação]. Idênticos resultados foram obtidos para a população termal, nos testes de independência realizados aos isolados em função dos locais de origem às 24 horas ( $p < 0,001$ ) e 48 horas de incubação ( $p < 0,001$ ). As diferenças no comportamento dos isolados clínicos face à exposição a UV durante 30 segundos consoante o tipo de isolado não foram estatisticamente significativas às 24 horas ( $p = 0,387$ ), mas foram-no após 48 horas de incubação ( $p = 0,042$ ).

Os mesmos testes realizados para o período de exposição a UV de 1 minuto conduziram a resultados semelhantes. Os testes de Mann-Whitney entre a população termal e clínica às 24 horas de incubação devolveram um valor  $p$  de 0,012 e de 0,004 às 48 horas de incubação, mantendo-se a população termal mais resistente à radiação para os dois períodos de incubação após o período de incidência de radiação UV [mean rank (termas)=83,53 > mean rank (clínica)=68,57, às 24 horas de incubação; mean rank (termas)=85,06 > mean rank (clínica)=67,06, às 48 horas de incubação]. Contudo, na população termal deixou de se verificar uma dependência na resposta à radiação quanto ao local de origem às 24 horas de incubação após exposição ( $p = 0,215$ ), mas manteve-se essa dependência dos diferentes tipos de isolados termais à radiação/1 minuto após 48 horas de incubação ( $p = 0,005$ ). Na população clínica obtiveram-se idênticos resultados: após 24 horas de incubação os isolados não revelaram dependência relativamente ao produto biológico de origem ( $p = 0,216$ ), mas sim às 48 horas de incubação ( $p = 0,035$ ).

## 5. Resistência a antibióticos

A pesquisa da resistência aos carbapenemos imipenemo e meropenemo, às cefalosporinas ceftazidima e cefepima, à penicilina piperacilina, ao monobactâmico aztreonamo, à fluoroquinolona ciprofloxacina e ao aminoglicosídeo amicacina foi realizada em todos os 226 isolados de *P. aeruginosa* obtidos ao longo dos 4 anos de amostragem do estabelecimento termal, pelo método de difusão em disco e quando necessário foi determinada a concentração mínima inibitória (CMI). Foi também estudado o mecanismo envolvido na maioria das resistências detetadas nesta população. Idêntico estudo foi efetuado para os 76 isolados clínicos utilizados neste trabalho para fins comparativos.

### 5.1. Resistência a antibióticos na amostra termal inicial

A população termal revelou-se suscetível a todos os antibióticos estudados. Apenas 2 isolados de biofilmes de equipamentos termais se revelaram resistentes ao AZT (CMI = 64 mg/l, para ambos) e um isolado de uma captação resistente ao IP (CMI = 16 mg/l). Aquando da realização dos testes de suscetibilidade por difusão em disco foram observados alguns mutantes que foram isolados e estudados quanto à sua resistência a todos os antibióticos em causa. A tabela 19 apresenta os mutantes obtidos, indicando ainda as CMI dos mutantes para os antibióticos a que foram resistentes e respetivos isolados-mãe.

**Tabela 19** – CMI (em mg/l) dos antibióticos testados nos isolados de *P. aeruginosa* e respetivos mutantes.

Resistência a IP	CMI (mg/l)		
	Isolado	Mutante resistente	
Isolados planctônicos	IP	IP	
1 Captação 1	1,5	≥32	
2 Circuito de ingestão (hidropínia)	3	≥32	
3 Circuito de irrigação nasal/aerossol	3	≥32	
4 Circuito de duche faríngeo (mutantes 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7)	2	≥32	
5 Circuito da piscina terapêutica	3	≥32	
Isolados de biofilme de equipamentos			
6 Nebulizador coletivo – placa central da base	2	≥32	
7 Nebulizador coletivo – placa esquerda da base (mutantes 1, 2 e 3)	3	≥32	
8 Nebulizador coletivo – cone de dispersão	4	≥32	
9 Aerossol manossónico – base interna	3	≥32	

Resistência a CAZ	CMI (mg/l)					
	Isolado			Mutante resistente		
Isolados de biofilmes de equipamentos	CAZ	AZT	PIP	CAZ	AZT	PIP
10 Nebulizador coletivo – placa central da base	6	3	4	≥256	≥32	128
11 Aerossol manossónico – base int. (mutante 1)	8	2	---	≥256	96	---
12 Aerossol manossónico – base int. (mutante 2)	8	2	---	128	≥256	---

Resistência a PIP	CMI (mg/l)	
	Isolado	Mutante resistente
Isolado planctónico	PIP	PIP
13 Circuito de duche de Vichy	2	96

CMI – concentração mínima inibitória; IP – imipenemo; CAZ – ceftazidima; AZT – aztreonam; int. – interna; PIP – piperacilina.



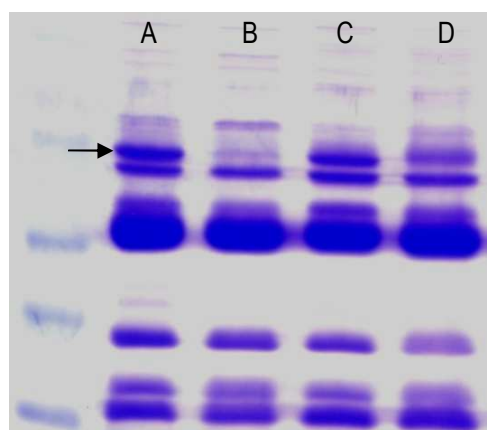
Foram obtidos 17 mutantes resistentes ao IP a partir de 5 isolados planctônicos e de 4 isolados de biofilmes de equipamentos (de 1 isolado planctônico foram isolados 7 mutantes e de 1 isolado de biofilme 3 mutantes), 3 mutantes resistentes a CAZ a partir de 2 isolados de biofilmes (2 mutantes do mesmo isolado) e um mutante resistente a PIP, obtido de um isolado planctônico do circuito de duche de Vichy. Os 3 isolados resistentes a CAZ foram também resistentes a AZT e um deles apresentou ainda resistência a PIP (tabela 19).

### 5.1.1. Mutantes resistentes ao IP

Dado que a maioria dos mutantes observados respeitavam a resistência ao IP, foi estudado o mecanismo associado a essa resistência, não se estudando os mecanismos presentes nas resistências a CAZ, AZT e PIP observadas, por terem pouca expressão no número total de mutantes obtidos. Foi ainda feita a tipagem por RAPD e determinado o perfil de virulência dos mutantes IP-resistentes e dos respectivos isolados-mãe.

#### 5.1.1.1. Diminuição da expressão da porina OprD

Os perfis das proteínas da membrana externa da parede celular dos mutantes de *P. aeruginosa* resistentes a IP, obtidos através de SDS-PAGE, revelaram todos uma diminuição da expressão de uma proteína com cerca de 46 kDa, compatível com a porina OprD (Cardoso *et al.*, 2002; Mesaros *et al.*, 2007) quando comparados com os perfis dos isolados-mãe respectivos (figura 27).

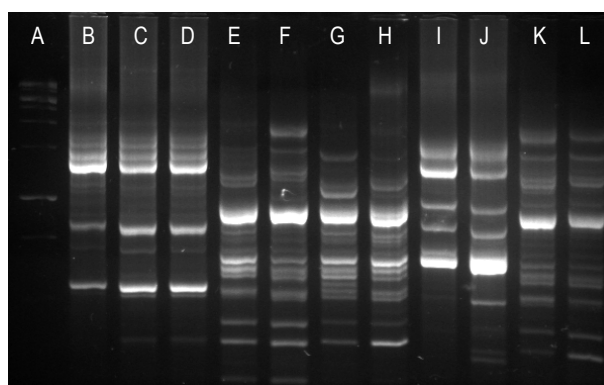


**Figura 27** – Exemplo de eletroforese SDS-PAGE das proteínas da membrana externa da parede celular de isolados-mãe de *P. aeruginosa* e respectivos mutantes resistentes a IP. A seta indica as proteínas com cerca de 46 kDa, compatíveis com a porina OprD. A e C – isolados-mãe; B e D – respectivos mutantes IP-resistentes, com diminuição da expressão da porina OprD.

### 5.1.1.2. Diversidade genética dos mutantes IP-resistentes e respectivos isolados-mãe

Todos os mutantes resistentes a IP e respectivos isolados-mãe foram sujeitos a tipagem por RAPD e comparados entre si a fim de detetar eventuais diferenças genéticas significativas em relação aos isolados-mãe e também para estudar a diversidade genética dos isolados termais de *P. aeruginosa* que apresentaram mutantes IP-resistentes. A figura 28 apresenta um exemplo de uma eletroforese dos produtos de PCR-RAPD onde é visível a similaridade genética dos mutantes com os respectivos isolados-mãe e a diferença de perfis entre isolados distintos.

Os perfis de RAPD dos mutantes resistentes a IP quando comparados com os perfis de RAPD dos respectivos isolados-mãe demonstraram que todos os mutantes partilhavam o mesmo perfil de RAPD que os seus isolados-mãe, verificando-se, assim, a sua origem no isolado-mãe e a adaptação à presença do IP sem implicações significativas no seu genoma. Comparando os perfis de RAPD dos 13 conjuntos mutantes-isolados-mãe entre si, observou-se que todos apresentaram perfis distintos, evidenciando a disseminação da capacidade de resistência ao IP por toda a população termal de *P. aeruginosa*, uma vez que este fenómeno que não se confinou a genótipos específicos mas apresentou-se distribuído por vários genótipos diferentes.



**Figura 28** – Exemplo de eletroforese de produtos de PCR-RAPD de isolados-mãe de *P. aeruginosa* e respectivos mutantes resistentes a IP. A – padrão de ADN de 1kb; B – isolado 7 da tabela 18; C e D – mutantes do isolado 7; E – isolado 4 da tabela 18; F, G e H – mutantes do isolado 4; I – isolado 1 da tabela 18; J – mutante do isolado 1; K – isolado 3 da tabela 18; L – mutante do isolado 3.

### 5.1.1.3. Perfil de virulência dos mutantes IP-resistentes e respectivos isolados-mãe

O perfil de virulência efetuado a todos os mutantes IP-resistentes e respectivos isolados-mãe não revelou quaisquer diferenças entre os mutantes e os respectivos isolados-mãe, pelo que não foram detetadas quaisquer diferenças nas características fenotípicas e genotípicas dos mutantes de *P. aeruginosa* resistentes a IP e os isolados em que estes tiveram origem, para além da diminuição da expressão da porina OprD.





## 5.2. Resistência a antibióticos na amostra clínica inicial

### 5.2.1. Prevalência e distribuição

No que diz respeito à amostra clínica total, a figura 29 apresenta a taxa de resistência para todos os antibióticos testados.

Os antibióticos IP, AZT, PIP e CIP foram aqueles que apresentaram maior taxa de resistência, superior a 60%, com percentagens de resistência de 62,3%, 61%, 61% e 59,7%, respetivamente. Cerca de metade dos isolados revelaram-se resistentes a MP (49,4%). 41,6% e 40,3% dos isolados foram resistentes a CAZ e a FEP, respetivamente. AMK foi o antibiótico com a menor taxa de resistência observada (9,1%).

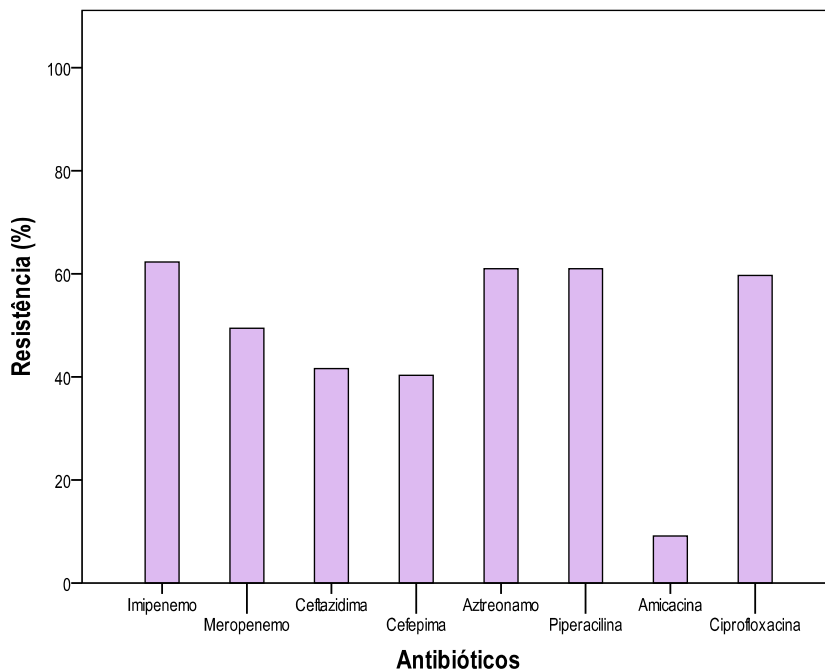


Figura 29 – Resistência (%) aos diferentes antibióticos testados na amostra clínica de *P. aeruginosa*.

Considerando a resposta individual de cada isolado à presença de antibióticos, foi possível observar diferentes perfis de suscetibilidade nos isolados clínicos. Mais de metade dos isolados apresentou um perfil de multirresistência (53%), 1/4 foram sensíveis a todos os antibióticos testados, e os restantes 23% dos isolados analisados apresentaram resistência a 1 ou 2 antibióticos (figura 30).

Dos isolados com perfil MDR, a maioria foi classificada como XDR (51%) e uma pequena percentagem como PDR (7%), atendendo à nomenclatura definida por Magiorakos *et al.* (2011) (figura 30).

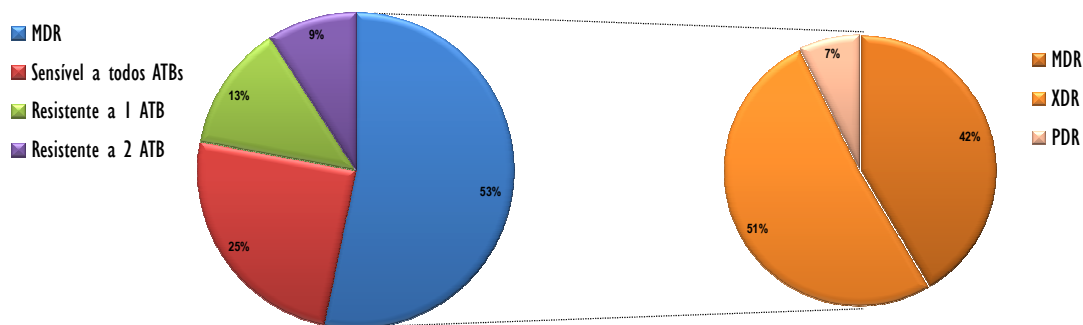


Figura 30 – Proporção percentual do perfil de resistência por isolado na amostra clínica de *P. aeruginosa*.

### 5.2.2. Relações globais do comportamento dos isolados clínicos à presença de antibióticos

A figura 31 representa o mapa perceptual resultante da ACM realizada ao comportamento dos isolados clínicos à presença dos antibióticos (susceptibilidade/resistência). Foram consideradas duas dimensões, que permitiram explicar 75,9% da variância total.

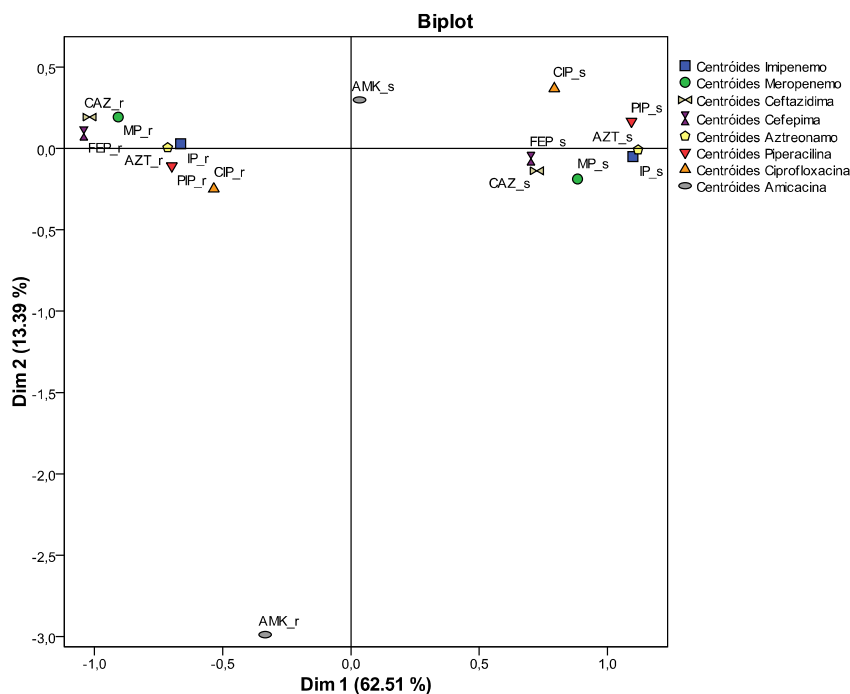


Figura 31 – Mapa perceptual da ACM do comportamento dos isolados clínicos de *P. aeruginosa* à presença dos antibióticos “x”\_r – resistência ao antibiótico “x”; “x”\_s – susceptibilidade ao antibiótico “x”; IP – imipenemo; MP – meropenemo; CAZ – ceftazidima; FEP – cefepima; AZT – aztreonam; PIP – piperacilina; CIP – ciprofloxacina; AMK – amicacina.



Observando a figura 31, é possível verificar uma estreita relação da resistência aos antibióticos entre si, e da suscetibilidade entre si, exceto AMK. Este antibiótico apresentou um comportamento díspar, sobretudo o centróide relativo à resistência a AMK, representado muito distante dos restantes centróides.

Testes do qui-quadrado de independência confirmaram a associação de todos os antibióticos (excluindo AMK) entre si e a independência do AMK em relação a todos os outros antibióticos, ao nível de significância de 5%, validando o observado na figura 31.

### 5.2.3. Previsão da resistência a antibióticos em função dos fatores de virulência

Para analisar o impacto da presença conjunta dos fatores de virulência (fenótipos e genótipos) na resistência aos antibióticos dos isolados clínicos de *P. aeruginosa*, foram construídos modelos de regressão logística múltipla, conforme descrito no ponto 8. do capítulo II.

A tabela 20 apresenta os resultados dos modelos obtidos para cada antibiótico, com a resistência ao antibiótico como variável dependente e os fatores de virulência como variáveis independentes, indicando ainda os indicadores da qualidade do ajustamento dos modelos obtidos. Em particular, é indicado o *odds ratio* (OR) e respetivo intervalo de confiança a 95% (IC) para o comportamento (resistência vs suscetibilidade) dos isolados da população clínica relativamente ao antibiótico em função da presença dos fatores de virulência considerados como previsores significativos em cada caso ( $p < 0,05$  no teste de Wald). Da análise de AMK não resultaram bons modelos, pelo que este antibiótico não figura na tabela.

**Tabela 20** – Resultados dos modelos de regressão logística múltipla para o comportamento (resistência vs suscetibilidade) dos isolados clínicos de *P. aeruginosa* face aos diferentes antibióticos, em função dos fatores de virulência estatisticamente significativos.

ATB	FV	Nível	p-valor (Wald)	Odds ratio	IC (95%)	Indicadores da qualidade do ajustamento				
						%Cl. Correta	Sig. Nul.	R <sup>2</sup> (CS)	R <sup>2</sup> (N)	HL
IP	Pioverd	34 vs 12	0,010	8,912	1,706-46,545	81,3%	p<0,001	0,429	0,588	p=0,801
	lecA	P vs A	0,009	16,897	2,037-140,185					
	lecB	P vs A	0,003	0,018	0,001-0,262					
	phzH	P vs A	0,047	0,157	0,025-0,978					
MP	exoY	P vs A	0,005	0,047	0,006-0,398	80,6%	p<0,001	0,431	0,575	p=0,880
	Pioverd	34 vs 12	0,001	47,657	4,421-513,762					
	lecA	P vs A	0,028	7,126	1,235-41,105					
	lecB	P vs A	0,001	0,072	0,015-0,352					
CAZ	exoY	P vs A	0,001	0,019	0,001-0,249	83,6%	p<0,001	0,537	0,721	p=0,780
	Pioverd	34 vs 12	0,012	10,533	1,694-65,482					
	Ramnlol	P vs A	0,007	0,029	0,002-0,385					
	Piocian	P vs A	0,013	13,490	1,746-104,235					
	lecA	P vs A	0,002	74,919	4,850-1157,367					
FEP	lecB	P vs A	<0,001	0,017	0,002-0,129	80,8%	p<0,001	0,405	0,546	p=0,295
	exoT	P vs A	0,017	44,173	1,963-994,218					
	Pioverd	34 vs 12	0,002	8,708	2,231-33,988					
	Ramnlol	P vs A	0,008	0,103	0,019-0,551					
	Lipase	P vs A	0,014	7,078	1,484-33,763					
	lecB	P vs A	0,001	0,074	0,016-0,343					

(continua)

(continuação)

AZT	Pioverd	34 vs 12	0,010	11,441	1,791-73,071	77,0%	p<0,001	0,408	0,558	p=0,512
	<i>lecA</i>	P vs A	0,025	9,624	1,333-69,484					
	<i>lecB</i>	P vs A	0,002	0,017	0,001-0,218					
	<i>exoY</i>	P vs A	0,001	0,025	0,003-0,239					
PIP	Pioverd	34 vs 12	0,001	0,073	0,015-0,352	75,3%	p<0,001	0,329	0,452	p=0,322
	Lipase	P vs A	0,009	0,133	0,029-0,610					
	FosfC	4 vs 123	0,002	59,007	4,402-790,982					
	<i>exoA</i>	P vs A	0,001	0,054	0,009-0,318					
CIP	Pioverd	4 vs 2	0,013	7,407	1,5267-35,714	78,4%	p<0,001	0,310	0,422	p=0,596
	Ramnlol	P vs A	0,004	13,869	2,313-83,142					
	FosfC	4 vs 123	0,007	13,874	2,046-94,078					
	<i>phzM</i>	P vs A	0,012	0,135	0,029-0,639					
Legenda das cores usadas		Previsor de resistência		Previsor de sensibilidade						

ATB – antibiótico; FV – fator de virulência; IC (95%) – intervalos de confiança dos *odds ratio*, ao nível de significância de 95%; % Cl. Correta – percentagem de casos corretamente classificados; Sig. Nul. – significância estatística do modelo em relação ao modelo nulo; R<sup>2</sup> – proporção da variância explicada; CS – coeficiente de Cox e Snell; N – coeficiente de Nagelkerke; HL – teste de Hosmer e Lemeshow; IP – imipenemo; Pioverd – pioverdina; 1,2,3,4 – classes de produção (ausência, reduzida, moderada e elevada) do fenótipo de virulência ordinal (pioverdina ou fosfolipase C); P – presença do FV; A – ausência do FV; MP – meropenemo; CAZ – ceftazidima; Ramnlol – ramnolípidos; Plocian – piocianina; FEP – cefepima; AZT – aztreonamo; PIP – piperacilina; FosfC – fosfolipase C; CIP – ciprofloxacina.

O único previsor comum a todos os antibióticos foi a pioverdina tendo sido necessário agrupar as classes 1+2 e 3+4 para construir os modelos relativos ao comportamento de resistência aos antibióticos dos isolados clínicos de *P. aeruginosa*, exceto para CIP. A produção média ou elevada de pioverdina apresentou-se como um bom previsor da resistência para todos os antibióticos testados (OR>1), exceto para PIP, em que a sua influência se verificou no sentido inverso (OR<1), prevendo assim a suscetibilidade a este antibiótico, numa ordem de grandeza inversa ao OR determinado para esse modelo (tabela 20). A produção de ramnolípidos prevê a suscetibilidade às cefalosporinas de 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> geração, atendendo aos valores reduzidos de OR presentes na tabela 20 (OR<1), e é um bom previsor de resistência a CIP.

No que diz respeito aos genes associados à virulência, os valores de OR apresentados na tabela 20 permitem concluir que a presença do gene *lecB* constitui um bom previsor da suscetibilidade a todos os antibióticos, exceto PIP e CIP. Destaca-se ainda a influência conjunta dos genes *lecA* e *lecB* nos modelos relativos a IP, MP, CAZ e AZT, mas com papéis inversos, uma vez que a presença de *lecA* se revelou um bom previsor da resistência a estes antibióticos, com valores de OR entre 9,627 (para AZT) e 13,490 (para CAZ), contrariamente ao que se verifica para o gene *lecB*. À influência destes dois genes associa-se a influência do gene *exoY* nos modelos relativos a IP, MP e AZT, cuja presença prevê o comportamento dos isolados no sentido da suscetibilidade para estes antibióticos.

Os restantes previsores (lipase, piocianina, fosfolipaseC, *phzH*, *phzM*, *exoT* e *exoA*) intervêm apenas pontualmente nos modelos construídos pelo que, em termos globais, a sua relevância é inferior à dos acima referidos.



## 6. Elementos de mobilidade genética

Os isolados não-clonais de cada uma das amostras de *P. aeruginosa* em estudo foram analisados quanto ao conteúdo dos 3 principais EGMs: ilhas genômicas, integrões e plasmídeos, por PCR ou PFGE.

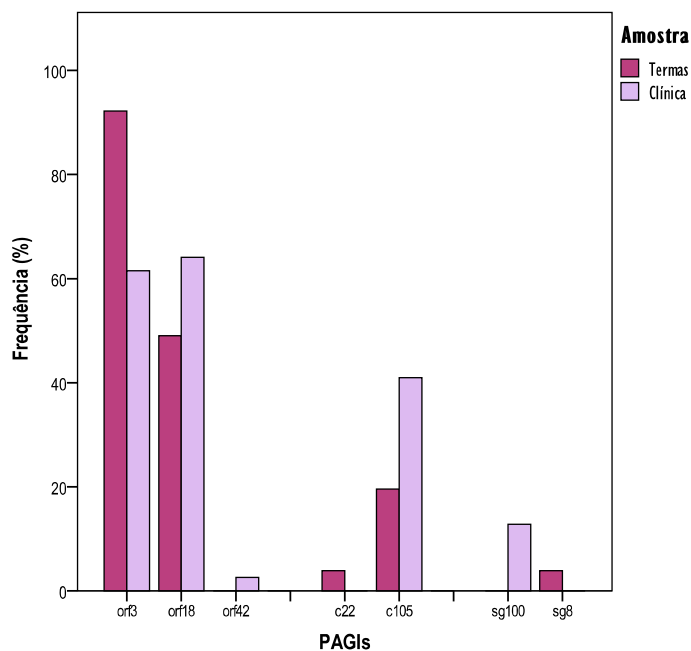
### 6.1. Ilhas genômicas

#### 6.1.1. Distribuição e prevalência

Foram pesquisadas as ilhas genômicas PAGI1, PAGI2 e PAGI3 em ambas as amostras não-clonais de *P. aeruginosa* através de PCR e os resultados expressos na forma nominal (presente/ausente).

##### 6.1.1.1. Entre amostras e entre populações

A figura 32 apresenta os resultados obtidos para a pesquisa de genes das ilhas genômicas PAGI1 (*orf3*, *orf18* e *orf42*), PAGI2 (*c22* e *c105*) e PAGI3 (*sg8* e *sg100*) nas duas amostras não-clonais.

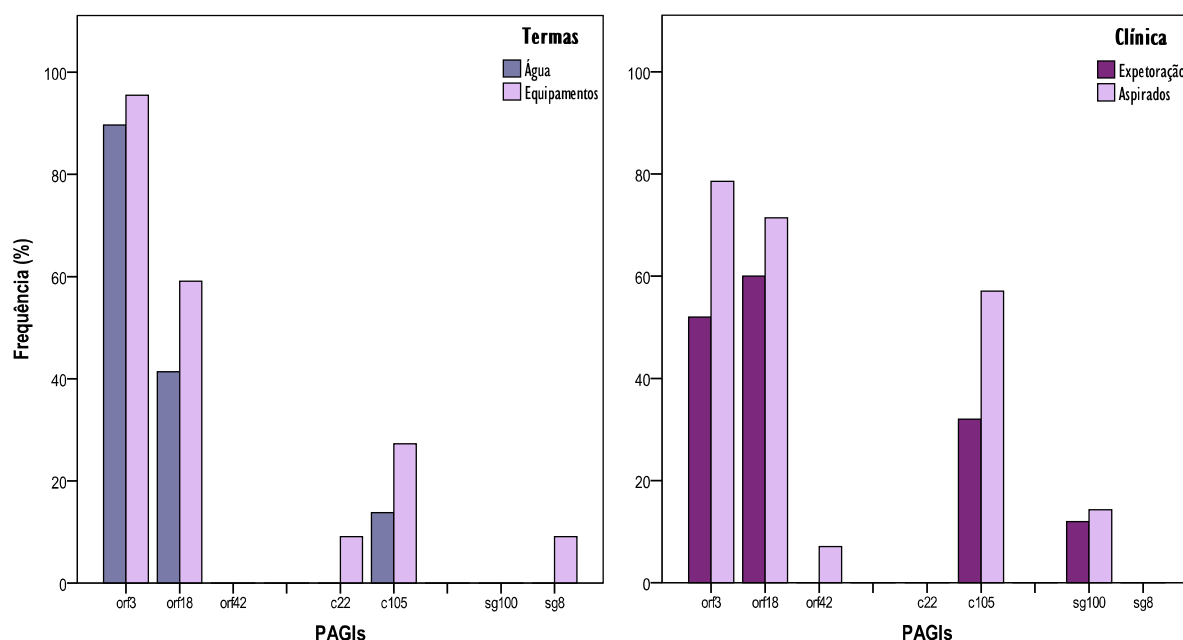


**Figura 32** – Frequência relativa (%) dos genes representativos de PAGI1 (*orf3*, *orf18* e *orf42*), PAGI2 (*c22* e *c105*) e PAGI3 (*sg8* e *sg100*) nas duas amostras de *P. aeruginosa*.

Os genes *orf3*, *c105* e *sg100* foram os únicos que apresentam uma frequência expressiva e simultânea nas duas amostras. Testes do qui-quadrado de homogeneidade demonstraram a prevalência dos genes *c105* ( $p=0,035$ ) e *sg100* ( $p=0,013$ ) na população clínica e do gene *orf3* ( $p=0,001$ ) na população termal. Os restantes genes foram encontrados com frequências muito baixas e apenas numa das amostras: *orf42* foi só observado num isolado clínico, *c22* e *sg8* foram detetados apenas em 2 isolados termais e *sg100* em 5 isolados clínicos.

### 6.1.1.2. Intra-amostras e intra-populações

A distribuição dos genes representativos das ilhas genómicas pelos diferentes tipos de isolados em cada amostra não apresentou diferenças expressivas, exceto *c105* na amostra clínica (figura 33).



**Figura 33** – Frequência relativa (%) dos genes representativos de PAG1 (*orf3*, *orf18* e *orf42*), PAG2 (*c22* e *c105*) e PAG3 (*sg8* e *sg100*) nas duas subamostras de isolados termais (esquerda) e clínicos (direita) de *P. aeruginosa*.

Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas (testes do qui-quadrado de independência,  $p>0,05$ ) na distribuição dos genes representativos das ilhas genómicas entre os diferentes tipos de isolados de cada amostra, incluindo *c105* na amostra clínica ( $p=0,179$ ).



## 6.2. Integrões

Foram pesquisados integrões de classe 1, 2 e 3 em ambas as amostras de *P. aeruginosa* conforme descrito no ponto 6.2. do capítulo II.

### 6.2.1. Distribuição, prevalência e similaridade

Não foram detetados integrões na amostra termal, exceto num isolado, C268, do circuito principal da piscina terapêutica. Este isolado termal apresentou um integrão de classe 1, com cerca de 800 pb. Quando comparado a sequências previamente reportadas na base de dados GenBank®, verificou-se ser idêntico à sequência parcial do integrão de classe 1 presente no plasmídeo p4800 da estirpe Kp 4800 de *Klebsiella pneumoniae* (EU622041.1).

Por se tratar da primeira descrição deste integrão em *P. aeruginosa*, a sua sequência genética completa foi submetida à base de dados GenBank®, tendo-lhe sido atribuído o código de acesso KF525705.

Dez isolados clínicos apresentaram integrões de classe 1. A tabela 21 apresenta o tamanho e conteúdo de cada integrão observado nas amostras em estudo.

Não foram observados integrões de classe 2 ou 3 em nenhum dos isolados.

**Tabela 21** – Identificação dos integrões de classe 1 detetados nos isolados clínicos, e no isolado termal, de *P. aeruginosa* e respetivas cassetes de genes.

Isolado número	Tipo	Local de colheita	Data de colheita	Tamanho do amplicão (pb)	Cassetes de genes	Proteínas respetivas
051	Expetoração	Pneumologia	14-04-09	5000	---	---
071	Expetoração	Hospital 2	07-04-09	3000	<i>aadB</i> <i>orf1</i> <i>aadA11</i>	aminoglicosídeo-2''-adeniltransferase clorito-dismutase (putativa) aminoglicosídeo-3'-adeniltransferase
080	Expetoração	Consulta Externa	13-05-09	2000	<i>aadA11</i> <i>aadB</i>	aminoglicosídeo-3'-adeniltransferase aminoglicosídeo-2''-adeniltransferase
097	Aspirado	Consulta Externa	17-06-09	5000	---	---
109	Aspirado	Hospital de Dia	14-07-09	3000	<i>aadB</i> <i>orf1</i> <i>aadA11</i>	aminoglicosídeo-2''-adeniltransferase clorito-dismutase (putativa) aminoglicosídeo-3'-adeniltransferase
115	Expetoração	Pneumologia	22-07-09	1500	<i>aadA6</i> <i>orfD</i>	aminoglicosídeo-adeniltransferase proteína hipotética
159	Expetoração	Urgências	09-09-09	2000	<i>aadA11</i> <i>aadB</i>	aminoglicosídeo-3'-adeniltransferase aminoglicosídeo-2''-adeniltransferase
182	Expetoração	Pneumologia	15-10-09	2000	<i>aacA7</i> <i>aadA6</i>	aminoglicosídeo-6''N-acetiltransferase aminoglicosídeo-adeniltransferase
198	Aspirado	Medicina	29-10-09	3000	<i>aadB</i> <i>orf1</i> <i>aadA11</i>	aminoglicosídeo-2''-adeniltransferase clorito-dismutase (putativa) aminoglicosídeo-3'-adeniltransferase
204	Expetoração	Infecciosas	05-11-09	1500	<i>aadA11</i>	aminoglicosídeo-3'-adeniltransferase
C268	Planctónico	Piscina terapêutica	30-03-07	800	<i>dfr22</i>	dihidrofolato-reductase tipo 22

Nos isolados clínicos, não foi possível determinar o conteúdo dos 2 integrões de 5000 pb, mas os restantes integrões apresentaram sobretudo genes de resistência a aminoglicosídeos. A cassette de genes mais frequente foi a *aadA11*, presente em todos os integrões analisados, exceto em 2. *aadB* foi a segunda cassette mais frequente, presente em 5 dos 8 integrões estudados, e sempre em concomitância com *aadA11*.

Quando comparando entre si os integrões observados nos isolados clínicos, foi possível verificar que os integrões dos isolados 071, 109 e 198, todos com 3000 pb, eram similares, apesar dos isolados a partir dos quais foram obtidos terem sido isolados de unidades hospitalares diferentes e com 4 a 5 meses de distância (tabela 21), evidenciando a disseminação e persistência no tempo deste integrão. O mesmo foi verificado relativamente aos integrões de 2000 pb presentes nos isolados 080 e 159, similares entre si, mas com origem em isolados de serviços hospitalares e datas de colheita distintas (tabela 21). Os restantes integrões, um com 2000 pb e dois com 1500 pb, não apresentaram similaridade com qualquer outro integrão obtido neste estudo.

O único integrão detetado no isolado termal apresentou a cassette de genes *dfr22*, que codifica uma dihidrofolato-reductase do tipo 22, envolvida na resistência ao trimethoprim, tendo sido também o único que apresentou esta cassette de genes.

### 6.3. Plasmídeos

Ainda que pesquisados por duas técnicas diferentes, não foram detetados plasmídeos nos isolados de nenhuma das duas amostras em estudo.





## **CAPÍTULO IV**

---



## **DISCUSSÃO**



Raramente considerada como uma verdadeira bactéria patogénica no início do século passado, *Pseudomonas aeruginosa* é hoje uma das principais preocupações para a medicina, tendo emergido como um dos mais importantes patogénicos ao qual se associam elevadas taxas de morbilidade e mortalidade, sobretudo quando associado a infeções respiratórias em doentes imunodeprimidos ou debilitados (Mesaros *et al.*, 2007; Kanj e Sexton, 2012). A sua complexa e diversa capacidade de resistir à antibioterapia é um problema cada vez mais grave à medida que assistimos ao aumento progressivo das estirpes multi, extensa e pan resistentes (ECDC, 2012).

*P. aeruginosa* é também, e sobretudo, uma bactéria ambiental que se encontra essencialmente na água e em zonas húmidas (Palleroni, 2005). A presença de *P. aeruginosa* no ambiente constitui uma importante preocupação, uma vez que representa um risco para a saúde pública, em particular quando se considera a utilização de água para fins de consumo, recreativos ou terapêuticos. Normas europeias determinam a permanente avaliação da sua presença em água balnear (Diretiva 76/160/CEE), e em água para consumo humano apenas quando se trata de água engarrafada, não sendo pesquisada quando a água é abastecida através de redes de distribuição pública (Diretiva 98/83/CE), ainda que a sua utilização doméstica possa ser semelhante à utilização balnear. A utilização terapêutica da água, sobretudo água mineral natural, é outra realidade importante, mas não há nenhuma diretiva europeia que lhe seja específica.

A água mineral natural é um tipo específico de água, de características particulares, sujeita a legislação própria, e que tem apenas dois tipos de utilização: engarrafamento, para consumo humano, e termalismo, para cuidados de saúde. Esta atividade, reconhecida pela Organização Mundial da Saúde como uma atividade de medicina natural, é procurada sobretudo para o tratamento de patologias reumatológicas e respiratórias. Nesta situação, é frequente os utentes termais inalarem aerossóis de água mineral natural que, por imposição legal, não pode ser desinfetada, o que se pode traduzir num risco acrescido para o utente, caso esta se apresente contaminada. A diretiva europeia 2009/54/CE regulamenta a atividade de engarrafamento da água mineral natural, contem a definição deste tipo de água e apresenta os controlos analíticos e requisitos de qualidade microbiológica da água mineral natural na sua emergência. No entanto não se aplica ao termalismo, deixando esta atividade sem qualquer normativa europeia que a regule e transmita diretivas comuns a todos os Estados Membros. Em Portugal existe legislação específica para o setor termal, onde se inclui o controlo da qualidade microbiológica da água mineral natural utilizada em estabelecimentos termais (DL n° 142/2004; Portaria n° 1220/2000). Esta legislação contempla a pesquisa de indicadores de contaminação microbiológica e a pesquisa direta de alguns patogénicos na água mineral natural nos diversos locais de tratamento, mas não considera a qualidade microbiológica dos equipamentos termais, onde se podem encontrar bactérias sésseis em biofilmes, o estado ecológico mais frequente de *P. aeruginosa* (Ma *et al.*, 2003).



## I. Distribuição, persistência e diversidade genética de *P. aeruginosa*

Ao longo de 4 anos foi feita a pesquisa semanal de formas planctônicas de *P. aeruginosa* no sistema de adução e distribuição de água mineral natural de um estabelecimento termal português, composto por duas captações e 9 circuitos de distribuição. Coincidente com a característica mesofílica desta espécie, *P. aeruginosa* não foi detetada nos circuitos de temperaturas elevadas (55°C e 60°C), tendo apresentado uma distribuição homogênea pelo restante sistema. As captações e a piscina terapêutica apresentaram maior número de isolados, mas importa destacar que estes locais são constituídos por dois pontos de amostragem, o que aproxima, em média, a presença de *P. aeruginosa* nestes locais à observada nos restantes pontos do sistema. Durante este período, foi também realizada uma amostragem da superfície de todas as peças internas de um exemplar de cada equipamento existente no estabelecimento termal em estudo. Dessa amostragem obtiveram-se diversos isolados de *P. aeruginosa* em 6 dos 11 equipamentos amostrados, tendo-se preservado apenas parte dos isolados obtidos nos 3 únicos equipamentos associados a tratamentos respiratórios em que se detetou a presença de *P. aeruginosa*. Estes isolados representaram 32% do total de isolados termais de *P. aeruginosa* obtidos para este estudo, evidenciando a prevalência de *P. aeruginosa* em biofilmes nas peças internas dos equipamentos termais em relação aos isolados planctônicos, uma vez que foram obtidos a partir de um único momento de amostragem para cada um dos 3 equipamentos de que derivaram, em comparação ao período de 4 anos necessário para obter os restantes 68% dos isolados planctônicos de *P. aeruginosa* incluídos neste estudo, os únicos considerados no controlo da qualidade microbiológica definida pela Portaria nº 1220/2000.

Na análise da distribuição dos isolados planctônicos ao longo do tempo, é nítida a maior incidência desta bactéria na água termal no primeiro ano do estudo, e uma expressiva diminuição do seu número nos anos seguintes. Isto poderá ter-se verificado devido à implementação e melhoria de processos de desinfecção preventiva e intervenções técnicas no sistema de captação e distribuição da água mineral natural, adotadas em função dos resultados obtidos ao longo do período da vigilância. As higienizações e desinfecções químicas diárias ou bi-diárias do interior dos equipamentos termais, sobretudo daqueles onde foi detetada *P. aeruginosa*, poderão também ter contribuído significativamente para a involução do número de *P. aeruginosa* presente no sistema ao longo dos 4 anos de vigilância. Os estudos de diversidade genética realizados no presente trabalho permitiram observar a persistência e disseminação clonal de alguns genótipos nas captações, circuitos de distribuição e equipamentos, sugerindo a relação entre as formas sésseis e planctônicas no sistema, mas não foi possível analisar o impacto da higienização e desinfecção regular dos equipamentos termais na diminuição do número de *P. aeruginosa* presente na água mineral natural, por não ter sido viável avaliar e acompanhar a qualidade microbiológica do interior dos equipamentos ao longo do tempo, sobretudo após implementação dessas medidas.



Diversos estudos envolvendo populações clínicas de *P. aeruginosa* demonstram a sua diversidade genética e também a ocorrência de disseminação clonal por vários serviços hospitalares e até entre hospitais diferentes, a persistência no tempo de um ou vários clones e ainda a múltipla colonização de pacientes e de serviços hospitalares com diversos clones (Mahenthiralingam *et al.*, 1996; Nazik *et al.*, 2007; Bragonzi *et al.*, 2009; Deptula e Gospodarek, 2010; Fricks-Lima *et al.*, 2011; Morales-Espinosa *et al.*, 2012; Gomila *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2013). Estudos envolvendo populações ambientais de *P. aeruginosa*, sobretudo de água, são menos frequentes e estão habitualmente associados à rede de abastecimento aos hospitais, sendo estudadas para identificar a origem e disseminação dos isolados clínicos (Lomholt *et al.*, 2001; Finnan *et al.*, 2004; Lavenir *et al.*, 2008). Outros estudos comparam estirpes clínicas com estirpes de água de rios (Selezska *et al.*, 2012), piscinas (Ruimy *et al.*, 2001), água do mar (Khan *et al.*, 2007; Nonaka *et al.*, 2010) e ainda águas de profundidade (Feltman *et al.*, 2001), mas a maioria considera um número reduzido de estirpes ambientais. Lavenir *et al.* (2008) apresentam uma taxa de diversidade de 25,2%, analisando 127 isolados de água e torneiras de um hospital, tendo também demonstrado a disseminação e persistência no tempo de alguns dos clones obtidos. Selezska *et al.* (2012) referem que dos 381 isolados de diferentes rios alemães, colhidos no inverno de 2007 e verão de 2008, 324 eram não clonais, e dos 99 isolados clínicos 88 eram não clonais, equivalente a uma taxa de diversidade de 85% e 89%, respetivamente. Feltman *et al.* (2001) apresentam uma diversidade de 90,4% para os isolados clínicos e 80% para os isolados ambientais que estudaram. Outros estudos reportam taxas de diversidade de 49% (Nazik *et al.*, 2007; Morales-Espinosa *et al.*, 2012), 97% (Deptula e Gospodarek, 2010), 53% (Gomila *et al.*, 2013) e 56% (Pereira *et al.*, 2013) para populações clínicas de *P. aeruginosa*, salientando alguns a persistência no tempo, a disseminação clonal e a múltipla colonização (Nazik *et al.*, 2007; Morales-Espinosa *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2013).

No presente trabalho, a diversidade genética das duas populações em estudo foi avaliada por PFGE, tendo-se determinado uma taxa de diversidade de 66,3% para a população termal e 58% para a clínica. Foi também feita uma tipagem inicial à população termal, utilizando a técnica de RAPD, tendo-se observado uma percentagem de diversidade de 40,3%. Estes resultados estão de acordo com o descrito por Kersulyte *et al.* (1995), que referem um menor poder discriminante para a técnica de RAPD em relação a PFGE, e Renders *et al.* (1996), que consideram a técnica de RAPD um bom método inicial para a tipagem genética de *P. aeruginosa* e a técnica de PFGE útil para uma maior discriminação genética dos resultados obtidos pela técnica de RAPD. Os fenómenos de concomitância e dispersão física e temporais já conhecidos nas populações clínicas foram neste estudo observados na população termal, evidenciando a riqueza genética destes isolados e afastando a hipótese de disseminação de um número reduzido de clones pelo sistema termal. Foi ainda possível observar a múltipla colonização nos equipamentos termais, também observada por Mahenthiralingam *et al.* (1996) e Nazik *et al.* (2007) em pacientes com fibrose quística. Conclui-se assim que a população termal de *P. aeruginosa* apresenta uma diversidade genética similar à de populações clínicas já descritas, em termos quantitativos e qualitativos.

## 2. Virulência e infecção

Ruimy *et al.* (2000) demonstram no seu trabalho que não há uma separação filogenética clara entre estirpes patogênicas e não patogênicas e Selezska *et al.* (2012) evidenciam que são as estirpes ambientais que têm impacto na microevolução da espécie e não as estirpes clínicas, destacando que o conhecido “pool” de virulência e resistência antimicrobiana das estirpes clínicas se encontra primordialmente nas estirpes ambientais, tornando-as assim importantes de estudar, para melhor perceber a fisiologia e diversidade desta bactéria. Já Alonso *et al.* (1999b) observam no seu trabalho que as estirpes clínicas, ao contrário de serem patogênicos especializados, são estirpes que tiveram uma origem ambiental e foram capazes de infectar pacientes imunocomprometidos utilizando as características que possuíam ou adquiriram para sobreviver em ecossistemas naturais.

Vários estudos comparam a virulência de isolados clínicos com isolados de origem aquática (Janda *et al.*, 1980; Janda and Bottone, 1981; Nicas e Iglewski, 1986; Alonso *et al.*, 1999b; Feltman *et al.*, 2001; Lomholt *et al.*, 2001; Wolfgang *et al.*, 2003; Finnan *et al.*, 2004; Lavenir *et al.*, 2008; Bradbury *et al.*, 2010; Selezka *et al.*, 2012), outros reportam a incidência de fatores de virulência apenas em isolados ambientais (da Silva *et al.*, 2008; Lamrani *et al.*, 2010; Kaszab *et al.*, 2011) e outros apenas em isolados clínicos (Woods *et al.*, 1986; Hamood *et al.*, 1996; Deptula e Gospodarek, 2010; Mitov *et al.*, 2010; Finlayson e Brown, 2011). Não foi possível encontrar na literatura nenhum trabalho que reportasse a prevalência de fatores de virulência num número expressivo de isolados de *P. aeruginosa* obtidos a partir de água mineral natural, e nenhum relativo a água mineral natural associada ao termalismo. Além disso, a maioria dos trabalhos sobre isolados clínicos e aquáticos apresenta um número bastante reduzido de isolados aquáticos em comparação ao número de isolados clínicos que estudam.

No presente trabalho foram evidentes e estatisticamente significativas as diferenças observadas na distribuição dos fenótipos de virulência entre as duas populações analisadas, sendo todos mais prevalentes na população termal (“swarming”, lipase, elastase, protease, lecitinase, ramnolípido, piocianina, fosfolipase C, formação de biofilmes, pioverdina), exceto “swimming” e “twitching”. Quanto aos genes associados à virulência, não foram observadas diferenças tão evidentes entre as duas populações. Dos 19 genes estudados, 2/3 apresentaram-se homogeneamente distribuídos (*orfF*, *pilA*, *pilB*, *lecA*, *lecB*, *phzS*, *phzI*, *phzII*, *apr*, *exoA*, *exoS*, *exoT*), tendo apenas 5 demonstrado maior prevalência na população termal (*flaG*, *phzH*, *lasB*, *exoY* e *exoU*) e 2 na população clínica (*phzM*, *lasA*). A literatura disponível contradiz, no geral, estes resultados, quer em termos comparativos entre os isolados clínicos e ambientais, quer na prevalência dos diversos fatores de virulência, situada abaixo dos valores aqui reportados, sendo poucos os trabalhos que apresentam valores semelhantes aos observados no presente estudo [Lomholt *et al.*, 2001; da Silva *et al.*, 2008; Hauser, 2009; Kaszab *et al.*, 2011; Selezska *et al.*, 2012].





Janda *et al.* (1980) reportam que dos 22 isolados ambientais estudados apenas 54% apresentaram atividade proteolítica contra 98% dos 54 isolados clínicos. Janda e Bottone (1981) comparam um maior número de fenótipos de virulência, sobretudo enzimas degradativas, entre isolados clínicos e ambientais, observando uma prevalência significativamente maior de elastase, protease, lipase e piocianina nos isolados clínicos de expetoração (n=20) em relação aos isolados ambientais de água (n=12) e solo (n=10). Apenas lecitinase apresentou valores superiores nos isolados ambientais (64%/45%), mas situaram-se longe dos valores observados no presente trabalho. Nicas e Iglweski (1986) estudam a prevalência de elastase, protease e fosfolipase C em isolados clínicos (n=41) e de rios (n=30), tendo observado níveis similares de todos os fenótipos nas duas amostras, assim como Alonso *et al.* (1999b) quando comparam a atividade proteolítica e hemolítica de isolados clínicos (n=17) e ambientais (n=7), o que contraria o reportado por Janda e Bottone (1981) mas também o presente estudo, uma vez que detetámos diferenças estatisticamente significativas na prevalência destes fenótipos entre as duas populações. Lomholt *et al.* (2001) comparam quantitativamente a atividade elastolítica e proteolítica de isolados clínicos (n=145) e ambientais [n=7 (5 de água)] de origens geográficas diversas, verificando uma maior atividade elastolítica dos isolados ambientais face aos isolados de urina, pulmões, ouvidos, sangue e feridas. Finnan *et al.* (2004) comparam 11 isolados clínicos com 4 isolados do ambiente hospitalar, estudando 12 fenótipos de virulência e observam pequenas variações nas características fenotípicas estudadas, exceto para a produção de fenazinas e elastase, que se revelou exclusiva dos isolados clínicos. Selezska *et al.* (2012) apresentam uma maior prevalência da atividade proteolítica, “twitching” e “swarming” nos isolados ambientais, concordante com o presente estudo.

Considerando os trabalhos que estudaram fenótipos de virulência apenas em isolados ambientais, da Silva *et al.* (2008) reportam 100% de atividade hemolítica nos 30 isolados aquáticos (água de torneira, água mineral engarrafada e água de profundidade) estudados, no Brasil, e uma percentagem média de 35,5% de capacidade de aderência a diferentes materiais (plástico, vidro e silicone). Estes resultados assemelham-se aos observados no presente estudo, admitindo a analogia entre a atividade hemolítica no estudo de da Silva *et al.* (2008) e a pesquisa de lecitinase no nosso trabalho. Por outro lado, Lamrani *et al.* (2010) reportam apenas 9,1% de atividade hemolítica em *P. aeruginosa* de águas de profundidade, não mineral, de Marrocos. Não foram encontrados outros estudos que reportassem fenótipos de virulência apenas em isolados aquáticos de *P. aeruginosa*.

Dos estudos que envolvem apenas isolados clínicos, Woods *et al.* (1986) comparam diversos tipos de isolados clínicos (infecções de queimaduras, pele, urina, pneumonias, sangue e fibrose quística) (n=132) quanto à quantidade de elastase, protease e fosfolipase C produzidas e observam níveis de elastase e protease significativamente inferiores nos isolados de fibrose quística do que nos outros grupos de isolados, em particular quanto aos isolados de pneumonias, que evidenciaram níveis bastante mais elevados de elastase que os restantes. Os autores observam ainda que foram produzidos níveis mais elevados de fosfolipase C nos isolados de urina e de sangue do que nos restantes isolados. Deptula e Gospodarek (2010)

ao estudarem estirpes clínicas multirresistentes (n=75) e suscetíveis (n=75) quanto à prevalência da atividade de elastase, protease, lipase, fosfolipase C, produção de piocianina e formação de biofilmes, observam uma diminuição da atividade da maioria dos fenótipos estudados nas estirpes multirresistentes, exceto para a atividade proteolítica. Finlayson e Brown (2011) estudam também isolados clínicos de diversas origens (expectoração, zaragatoas do trato respiratório, feridas, urina, etc.), num total de 57 isolados não-clonais, comparando as estirpes pigmentadas (produtoras de piocianina e/ou pioverdina) com estirpes não pigmentadas e concluem que os isolados pigmentados produzem mais elastase, protease e lipase que os não pigmentados e ainda que todos os isolados pigmentados (n=47) apresentam o fenótipo “twitching” e nenhum isolado não-pigmentado (n=10) o apresentou. No presente trabalho, a produção de piocianina ou pioverdina não se apresentou estatisticamente associada a nenhum dos fenótipos reportados por Finlayson e Brown (2011).

Na literatura disponível, os genes que codificam as exoproteínas excretadas pelo T3SS, *exoS*, *exoT*, *exoU* e *exoY*, são os mais estudados e comparados entre diferentes populações de *P. aeruginosa*. Na revisão da literatura feita por Hauser (2009), o autor refere taxas de prevalência em isolados de infecções agudas de 58-72% para o gene *exoS*, 92-100% para o gene *exoT*, 28-42% para o gene *exoU* e 89% para o gene *exoY*. Estes dados são concordantes com os descritos para a população termal, que apresentam valores dentro ou próximos dos intervalos referidos, mas não para a população clínica. Nesta, apenas os genes *exoS* e *exoT* apresentaram valores dentro ou próximos dos intervalos referidos por Hauser (2009). O autor destaca ainda a exclusividade da presença de *exoS* ou *exoU* na maioria das estirpes de *P. aeruginosa*, referindo serem raras aquelas que apresentam simultaneamente estes 2 genes, por razões ainda não esclarecidas. No presente trabalho, observou-se a presença conjunta destes 2 genes em 13 dos 51 isolados termais (25,5%) e em apenas 1 isolado clínico, dos 39 avaliados (2,6%). Bradbury *et al.* (2010) apresentam idênticos resultados no seu trabalho, quando comparam isolados do ambiente hospitalar com isolados de infecções respiratórias. Hauser (2009) sugere ainda a origem ambiental do T3SS e das suas exoproteínas, para facilitar a sobrevivência desta bactéria em ambientes onde a predação e a competição por alimentos é elevada, através da injeção de toxinas nas células dos seus predadores ou competidores. O presente estudo confirma esta assunção, no que concerne à maior prevalência destes genes na população termal e à incidência da presença conjunta dos genes *exoS* e *exoU* nestes isolados. Esta evidência suporta também a origem ambiental dos isolados de *P. aeruginosa* presentes no estabelecimento termal.

Quanto a outros genes associados à virulência, a literatura é menos profícua em informação. Finnan *et al.* (2004) reportam a elevada prevalência dos genes *lasB*, *phzM*, *phzS* e *phzI* e a reduzida ocorrência dos genes *apr*, *lasA* e *pilA* nos 11 isolados clínicos que estudaram, e referem que os 5 isolados ambientais estudados foram todos negativos para a pesquisa dos genes *apr*, *pilA* e *pilB*. Bradbury *et al.* (2010), ao estudarem a prevalência dos genes *apr*, *lasB*, *phzH*, *phzM*, *phzS*, *phzI*, *phzII* em 25 isolados de infecções respiratórias, 25 do ambiente hospitalar (essencialmente lavatórios) e 10 de origem comunitária (piscinas,



efluentes, rios, água de profundidade e spas), verificam que todos os isolados apresentam os genes *apr*, *lasB* e os operões *phzI* e *phzII*, e mais de 95% de todos os isolados apresentam *phzH*, *phzM* e *phzS*. Mitov *et al.* (2010) estudaram 160 isolados nosocomiais e 42 de fibrose quística quanto à presença de *pilB* e *lasB* e obtiveram percentagens de prevalência de 23,8% e 100%, bastante diferentes daquelas aqui observadas. Finlayson e Brown (2011) reportam uma prevalência significativamente maior do gene *lasB* em relação ao gene *lasA* em isolados clínicos, contrariando o observado neste trabalho. Kaszab *et al.* (2011) observam uma prevalência de 100% do gene *exoA* em isolados ambientais de *P. aeruginosa* presentes em composto, o que se aproxima dos resultados obtidos no presente estudo.

A diversidade de resultados reportados em populações distintas de *P. aeruginosa* é o reflexo da diversidade da carga virulenta associada a diferentes populações de *P. aeruginosa* quando colonizam diferentes habitats, compatível com o facto de que os fatores de virulência são considerados características variáveis, expressos em função das necessidades de resposta da bactéria às condições ecológicas onde se encontra (Feltman *et al.*, 2001). Os resultados aqui apresentados demonstram, pela primeira vez, a adaptação de *P. aeruginosa*, em termos de virulência, ao nicho específico de um sistema de adução, distribuição e utilização de água mineral natural para fins terapêuticos. Outros estudos semelhantes, realizados noutros estabelecimentos termais do país e de outros países, seriam importantes para avaliar a particularidade, ou não, da virulência associada aos isolados termais de *P. aeruginosa*. Este conhecimento traria informação útil para a avaliação do risco associado à presença deste patogénico oportunista em estabelecimentos termais, sobretudo nos biofilmes do interior dos equipamentos termais, de onde se podem libertar devido a forças hidrodinâmicas variáveis durante o funcionamento do equipamento (Webb, 2007) e assim alcançar os pulmões dos termalistas.

Para complementar a informação relativa à prevalência dos fatores de virulência nas populações, procurou-se também conhecer as relações globais de dependência dos fatores de virulência entre si dentro de cada população, e ainda avaliar eventuais associações dos fatores de virulência com os locais de origem dos isolados termais no sistema de adução, distribuição e utilização da água mineral natural. Na literatura, a única associação entre fatores de virulência estudada dentro de uma população é aquela relativa aos genes *exoS* e *exoU*, acima abordada, contudo outras relações podem ser descuradas. Para obviar essa lacuna, recorreu-se à análise de correspondências múltiplas (ACM) para descrever simultaneamente as relações globais dos vários fenótipos ou genes de virulência dentro de cada população, com a vantagem de as representar graficamente num mapa perceptual, discriminando-as pelas suas modalidades (presente/ausente). A ACM permite visualizar essas relações, averiguar se as variáveis de interesse se afastam do pressuposto de independência, sugerindo possíveis associações, e ainda perceber como se dão essas associações (Greenacre, 2008). Sendo a ACM uma técnica exploratória, as conclusões obtidas foram validadas por testes do qui-quadrado de independência entre os vários fenótipos de virulência, 2 a 2, e a intensidade das associações estatisticamente significativas encontradas foi analisada através da interpretação dos valores do

coeficiente Phi. Estes resultados permitiram melhorar as representações gráficas fornecidas pela ACM, através da demarcação com circunferências das modalidades correspondentes às variáveis que apresentaram associações estatisticamente significativas, tendo-se integrado nessa representação a informação dada pelo coeficiente Phi. Esta estratégia revelou-se adequada e útil para a população termal, mas menos eficaz para a população clínica. Nesta população, o número de isolados utilizados foi mais reduzido, o que diminuiu a robustez da ACM, atendendo ao número de variáveis intervenientes na análise. Um maior número de observações poderá obviar esta questão em futuros estudos.

Apesar da importância dos resultados dos testes de qui-quadrado em termos inferenciais, estes não nos permitem detetar relações estatisticamente não significativas mas que podem ser úteis para a compreensão global da cadeia de relações de diversos fatores, sobretudo em contexto ecológico (Ramette, 2007). Estes testes envolvem apenas duas variáveis de cada vez, não tendo em conta a influência de outras variáveis, o que é visível nos gráficos gerados pela ACM, traduzindo-se numa vantagem desta técnica. Acresce ainda a vantagem desta análise permitir a inclusão de variáveis suplementares que não influenciam a análise propriamente dita mas que são também representadas nos mapas percetuais, permitindo a interpretação das suas relações com as variáveis ativas, acrescentando assim informação não disponibilizada de outra forma (Le Roux e Rouanet, 2004; Carvalho, 2008; Pestana e Gageiro, 2008; Greenacre, 2008). Tal estratégia foi utilizada para a interpretação das relações das modalidades dos fenótipos e genes de virulência com os locais de origem dos isolados na amostra termal. Ramette (2007) refere a vantagem que a análise de correspondências apresenta para a determinação de padrões de comportamento de populações microbianas face a fatores exógenos como a origem geográfica ou a estrutura do habitat onde se encontram, o que suporta a estratégia aqui adotada.

As ACMS dos fenótipos de virulência não apresentaram muita utilidade na comparação entre as duas populações, devido à elevada prevalência dos fenótipos de virulência na população termal, limitando-se a análise comparativa das duas populações a essa evidência. Comparando as populações quanto às relações dos genes de virulência observaram-se algumas diferenças importantes em todos os grupos de genes, exceto nos genes envolvidos na síntese de fenazinas. Em ambas as populações estes genes associaram-se entre si e com a maioria dos outros grupos de genes, à exceção do gene *phzI* na população termal, que não apresentou qualquer associação com os restantes genes do seu grupo. As fenazinas, para além dos efeitos nefastos para as células do hospedeiro quando a bactéria está a causar infeção (Strateva e Mitov, 2011), servem como transportadoras de eletrões, atuam como sinais celulares que regulam a expressão genética, contribuem para a formação de biofilmes e aumentam a sobrevivência bacteriana, sendo bastante importantes para a célula (Pierson e Pierson, 2010). Isto poderá explicar a elevada prevalência e associações dos genes envolvidos na sua biossíntese em ambas as populações. As associações relativas aos outros grupos de genes foram distintas nas duas populações. Enquanto na população termal se observaram várias associações entre os genes de mobilidade, os genes de enzimas proteolíticas e os genes



codificadores das exotoxinas do T3SS, na população clínica esses genes associaram-se pouco e, em geral, quase só com os genes envolvidos na biossíntese de fenazinas. Estes resultados reforçam a evidência da adaptação genética das populações de *P. aeruginosa* a diferentes ambientes, reportada sobretudo em estudos associados a infecções por *P. aeruginosa* em doentes com fibrose quística (Bragonzi *et al.*, 2009; Fricks-Lima *et al.*, 2011; Lorè *et al.*, 2012), sugerindo que essa seleção genética é determinada por diferentes tendências de associação, em função do tipo de população, como demonstrado pelos resultados das ACMs para as duas populações em estudo.

Uma vez que os fatores de virulência são características naturais que as bactérias têm para evitar ou sobreviver à predação no meio ambiente (Engel e Balachandran, 2009; Hauser, 2009), não é surpreendente verificar que os isolados termais apresentem maior número de associações entre os seus genes de virulência mas mais fracas que as observadas nos isolados clínicos, de modo a manter um maior número de possibilidades de resposta a alterações das condições ecológicas. A água mineral natural, com cerca de  $10^8$  microrganismos/ml, é um ambiente oligotrófico, onde a biodisponibilidade de nutrientes é muito baixa e a competição por nutrientes e a predação é muito elevada (Leclerc e Moreau, 2002), exigindo das bactérias presentes neste ambiente a capacidade de adotarem estratégias diversas em função das flutuações das condições ecológicas, como os presentes resultados parecem evidenciar, sugerindo a origem ambiental das estirpes de *P. aeruginosa* isoladas do sistema de adução, distribuição e utilização do estabelecimento termal em estudo. Ao analisar nos mapas percutuais da ACM a distribuição dos fenótipos e genes de virulência nos isolados em função dos seus locais de origem, ainda que não havendo associações estatisticamente válidas, provavelmente devido ao número reduzido de observações em cada um dos locais, foi possível verificar algumas tendências distintas na carga fenética e genética dos isolados termais em função dos locais de origem, evidenciando assim a capacidade de adaptação da virulência em função do local abiótico de colonização. Esta observação destaca ainda a possibilidade de potenciais riscos diferentes para a saúde dos utentes termais em função dos locais de tratamento, caso essas diferenças do “pool” virulento dos isolados nos diferentes locais se traduza em diferentes capacidades infetivas.

Ensaio de infeção realizados com isolados de diferentes equipamentos termais revelaram valores de LD<sub>50</sub> muito diferentes, com variações da ordem de grandeza de até 10x entre diferentes equipamentos, o que sugere a possibilidade dos utentes termais estarem expostos a diferentes riscos em função dos tratamentos que executam. A média das LD<sub>50</sub> obtidas nos 3 equipamentos termais é idêntica à média das LD<sub>50</sub> observadas nos isolados de expetoração e aspirados respiratórios, indiciando uma capacidade de causar infeção aguda semelhante entre os isolados dos biofilmes dos equipamentos termais associados a tratamentos respiratórios e os isolados clínicos que estão já a causar infeção respiratória. Estes dados poderão ser preocupantes, considerando o número de utentes que procuram as termas para tratar afeções respiratórias, equivalente a cerca de 25% do total de utentes termais portugueses, acrescida ainda pela falta

de vigilância microbiológica direcionada a formas sésseis de microrganismos patogénicos presentes nos equipamentos, como demonstrado no presente trabalho.

Ainda que os programas oficiais de controlo da qualidade microbiológica impostos pela DGS determinem a realização de colheitas semanais por cada tipo de equipamento, referem-se apenas a amostras de água, não considerando, portanto, o produto final oferecido ao utente, que é o aerossol de água termal. Este pode conter microrganismos que se libertam dos biofilmes presentes no interior dos equipamentos durante o seu funcionamento e que, por isso, não estão presentes na água amostrada para o controlo oficial, podendo esta não representar, assim, a real qualidade microbiológica dos tratamentos termais. Webb (2007), na sua revisão acerca da diferenciação e dispersão de biofilmes, refere, por um lado, a prevalência das formas sésseis bacterianas no ambiente, e por outro, o facto de que os biofilmes são agregados complexos de células bacterianas que regularmente atravessam fases de dispersão de células planctónicas, originadas pela conversão de células sésseis presentes na matriz do biofilme em formas livres, flageladas, para que estas possam ir colonizar novos nichos ecológicos. Acresce a esta dinâmica intrínseca de dispersão celular dos biofilmes, o facto de que muitas células bacterianas podem libertar-se dos biofilmes por processos passivos, devido à erosão ou descamação da superfície do biofilme causada pelas alterações bruscas no fluxo hidrodinâmico (Stoodley *et al.*, 2002; Webb, 2007). Mena e Gerba (2009) referem que aerossóis contaminados por *P. aeruginosa* são umas das vias de contaminação associada a esta bactéria de maior risco para a saúde pública, seguida da contaminação da pele ocorrida em sistemas de hidromassagem, outro dos equipamentos onde foram detetados isolados de *P. aeruginosa* nos biofilmes das suas peças.

Os equipamentos termais de aerossolização da água termal, além de apresentarem elevada prevalência de *P. aeruginosa* em biofilmes, são sujeitos a diferentes taxas hidrodinâmicas durante a execução dos tratamentos termais, o que poderá motivar a libertação de células bacterianas durante a realização dos tratamentos, colocando assim no aerossol termal, inalado pelos utentes, *P. aeruginosa* com uma capacidade infetiva semelhante à dos isolados clínicos de infeções respiratórias. Contudo, ainda que tendo-se demonstrado neste trabalho a maior prevalência de *P. aeruginosa* nos biofilmes de equipamentos termais, sobretudo naqueles associados aos tratamentos das vias respiratórias, desconhece-se até que ponto e com que frequência a hidrodinâmica do funcionamento dos equipamentos promove a libertação de células bacterianas, e se essa libertação é em quantidade suficiente para causar doença ao utente termal. O conceito de dose-resposta deve ser considerado nesta assunção, uma vez que é necessário um número mínimo de células bacterianas para que estas consigam desencadear um processo infeccioso, dependente também da condição de saúde do indivíduo contaminado, atendendo a que, o processo infeccioso é um equilíbrio, ou desequilíbrio, de forças entre o agente patogénico e o hospedeiro (Casadevall e Pirofski, 2009). Mena e Gerba (2009) referem que doses de  $10^7$  células de *P. aeruginosa* administradas por aerossolização a ratinhos causam sintomas de doença, e doses de  $10^9$  células se revelam letais, não identificando, contudo, a



origem ou características de virulência das células de *P. aeruginosa* testadas. No presente trabalho, observaram-se doses letais para 50% das larvas de *G. mellonella* da ordem de  $10^2$ - $10^4$  células/larva para a maioria dos isolados testados, o que sugere a necessidade de uma menor dose de *P. aeruginosa* de origem termal para causar doença.

Vinogradova *et al.* (2009) demonstram que as doenças reumáticas são um fator de risco para a pneumonia e Teixeira (2012) refere que mais de 50% dos utentes termais portugueses procuram esta medicina natural para o tratamento de patologias reumáticas e 25% para o tratamento de patologias respiratórias, aumentando assim para 75% a percentagem de utentes termais portugueses com fatores de risco para infeções respiratórias. Os isolados de *P. aeruginosa* presentes nos biofilmes das peças internas dos equipamentos utilizados para o tratamento de afeções reumáticas (banheiras de hidromassagem, duches de Vichy e de jato) não foram preservados para este estudo, mas os fenómenos de libertação de isolados a partir de biofilmes abióticos são comuns aos diversos equipamentos e circuitos de água termal, pelo que estudos alargados a estes equipamentos deveriam ser realizados para melhor avaliar os riscos associados à prática termal num todo e não apenas à prática termal associada às patologias respiratórias. Além disso, a libertação de aerossóis de água termal durante a realização dos diversos tratamentos de duche e imersão é uma realidade, pelo que os utentes termais que utilizam estes equipamentos estão também sujeitos à inalação de aerossóis que poderão estar contaminados com *P. aeruginosa*. Na amostragem inicial dos equipamentos termais, ainda que não tenha sido possível quantificar e preservar os isolados de *P. aeruginosa* observados nos equipamentos de duche e imersão, foi possível verificar a presença deste agente patogénico nesses locais, pelo que o seu estudo seria também importante.

Os requisitos de admissão dos utentes à prática termal parecem conseguir minimizar os riscos de infeção, uma vez que esta é vedada a doentes que se apresentem debilitados no seu estado geral de saúde ou com processos agudos de patologias aquando do início dos seus tratamentos termais (Teixeira, 2012). A dinâmica de todos estes fatores determinará a possibilidade de ocorrerem infeções por *P. aeruginosa* associadas à prática termal, e entendemos que estudos que permitam clarificar o número de células de *P. aeruginosa* presentes nos aerossóis de água termal deveriam ser conduzidos, a fim de permitir uma melhor avaliação dos riscos associados à prática termal. Esta informação permitiria também avaliar a necessidade de revisão da legislação atual quanto às amostras consideradas adequadas para a determinação da qualidade microbiológica dos diferentes tratamentos termais, que poderá ser diferente da qualidade microbiológica da água mineral natural nos circuitos de distribuição que os abastecem.

Não se conhecem muitos trabalhos que tratem o problema de infeções causadas pela prática termal, mas é interessante registar o surto de pneumonias reportado por Schilliger e Bardelay (1989) associadas à realização de tratamentos termais de nebulização coletiva, num estabelecimento termal francês. Este tratamento terá sido executado com equipamentos semelhantes ao equipamento nebulizador coletivo que, no

presente trabalho, foi o que apresentou maiores valores de LD<sub>50</sub>, equivalentes a uma menor capacidade infetiva. Desconhece-se o quão semelhantes aos atuais seriam os equipamentos utilizados há mais de 20 anos por essas termas e não existem estudos que associem casos de doença à prática termal utilizando os equipamentos que no presente trabalho apresentaram isolados com maior capacidade infetiva, pelo que esta aparente contradição entre o surto reportado por Schilliger e Bardelay (1989) e os presentes dados sobre a capacidade de causar infeção aguda por um isolado obtido de um equipamento de nebulização coletiva deve ser relativizada. Outro estudo descreve um surto de 35 pneumonias e 2 meningites também num estabelecimento termal francês, em 1987, nada referindo acerca dos equipamentos utilizados pelos utentes (Hubert *et al.*, 1988). Também Bornstein *et al.* (1989) ou Rocha *et al.* (1995), quando estudaram a presença de *Legionella* em estabelecimentos termais franceses e portugueses, respetivamente, nada indicam sobre os equipamentos utilizados nos estabelecimentos estudados. Schilliger e Bardelay (1989) salientam ainda a dificuldade de associar eventuais episódios infecciosos à prática termal por estes poderem manifestar-se apenas após o fim da cura, dificultando a associação causa-efeito à prática termal. Estudos epidemiológicos associados à prática termal deveriam ser conduzidos, a fim de colmatar também esta falta de informação, importante para a correta avaliação do risco associado à prática termal.

Por último, importa referir que, na sua maioria, os resultados relativos aos ensaios de infeção aguda em larvas de *Galleria mellonella* foram concordantes com o observado nos mapas percentuais gerados pela ACM dos genes associados a virulência da amostra termal. Nestes, o equipamento de nebulização coletiva, com maior LD<sub>50</sub>, foi representado nos quadrantes onde se encontravam os centróides que representavam a ausência de genes de virulência, enquanto o equipamento de aerossol manossónico, com menor LD<sub>50</sub>, foi representado junto a centróides relativos à presença de genes de virulência. Quanto à ACM dos fenótipos de virulência, por razões anteriormente discutidas, não foi possível considerar relações evidentes entre os fenótipos e os locais no sistema termal, contudo, o centróide do equipamento de aerossol manossónico apresentou-se próximo do centróide relativo à presença de piocianina, sugerindo uma maior probabilidade destes isolados produzirem piocianina do que os restantes isolados do sistema. Lau *et al.* (2004) evidenciaram a importância crítica da piocianina na infeção pulmonar, o que, atendendo ao observado no mapa percentual da ACM, se pode assumir como mais um potencial risco para este tratamento termal.





### 3. Desinfecção e antibióticos

O DL nº 142/2004 refere a obrigação do titular do estabelecimento termal em “assegurar as condições necessárias à preservação da qualidade da água, (...), bem como nos pontos de utilização da água”. Para tal, são habitualmente implementados processos regulares de desinfecção química dos circuitos de distribuição da água mineral natural, efetuados fora do período de funcionamento do estabelecimento termal, uma vez que durante a atividade há a obrigatoriedade de oferecer a água termal inalterada química e microbiologicamente. No caso particular do estabelecimento termal do qual se obtiveram os isolados de *P. aeruginosa* para este estudo, efetuam-se desinfecções químicas com uma frequência mediana semanal, utilizando hipoclorito de sódio a uma concentração de 2 a 10 ppm, distribuído por todo o sistema, onde permanece durante 12 ou 2 horas, respetivamente (informação pessoal). Contudo, está reportada a resistência desta bactéria à desinfecção com cloro livre, sendo encontrada em piscinas, jacúzis e sistemas de distribuição de água (Daneshvar *et al.*, 2007).

Em ambiente hospitalar são sobejamente conhecidos os recorrentes processos de higienização e desinfecção das áreas comuns e equipamentos não autoclaváveis. *P. aeruginosa* é conhecida pela sua capacidade de resistir e até crescer em desinfetantes biocidas utilizados em hospitais, sobretudo quando presente em biofilmes (Tabata *et al.*, 2003; Kerr e Snelling, 2009). Estima-se que 65% das infeções nosocomiais têm origem em bactérias presentes em biofilmes dos equipamentos hospitalares, tendo-se também demonstrado que as doses recomendadas de biocidas conseguem destruir apenas cerca de 20% das células de biofilmes de *P. aeruginosa* contra cerca de 90% dos biofilmes de *Staphylococcus aureus* metilicina-resistente (Smith e Hunter, 2008).

Desinfecções físicas por radiação ultravioleta revelaram-se eficazes para desinfetar alguns equipamentos hospitalares mas apenas para períodos de exposição muito prolongados, como refere Bak *et al.* (2010), destacando que a eficácia de desinfecção por este processo difere quanto ao tipo de material a desinfetar e o tempo de exposição. Estes autores referem ainda que, para além do material do equipamento, a espessura do próprio biofilme afeta a eficácia de desinfecção, dado conterem partículas que absorvem ou dispersam a luz, impedindo assim que a luz radiante atinja todas as células presentes na matriz glicoproteica do biofilme. Contudo, este método é considerado adequado para a desinfecção da água, com a vantagem de não deixar residual desinfetante, nocivo para a saúde (OMS, 2006; Daneshvar *et al.*, 2007). A utilização de unidades emissoras de radiação ultravioleta em equipamentos termais de aerossóis foi implementada há cerca de 10 anos pelo principal fabricante europeu destes tipos de equipamentos. Estes emissores, ainda que atuando sobre a parte interna dos equipamentos, fazem-no durante curtos períodos de tempo, de cerca de 1 minuto, entre cada aplicação de tratamentos (informação pessoal), e desconhece-se a sua eficácia.



Os ensaios de resistência a hipoclorito e exposição a radiação ultravioleta mostraram uma maior capacidade de resistência a estes agentes desinfetantes nos isolados termais, com significância estatística. Quanto ao ensaio com radiação ultravioleta, destaca-se a capacidade de regeneração celular destes isolados, representada pelo aumento consistente do crescimento bacteriano após segundo período de incubação de 24 horas. Importa também referir que 1 minuto de exposição a UV foi bastante mais eficaz que 30 segundos de exposição para os isolados planctónicos, e a diferença no tempo de exposição foi menos relevante para os isolados obtidos a partir dos biofilmes das partes internas dos equipamentos termais. Não tendo sido possível determinar os processos envolvidos nestas diferenças de comportamento dos isolados planctónicos e de biofilmes, julgamos ser pertinente a abordagem desta questão em estudos futuros. Quanto aos isolados clínicos, não se evidenciaram diferenças significativas na resposta à radiação ultravioleta por isolados obtidos de diferentes produtos biológicos demonstrando uma maior homogeneidade na população clínica relativamente a este processo. No entanto, importa salientar o comportamento de um isolado, obtido a partir de aspirados respiratórios, que apresentou um elevado crescimento bacteriano em ambos os ensaios realizados, sugerindo a possível existência de estirpes muito resistentes à radiação ultravioleta em ambiente hospitalar. O isolado em causa foi obtido em Março de 2009 na UCI. Os restantes 11 isolados obtidos nesta unidade não revelaram comportamentos distintos da restante amostra face à exposição à radiação.

Alguns autores reportam a resistência a radiação ultravioleta por isolados de *P. aeruginosa* presentes em sistemas de distribuição de água (Daneshvar *et al.*, 2007; Said *et al.*, 2011), mas não foi encontrada nenhuma literatura que descreva a resistência de *P. aeruginosa* de origem clínica à radiação ultravioleta. Thai *et al.* (2005) reportam até uma maior eficácia da luz ultravioleta na desinfeção de feridas infetadas por *P. aeruginosa* em comparação a feridas infetadas por *S. aureus* metilicina-resistente, sugerindo a sua utilização mais alargada nos hospitais, para o tratamento destas infeções. Os presentes resultados suportam, em parte, essa evidência. Contudo, ainda que os isolados clínicos de *P. aeruginosa* estudados tenham revelado uma maior suscetibilidade à radiação ultravioleta, a ocorrência de 1 isolado muito resistente leva a supor o possível aumento de estirpes resistentes a ultravioleta nos isolados clínicos, caso esta estratégia de desinfeção comece a ser utilizada em ambiente hospitalar duma forma regular.

Moore *et al.* (2012) estudaram a eficácia da radiação ultravioleta na desinfeção de diversos equipamentos hospitalares, demonstrando a sua eficácia, mas alertaram para o problema da baixa penetração da radiação e do sombreamento durante o processo, o que pode por em causa a sua eficácia. Este aspeto deve também ser considerado para a desinfeção por radiação ultravioleta que se pretende para os equipamentos de aerossol nos estabelecimentos termais, pelo que sugerimos a realização de estudos direccionados para este tema, uma vez que à presente data, não há literatura técnica ou científica que demonstre a real eficácia deste tratamento nos equipamentos termais.

Diversos autores referem que a resistência a diferentes tipos de desinfetantes, incluindo cloretos, pode promover a resistência a antibióticos em ambiente hospitalar (Fraise, 2002; Mc Cay *et al.*, 2009; D'Arezzo *et al.*, 2012), alimentar (Langsrud *et al.*, 2003) e aquático (Shrivastava *et al.*, 2004; Xi *et al.*, 2009). No presente estudo observou-se o oposto, com os isolados termais, suscetíveis aos antibióticos testados, a apresentarem maior capacidade de resistência à presença de cloro livre e à radiação ultravioleta do que os isolados clínicos, que apresentaram uma significativa resistência global aos antibióticos. Enquanto todos os isolados termais foram sensíveis aos 7 antibióticos testados (exceto um isolado resistente ao imipenemo e dois resistentes ao aztreonam), os isolados clínicos apresentaram diferentes perfis de resistência a antibióticos mas comportamentos semelhantes na presença de hipoclorito. Importa referir que este agente químico desinfetante não é utilizado em ambiente hospitalar, o que poderá estar implicado na homogeneidade da resposta dos isolados clínicos. Por outro lado, atendendo a que o sistema de onde os isolados termais foram recolhidos é recorrentemente sujeito a desinfecções com este agente, podemos supor que os isolados de *P. aeruginosa* terão já sofrido alterações no sentido de se adaptarem a concentrações mais elevadas deste produto. A tipagem genética, por PFGE e RAPD, demonstraram a disseminação clonal e a persistência no tempo de alguns genótipos de *P. aeruginosa* presentes neste sistema, o que evidencia esse pressuposto de adaptação às condições ecológicas dos sistemas, das quais fazem parte desinfecções regulares por hipoclorito de sódio.

É conhecido o facto de que concentrações sub-inibitórias de antibióticos promovem a resistência bacteriana aos mesmos (Alonso *et al.*, 1999a). O presente estudo parece indicar o mesmo comportamento quanto à resistência aos cloretos gerados pelo hipoclorito de sódio quando adicionado à água. Tabata *et al.* (2003) referem o envolvimento da porina OprR na resistência a compostos quaternários de amónio contendo um grupo cloreto na sua composição química. Os resultados relativos à alteração do perfil de porinas da membrana externa da parede celular dos isolados de *P. aeruginosa*, em que se observou a diminuição da porina OprD como resposta imediata à presença de imipenemo durante os testes de suscetibilidade a antibióticos, sugerem a capacidade dos isolados termais adaptarem rapidamente o seu perfil de porinas em função das condições ambientais em que se encontram, pelo que poderemos supor que o mesmo possa acontecer com outras porinas, contudo, não foi possível estudar essa hipótese face à resistência ao hipoclorito, ficando esta pesquisa como uma perspetiva futura de trabalho.

Por último, destaca-se o facto de que a maior resistência à presença de hipoclorito nos isolados termais é preocupante em termos de estratégias de desinfecção em unidades recreativas aquáticas, como sejam as piscinas, parques aquáticos, jacúzis, entre outros. A maioria destas unidades são desinfetadas por cloro, sendo obrigatória a permanente presença de um teor residual de cloro livre, situado entre 0,6 e 2 ppm, conforme diretivas europeias (Diretiva 76/160/CEE) e legislação portuguesa atual (DR nº 5/97), suportadas nas indicações emitidas pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 2006). É conhecida a presença de *P. aeruginosa* em águas recreativas balneares, e conhece-se também a prevalência de otites e foliculites



associadas a esta bactéria entre os utentes destes equipamentos (Kerr e Snelling, 2009; Mena e Gerba, 2009). Considerando os presentes resultados, podemos antever o aumento de isolados resistentes a estas concentrações de cloro, que já são sub-inibitórias para alguns. Atendendo aos diversos tipos de desinfecção possíveis para estas unidades, e ainda considerando o proposto por Jurgens *et al.* (2008), que referem a importância da rotatividade na utilização de diferentes tipos de desinfetantes para minimizar a aquisição de resistências, o mesmo se propõe relativamente aos processos de desinfecção de rotina implementados nos estabelecimentos termais, de modo a “assegurar as condições necessárias à preservação da qualidade da água, (...), bem como nos pontos de utilização da água”, como determinado pelo DL nº 142/2004.

Quanto à utilização de unidades emissoras de luz ultravioleta inseridas nalguns equipamentos termais, os presentes resultados apontam para a sua possível eficácia na destruição de biofilmes de *P. aeruginosa*, mas as considerações acima expostas acerca deste processo e da dinâmica dos biofilmes, colocam em causa a sua completa eficácia. Atendendo aos riscos associados à inalação profunda de aerossóis de água termal que podem conter isolados de *P. aeruginosa* com elevado potencial virulento, demonstrada capacidade infetiva e de adaptação à presença de imipenemo, esta estratégia não deve ser desprezada mas sim otimizada, pela eventual alteração dos materiais de que são feitos os equipamentos de aerossol, de modo a aumentar a eficácia de penetração da radiação ultravioleta por todas as peças, para além do aumento do tempo de incidência da radiação sobre as peças, para garantir uma maior eficácia deste processo de desinfecção.

As normas europeias referem a não alteração do microbismo natural da água mineral natural, no entanto, entendemos que este processo de desinfecção no fim de linha do sistema de distribuição da água termal talvez não tenha grandes implicações para as suas propriedades terapêuticas, dado que os constituintes celulares bacterianos permanecem na água mineral natural, podendo ainda participar no processo curativo associado à prática termal, se considerarmos a possível intervenção microbiana no processo de cura termal numa perspetiva idêntica às das vacinas. É conhecida a “crise termal”, em que alguns utentes termais experimentam a exacerbação das patologias pelas quais procuram tratamento termal nos primeiros dias dos tratamentos, alguns deles reportando até estados pré-febris (Schilliger e Bardelay, 1989; Teixeira, 2012), o que parece evidenciar a participação bacteriana no processo de cura termal. Contudo, todas estas assunções carecem de evidências científicas, pertinentes na nossa perspetiva, que por um lado permitam conhecer melhor a dinâmica química, física e microbiológica da cura termal, e por outro permitam uma maior garantia de segurança microbiológica para os utentes termais, sem afetar os benefícios que estes procuram na prática termal. A implementação de processos de desinfecção física pré-tratamento, ou até durante o tratamento, poderão ser uma boa estratégia de compromisso entre a manutenção do microbismo natural da água e a minimização de eventuais riscos para a saúde dos utentes termais, mesmo correndo-se o risco de promover possíveis resistências à radiação ultravioleta, como verificado, neste trabalho, num isolado clínico.

### 3.1. Fatores de virulência como previsores da resistência a antibióticos

Deptula e Gospodarek (2010), além de reportarem uma menor prevalência de fatores de virulência em isolados de *P. aeruginosa* multirresistentes em relação a isolados sensíveis, referem ainda que a aquisição de genes de resistência a antibióticos pode afetar a produção de fatores de virulência. Atendendo a isto, e considerando o perfil de virulência e de resistência dos isolados clínicos utilizados no presente trabalho, podemos admitir que as baixas frequências dos fenótipos de virulência observadas nos nossos isolados clínicos poderão estar relacionadas com a aquisição de resistência a antibióticos. De facto, a aquisição de genes de resistência, através da incorporação de elementos genéticos móveis no cromossoma bacteriano, pode levar à inativação de genes envolvidos na produção de alguns fatores de virulência. Por outro lado, Salunkhe *et al.* (2005) verificaram a existência de uma estirpe epidémica de *P. aeruginosa* em doentes com fibrose quística que apresentava uma virulência e resistência exacerbada, o que sugere que a relação entre virulência e resistência pode também ocorrer num sentido sinérgico e não apenas antagonístico, como sugerido por Deptula e Gospodarek (2010).

No presente trabalho pretendeu-se identificar e modelar possíveis relações entre fenótipos ou genes de virulência e a resistência a antibióticos nos isolados clínicos. Para tal, recorreu-se à ferramenta de regressão logística múltipla, uma vez que esta técnica estatística permite quantificar (através da noção de *odds ratio*) a intensidade das associações entre variáveis dependentes binárias e os seus potenciais previsores (ou variáveis independentes) (Field, 2005). Idêntico estudo não foi feito nos isolados termais, por razões evidentes, atendendo à suscetibilidade destes isolados.

A produção média ou elevada de pioverdina revelou-se um bom predictor da resistência à maioria dos antibióticos testados, exceto para PIP, em que a possibilidade do isolado ser resistente a este antibiótico quando produz pioverdina em quantidades baixas é 13,69 vezes maior do que quando essa produção é média ou elevada. Finlayson e Brown (2011) demonstram uma associação positiva entre a produção de pigmentos, sobretudo pioverdina, e a multirresistência em *P. aeruginosa*, o que corrobora os presentes resultados, ainda que as análises estatísticas sejam diferentes nos dois trabalhos. A presença do gene *lecA* revelou também ser um bom predictor da resistência a alguns antibióticos, enquanto o inverso foi observado para o gene *lecB*. Balasubramanian *et al.* (2011, 2012) evidenciam a co-regulação da formação de biofilmes, onde as lectinas também participam (Chemani *et al.*, 2009), com a resistência a beta-lactâmicos. Não se encontrando justificação na literatura para o comportamento oposto dos genes envolvidos na síntese de adesinas como previsores de resistência observado no presente estudo, admitimos que tal se possa dever a diferentes modos de atuação das lectinas por eles expressas, uma vez que LecA e LecB têm ligandos diferentes, galactose e fucose, respetivamente (Funken *et al.*, 2012).



A produção de ramnolípidos, também envolvida na formação de biofilmes (Balasubramanian *et al.*, 2012) apresentou-se como um bom previsor de suscetibilidade a cefalosporinas e de resistência à CIP. Ramisse *et al.* (2000) reportam a diminuição da expressão de ramnolípidos quando os isolados apresentam beta-lactamases do tipo penicilinase e cefalosporinases, o que parece concordante com os resultados dos modelos de regressão, uma vez que a presença de ramnolípidos prevê a suscetibilidade a cefalosporinas e conseqüentemente a ausência deste fenótipo estará ligada à resistência. No presente trabalho não foram estudados os mecanismos de resistência presentes nos isolados clínicos, no entanto é conhecida a expressão constitutiva e induzida da cefalosporinase AmpC, pelo que admite-se a possibilidade de existência destes e outros mecanismos de resistência a cefalosporinas nos isolados ora estudados, podendo assim justificar os resultados obtidos. Quanto à CIP, sabemos que um dos principais mecanismos de resistência às fluoroquinolonas presente em *P. aeruginosa* é a sobre-produção de bombas de efluxo (Mesaros *et al.*, 2007). Jeannot *et al.* (2008) referem a diminuição da produção de ramnolípidos em mutantes que apresentam sobre-expressão da bomba de efluxo MexCD-OprJ, responsável pelo efluxo de CIP e, por conseqüência, pelo aumento da resistência a este antibiótico. A presença de ramnolípidos revelou-se como um bom previsor da resistência a CIP, o que parece contradizer o referido por Jeannot *et al.* (2008). Contudo, não tendo sido estudados os mecanismos de resistência dos isolados clínicos, não foi possível verificar essa assunção.

Os restantes previsores de resistência, fenotípicos ou genotípicos, participaram em poucos modelos de regressão, pelo que a sua possível relevância para a previsão global de resistência é pouco expressiva. Alguns autores referem como alternativa terapêutica para as infeções causadas por *P. aeruginosa* multirresistente a utilização de compostos que inibam ou atenuem a ação de fatores de virulência específicos (Kipnis *et al.*, 2006; Chemani *et al.*, 2009; Cathcart *et al.*, 2011). No entanto, esta estratégia só é eficaz se se garantir que o fator de virulência alvo se encontra na célula multirresistente. Atendendo aos presentes resultados e à grande variabilidade dos perfis de virulência e resistência observados, julgamos pertinente a realização de estudos semelhantes, alargados a populações clínicas de diferentes origens, a fim de determinar um padrão mais alargado de comportamento da resistência aos antibióticos em função da presença ou ausência de fatores de virulência específicos. Propomos também que esses estudos se debrucem sobretudo em estirpes multi, extensa e pan-resistentes, dado serem essas as mais preocupantes pela eminente falta de opção terapêutica para as infeções que causam.

## 4. Mobilidade genética

Os elementos genéticos móveis estão ligados à transferência de genes de resistência a antibióticos e de genes associados a virulência entre isolados da mesma espécie ou de espécies diferentes (Kung *et al.*, 2010). Nesse sentido, revelou-se importante estudar a presença destas unidades genéticas nos isolados termais e clínicos utilizados neste trabalho a fim de determinar a sua capacidade de transmitirem ou adquirirem genes de resistência ou virulência de outras bactérias presentes nos seus ecossistemas.

As ilhas de patogenicidade são um tipo específico de ilhas genómicas contendo genes de virulência, estando descritas em *P. aeruginosa* diversas ilhas genómicas associadas à virulência, das quais PAGI-1 e PAPI-2 são as mais encontradas em isolados clínicos desta espécie (PAGI-1 estima-se estar presente em 85% dos isolados clínicos de *P. aeruginosa*), e PAPI-3 foi descrita pela primeira vez num isolado aquático. Outras ilhas genómicas, como PAPI-4 a 11 e PAPI-1 e 2 são menos frequentes (Battle *et al.*, 2009). No presente trabalho pesquisaram-se apenas as ilhas genómicas encontradas com mais frequência em *P. aeruginosa*: PAPI-1, 2 e 3. Ambas as populações apresentaram genes destas 3 ilhas genómicas, sendo PAPI-1 a mais prevalente em ambas as populações, com uma frequência similar àquela descrita na literatura (Battle *et al.*, 2009). Alguns estudos reportam ilhas genómicas em estirpes de infeções humanas e em ambientes aquáticos (Finnan *et al.*, 2004; Klockgether *et al.*, 2007; Battle *et al.*, 2009; Morales-Espinosa *et al.*, 2012), o que é consistente com o facto de que algumas funções codificadas pelos genes de virulência inseridos em ilhas genómicas contribuem para a adaptação e competitividade geral das bactérias e não apenas para os processos infecciosos (Morales-Espinosa *et al.*, 2012).

De acordo com o descrito na literatura (Shrivastava *et al.*, 2004; Fonseca *et al.*, 2005; Ruiz-Martínez *et al.*, 2011), não foram observados plasmídeos ou integrões de classe 2 ou 3 nos isolados ambientais e clínicos incluídos neste trabalho, tendo-se detetado apenas integrões de classe 1, sobretudo em isolados clínicos. Destes, a maioria estavam presentes em isolados obtidos a partir de amostras de expectoração e quase todos os integrões apresentaram a cassete de genes *aadA11* e alguns a cassete de genes *aadB*, também encontradas por Ruiz-Martínez *et al.* (2011) nos isolados clínicos que consideraram no seu estudo, sendo que aí a cassete de genes *aadB* foi a mais prevalente. Dos isolados termais, apenas um, proveniente do circuito secundário da piscina terapêutica, apresentou um integrão de classe 1, de 800 pb. Atendendo a que a piscina pode ser contaminada pelos utentes, este integrão poderá ter tido origem numa contaminação do circuito secundário, que se encontra acoplado ao sistema de recirculação da água da piscina. A sequência do integrão de classe 1 encontrado no isolado termal apresentou-se como similar à sequência do integrão classe 1 contida no plasmídeo p4800 da estirpe Kp 4800 de *Klebsiella pneumoniae* (EU622041.1), contem uma cassete de genes *dfr22*, envolvida na resistência ao trimetoprim, sendo a primeira descrição deste integrão em *P. aeruginosa*, e por isso inserida na base de dados GenBank® (código de acesso KF525705).





---

## DISCUSSÃO

Por último, importa referir que estes resultados são consistentes com o observado relativamente ao perfil de virulência e resistência nos isolados termais e clínicos, uma vez que foram os isolados termais a apresentar maior número de EGMs associados a genes de virulência e os isolados clínicos a apresentar maior número de EGMs associados à transferência de genes de resistência a antibióticos.

## 5. Considerações finais

O presente trabalho abordou a problemática da prevalência, virulência e resistência a antibióticos de isolados de *P. aeruginosa* num estabelecimento termal, onde a medicina se encontra com a natureza, para melhorar a condição de saúde dos seus utentes através da aplicação externa ou interna de água mineral natural, não tratada, conforme previsto por lei. *P. aeruginosa* é uma bactéria patogénica oportunista, envolvida sobretudo em processos infecciosos pulmonares de doentes imunocomprometidos ou debilitados, pelo que é imperativo que esta bactéria esteja ausente da água mineral natural, líquida ou na forma aerossolizada, disponibilizada aos termalistas.

*P. aeruginosa* foi observada em todo o sistema de adução e distribuição da água mineral natural, ao longo de 4 anos de vigilância microbiológica, sendo mais prevalente no 1º ano do estudo, o que sugeriu a adequação dos processos de desinfeção e higienização do sistema de adução, distribuição e utilização da água mineral natural implementados no estabelecimento termal durante esse período. No entanto, foi na superfície interna de alguns equipamentos termais que se observou a maior prevalência de *P. aeruginosa* no estabelecimento termal, em amostras recolhidas após a implementação dessas medidas sanitárias e a diminuição expressiva do número de *P. aeruginosa* de origem planctónica. Esta evidência sugere que a qualidade microbiológica da água mineral natural, avaliada pelos controlos microbiológicos oficiais, poderá não traduzir adequadamente a qualidade microbiológica dos tratamentos termais.

Considerando as atuais imposições legais, em que os equipamentos termais não fazem parte da vigilância sanitária da qualidade microbiológica da água mineral natural, atendendo aos resultados evidenciados no presente trabalho, esta falha na legislação poderá significar uma subavaliação do risco associado à prática termal, sobretudo no que concerne aos tratamentos por aerossolização da água mineral natural para o tratamento de patologias respiratórias. Para analisar essa possibilidade, foi estudada a prevalência e distribuição de fenótipos e genes de virulência, bem como a resistência a antibióticos e a presença de elementos genéticos móveis numa seleção aleatória de isolados termais de origem planctónica e de biofilmes e compararam-se com isolados clínicos obtidos de produtos biológicos associados a infeções respiratórias. Observou-se uma maior prevalência de fenótipos e genes de virulência nos isolados termais do que nos isolados clínicos derivados de infeções respiratórias, bem como uma diferente distribuição e associações internas destes fatores, indiciando diferentes estratégias de virulência nas duas populações. Foi também observada uma maior, ou igual, capacidade de causar infeção aguda nestes isolados do que nos clínicos, em função do tipo de isolado termal considerado, planctónico ou de biofilme, respetivamente, colocando os isolados termais num nível de risco de infeção semelhante, ou superior, ao encontrado em estirpes que estão a causar infeções respiratórias.



A principal diferença entre as duas populações prendeu-se com a resistência a antibióticos, sendo a população termal sensível a todos os antibióticos testados, enquanto a maioria dos isolados clínicos apresentaram um perfil MDR, alguns até sendo classificados como XDR ou PDR. Este perfil de suscetibilidade da população termal de *P. aeruginosa* é de certo modo tranquilizador, uma vez que na eventualidade de alguma infeção causada por este patogénico aquando da prática termal, esta poderá ser rapidamente debelada, uma vez que os isolados termais são suscetíveis aos antibióticos anti-pseudomonais. No entanto, alguns isolados termais demonstraram evidências de conseguirem adaptar-se dum forma rápida e eficaz à presença de imipenemo, um antibiótico apenas utilizado em hospitais, mas considerado de primeira linha para o tratamento de infeções respiratórias causadas por *P. aeruginosa*. Estes resultados demonstram o elevado potencial de resistência a antibióticos de bactérias ambientais e reforçam a importância de uma correta política gestão da eliminação dos antibióticos não utilizados, para diminuir o contacto destes agentes com bactérias ambientais.

Em suma, os resultados obtidos com o presente trabalho sugerem a importância de um estudo idêntico alargado a outros estabelecimentos termais portugueses e europeus, de modo a promover a revisão das políticas atuais de controlo da qualidade microbiológica associadas à prática termal em Portugal, para considerar a qualidade microbiológica do tratamento termal e não apenas da água termal, e também a promoção da necessária discussão a nível europeu para a criação de diretivas comunitárias que regulamentem esta atividade terapêutica natural.

## **CAPÍTULO V**

---



## **BIBLIOGRAFIA**





- Allewelt, M., Coleman, F.T., Grout, M., Priebe, G.P. and Pier, G.B. (2000) Acquisition of expression of the *Pseudomonas aeruginosa* ExoU cytotoxin leads to increased bacterial virulence in a murine model of acute pneumonia and systemic spread. *Infect Immun* 68: 3998-4004
- Alonso A, Campanario E, Martínez JL (1999a) Emergence of multi-drug resistant mutants is increased under antibiotic selective pressure in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 145: 2857-2862
- Alonso A, Rojo F, Martínez JL (1999b) Environmental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* show pathogenic and biodegradative properties irrespective of their origin. *Environ Microbiol* 5: 421-430
- Arancibia F, Bauer TT, Ewig S, Mensa J, Gonzales J, Niederman MS (2002) Community-acquired pneumonia due to gram-negative bacteria and *Pseudomonas aeruginosa*: incidence, risk and prognosis. *Arch Inter Med* 162: 1849-1858
- Bak J, Ladefoged SD, Tvede M, Begovic T, Gregersen A (2010) Disinfection of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm contaminated tube lumens with ultraviolet C light emitting diodes. *Biofouling* 26: 31-38
- Balasubramanian D, Kong K-F, Jayawardena SR, Leal SM, Sautter RT, Mathee K (2011) Co-regulation of beta-lactam resistance, alginate production and quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol* 60: 147-156
- Balasubramanian D, Schneper L, Kumari H, Mathee K (2012) A dynamic and intricate regulatory network determines *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Nucleic Acids Res* 41: 1-20
- Barton BM, Harding GP, Zuccarelli AJ (1995) A general method for detecting and sizing large plasmids. *Anal Biochem* 226:235-240
- Battle SE, Rello J, Hauser AR (2009) Genomic Islands in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* 290: 70-78
- Berka RM, Gray GL, Vasil ML (1981) Studies of phospholipase C (heat-labile hemolysin) in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 34: 1071-1074
- Bert F, Maubec E, Bruneau B, Berry P, Lambert-Zechovsky N (1998) Multi-resistant *Pseudomonas aeruginosa* outbreak associated with contaminated tap water in a neurosurgery intensive care unit. *J Hosp Infect* 39: 53-62
- Blasco MD, Esteve C, Alcaide E (2008) Multiresistant waterborne pathogens isolated from water reservoirs and cooling systems. *J Appl Microbiol* 105: 469-475
- Bleves S, Viarre V, Salacha R, Michel GP, Filloux A, Voulhoux R (2010) Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: a wealth of pathogenic weapons. *Int J Med Microbiol* 300: 534-543



- Bornstein N, Marmet D, Surgot M, Nowicki M, Arslan A, Esteve J, Fleurette J (1989) Exposure to Legionellaceae at a hot spring *thermae*: a prospective clinical and serological study. *Epidem Inf* 102: 31-36
- Bradbury RS, Roddam LF, Merritt A, Reid DW, Champion AC (2010) Virulence gene distribution in clinical, nosocomial and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Med Microbiol* 59: 881-890
- Bragonzi A, Paroni M, Nonis A, Cramer N, Montanari S, Rejman J, Serio CD, Döring G, Tümmler B (2009) *Pseudomonas aeruginosa* microevolution during cystic fibrosis lung infection establishes clones with adapted virulence. *Am J Respir Crit Care Med* 180: 138-145
- Braud A, Hannauer M, Mislin GLA, Schalk IJ (2009) The *Pseudomonas aeruginosa* pyochelin-iron uptake pathway and its metal specificity. *J Bacteriol* 191: 3517-3525
- Breathnach AS, Cubbon MD, Karunaharan RN, Pope CF, Planche TD (2012) Multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* outbreaks in two hospitals: association with contaminated hospital wastewater systems. *J Hosp Infect* 82: 19-24
- Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Domínguez MA, Gago JF, Juan C, Tubau F, Rodríguez C, Moyà B, Peña C, Martínez-Martínez L, Oliver A; Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI) (2012) Genetic markers of widespread extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Antimicrob Agents Chemother* 56:6349-6357
- Caiazza NC, Shanks RM, O'Toole GA (2005) Rhamnolipids modulate swarming motility patterns of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 187: 7351-7361
- Cambray G, Guerout AM, Mazel D (2010) Integrons. *Annu Rev Genet* 44: 141-146
- Cardoso O, Alves AF, Leitão R (2008) Metallo-beta-lactamase VIM-2 *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a cystic fibrosis patient. *Int J Antimicrob Agents* 31:375-379
- Cardoso O, Leitão R, Figueiredo A, Sousa JC, Duarte A, Peixe L (2002) Metallo-beta-lactamase VIM-2 in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Portugal. *Microb Drug Resist* 8:93-97
- Carvalho H (2008) *Análise multivariada de dados qualitativos – Utilização da análise de correspondências múltiplas com o SPSS, 2ª edição*. Lisboa, Portugal, Edições Silabo
- Casadevall A, Pirofski L (2009) Virulence factors and their mechanisms of action: the view from a damage-response framework. *J Water Health* 7: S2-S18
- Cathcart GRA, Quinn D, Greer B, Harriot P, Lynas JF, Gilmore BF, Walker B (2011) Novel inhibitors of the *Pseudomonas aeruginosa* virulence factor LasB: a potential therapeutic approach for the attenuation of virulence mechanisms in pseudomonas infection. *Antimicrob Agents Chemother* 55: 2670-2678



- Chemani C, Imberty A, de Bentzmann S, Pierre M, Wimmerová M, Guery BP, Faure K (2009) Role of LecA and LecB lectins in *Pseudomonas aeruginosa*-induced lung injury and effect of carbohydrate ligands. *Infect Immun* 77: 2065-2075
- Choy MH, Stapleton F, Willcox MDP, Zhu H (2008) Comparison of virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from contact lens- and non-contact lens-related keratitis. *J Med Microbiol* 57: 1539-1546
- Chu BC, Garcia-Herrero A, Johanson TH, Krewulak KD, Lau CK, Peacock S, Slavinskaya Z, Vogel HJ (2010) Siderophore uptake in bacteria and the battle for iron with the host; a bird's eye view. *Biometals* 23: 601-611
- Chun CK, Ozer EA, Welsh MJ, Zabner J, Greenberg EP (2004) Inactivation of a *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing signal by human airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci* 101: 3587-3590
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2009). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Nineteenth Informational Supplement. M100-S19, CLSI, Wayne, PA, USA
- Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM (2011) Metallo-beta-lactamases: a last frontier for beta-lactams? *Lancet Infect Dis* 11: 381-393
- Cortez JAS (2012) História e cultura hidromineral. In: Águas minerais naturais e de nascente da Região Centro. Cortez JAS (ed). Aveiro, Portugal, *Mare Liberum* Editora, pp. 25-38
- Crosa JH, Tolmasky ME, Actis LA, Falkow S (1994) Plasmids. In: Methods for general and molecular microbiology. Gerhardt P, Murray RGE, Wood WA, Kreig NR (eds), Washington, Estados Unidos da América, American Society for Microbiology, pp. 365-386
- D'Arezzo S, Lanini S, Puro V, Ippolito G, Visca P (2012) High-level tolerance to troclosen may play a role in *Pseudomonas aeruginosa* antibiotic resistance in immunocompromised hosts: evidence from outbreak investigation. *BMC Res Notes* 5:43
- da Silva MEZ, Filho IC, Endo EH, Nakamura CV, Ueda-Nakamura T, Filho BPD (2008). Characterization of potential virulence markers in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from drinking water. *Antonie van Leeuwenhoek* 93: 323-334
- Daneshvar N, Niaei A, Akbari S, Aber S, Kazemian N (2007) Photocatalytic disinfection of water polluted by *Pseudomonas aeruginosa*. *Global NEST Journal* 2: 132-136
- Davies J, Davies D (2010) Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* 74: 417-433
- Deptula A, Gospodarek E (2010) Reduced expression of virulence factors in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Arch Microbiol* 192: 79-84





- Dimatatac EL, Alejandria MM, Montalban C, Pineda C, Ang C, Delino R (2003) Clinical outcomes and costs of care of antibiotic resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Phillip J Microbiol Infect Dis* 32: 159-167
- Doi Y, Garcia DO, Adams J, Paterson DL (2007) Coproduction of novel 16S rRNA methylase RmtD and metallo-beta-lactamase SPM-1 in as panresistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 51: 852-856
- Dubois V, Arpin C, Noury P, Quentin C (2002) Clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa* carrying a *bla*<sub>TEM-1</sub> gene located on a chromosomal interrupted TnA type transposon. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 3624-3626
- Engel J, Balachandran P (2009) Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III effectors in disease. *Cur Opin Microbiol* 12: 61-66
- European Centre for Disease Prevention and Control (2012) Antimicrobial resistance surveillance in Europe: annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2011. [http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/surveillance\\_reports/Pages/index.aspx](http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/surveillance_reports/Pages/index.aspx) (consultado em 31 de julho de 2013)
- Falagas ME, Bliziotis IA (2007) Pandrug-resistant Gram-negative bacteria: the dawn of the post-antibiotic era? *Int J Antimicrob Agents* 29: 630-636
- Falkow S (1988) Molecular Koch's postulates applied to microbial pathogenicity. *Rev Infect Dis* 10: S274-S276
- Falkow S (2004) Molecular Koch's postulates applied to bacterial pathogenicity – a personal recollection 15 years later. *Nat Rev Microbiol* 2: 67-72
- Feltman H, Schultert G, Khan S, Jain M, Peterson L, Hauser AR (2001) Prevalence of type III secretion genes in clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 147: 2659-2669
- Feltman RK, Power AK, Pell PA, Sneath PA (1978) A simple method for storage of bacteria at -76 degrees. *C J Appl Bacteriol* 44: 313-316
- Feltzer RE, Gray RD, Dean WL, Pierce Jr, WM (2000) Alkaline proteinase inhibitor of *Pseudomonas aeruginosa*: interaction of native and N-terminally truncated inhibitor proteins with *Pseudomonas* metalloproteinases. *J Biol Chem* 28: 21002-21009
- Field A (2005) Logistic regression. In: *Discovering Statistics Using SPSS Statistics*, 2ª edição. Field A (ed). Londres, Reino Unido, Sage Publications Ltd, pp. 760-813
- Filloux A (2011) Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: an essay on diversity, evolution and function. *Front Microbiol* 2:155



- Finlayson EA, Brown PD (2011) Comparison of antibiotic resistance and virulence factors in pigmented and non-pigmented *Pseudomonas aeruginosa*. *West Indian Med J* 60: 24-32
- Finnan S, Morrissey JP, O'Gara F, Boyd EF (2004) Genome diversity of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients and the hospital environment. *J Clin Microbiol* 42: 5783-5792
- Folkesson A, Jelsbak L, Yang L, Johansen HK, Ciofu O, Høiby N, Molin S (2012) Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the cystic fibrosis airway: an evolutionary perspective. *Nat Rev Micro* 10: 841-851
- Fonseca ER, Vieira VV, Cipriano R, Vicente ACP (2005) Class I integrons in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from clinical settings in Amazon region, Brasil. *FEMS Immunol Med Microbiol* 44: 303-309
- Fraise AP (2002) Biocide use and antimicrobial resistance – a cause for concern? *J Antimicrob Chemother* 49: 11-12
- Fricks-Lima J, Hendrickson CM, Allgaier A, Zhuo H, Wiener-Kronish JP, Lynch SV, Yang K (2011) Differences in biofilm formation and antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from airways of mechanically ventilated patients and cystic fibrosis patients. *Int J Antimicrob Agents* 37: 309–315
- Frost LS, Leplae R, Summers AO, Toussaint (2005) Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat rev Microbiol* 3: 722-732
- Funken H, Bartels K-M, Wilhelm S, Brocker M, Bott M, Bains M, Hancock REW, Rosenau F, Jagger K-E (2012) Specific association of lectin LecB with the surface of *Pseudomonas aeruginosa*: role of outer membrane protein OprF. *PLoS One* 7: e46857
- Funken H, Knapp A, Vasil ML, Wilhelm S, Jaeger KE, Rosenau F (2011) The lipase LipA (PA2862) but not LipC (PA4813) from *Pseudomonas aeruginosa* influences regulation of pyoverdine production and expression of the sigma factor PvdS. *J Bacteriol* 193: 5858-5860
- Garbe J, Bunk B, Rohde M, Schobert M (2011) Sequencing and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* phage JG004
- Gomila, M, Gallegos MC, Fernández-Baca V, Pareja A, Pascual M, Diaz-Antolín P, Garcia-Vladés E, Lalucat J (2013) Genetic diversity of clinical *Pseudomonas eruginosa* isolates in a public hospital in Spain. *BMC Microbiol* 13: 138. doi: 10.1186/1471-2180-13-138
- Greenacre M (2008) Análisis de correspondencias múltiples. In: La práctica del análisis de correspondencias. Greenacre, M. (ed). Bilbao: Fundación BBVA, pp. 185-193
- Gyssens IC (2011) Antibiotic policy. *Int J Antimicrob Agents* 38S: 11-20



- Hacker J, Carniel E (2001) Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity: a Darwinian view of the evolution of microbes. *EMBO Rep* 2: 376-381
- Hamood AN, Griswold J, Colmer J (1996) Characterization of elastase-deficient clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 64: 3154-3160
- Hancock REW, Brinkman FS (2002) Function of *Pseudomonas* porins in uptake and efflux. *Annu Rev Microbiol* 56: 17-38
- Hardalo C, Edberg SC (1997) *Pseudomonas aeruginosa*: assessment of risk from drinking water. *Clin Rev Microbiol* 23: 47-75
- Harmsen M, Yang L, Pamp SJ, Tolker-Nielsen T (2010) An update on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, tolerance and dispersal. *FEMS Immunol Med Microbiol* 59: 253-268
- Hauser AR (2009) The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nat Rev Microbiol* 7: 654-665
- Hirsch EB, Tam VH (2010) Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients outcomes. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res* 10: 441-451
- Hota S, Hirji Z, Stockton K, Lemieux C, Dedier H, Wolfaard G, Gardam MA (2009) Outbreak of multi-resistant *Pseudomonas aeruginosa* colonization and infection secondary to imperfect intensive care unit room design. *Infect Control Hosp Epidemiol* 30: 25-33
- Hubert B, de Mahenge C, Peloux Y, Grimont PADF, Richar C, Fleurette J, Bacou J, Meyer L (1988) Epidémie de pneumonies et de méningites dans un établissement thermal : isolement d'une bactérie non antérieurement rencontrée en pathologie humaine. *B.E.H. Bulletin Epidemiologique Hebdomadaire* 10: 37-38
- Hugh R, Lessel EF (1967) *Pseudomonas aeruginosa* or *Pseudomonas pyocyanea*? Request for an opinion. *Int J System Bacteriol* 17: 43-51
- Inoue T, Shingaki R, Fukui K (2008) Inhibition of swarming motility of *Pseudomonas aeruginosa* by branched-chain fatty acids. *FEMS Microbiol Lett* 281: 81-86
- Ivanov IE, Kints EN, Porter LA, Goldberg JB, Burnham NA, Camesano TA (2011) Relating the physical properties of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharides to virulence by atomic force microscopy. *J Bacteriol* 193: 1259-1266
- Iversen BG, Jacobsen T, Eriksen HM, Bukholm G, Melby KK, Nygard K, Aavitsland P (2007) An outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infection caused by contaminated mouth swabs. *Clin Infect Dis* 44: 794-801



- Janda JM, Atang-Nomo S, Bottone EJ, Desmond ES (1980) Correlation of proteolytic activity of *Pseudomonas aeruginosa* with site of infection. J Clin Microbiol 12: 626-628
- Janda JM, Bottone EJ (1981) *Pseudomonas aeruginosa* enzyme profiling: predictor of potential invasiveness and use as an epidemiological tool. J Clin Microbiol 14: 55-60
- Jander G, Rahme LG, Ausubel FM (2000) Positive correlation between virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in mice and insects. J Bacteriol 182: 3843-3845
- Jeannot K, Elsen S, Köhler T, Attree I, Van Delden C, Plésiat P (2008) Resistance and virulence of *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains overproducing the MexCD-OprJ efflux pump. Antimicrob Agents Chemother 52: 2455-2462
- Jørgensen R, Wang Y, Visschedyk D, Merrill AR (2008) The nature and character of the transition state for the ADP-ribosyltransferase reaction. EMBO Rep 9: 802-809
- Jurgens DJ, Sattar SA, Mah TF (2008) Chloraminated drinking water does not generate bacterial resistance to antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Lett Appl Microbiol 46: 562-567
- Kanj SS, Sexton DJ (2012) Epidemiology and pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections. Acesso em 1 de março de 2013, disponível em UpToDate®: <http://www.uptodate.com/contents/epidemiology-and-pathogenesis-of-pseudomonas-aeruginosa-infection>
- Kaszab E, Kriszt B, Atzél B, Szabó G, Szabó I, Harkai P, Szoboszlav S (2010) The occurrence of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* on hydrocarbon-contaminated sites. Microb Ecol 59: 37-45
- Kaszab E, Szoboszlav S, Dobolvi C, Háhn J, Pék N, Kriszt B (2011) Antibiotic resistance profiles and virulence markers of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from composts. Bioresour Technol 102: 1543-1548
- Kerr KG, Snelling AM (2009) *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. J Hosp Infect 73: 338-344
- Kersulyte D, Struelens MJ, Deplano A, Berg DE (1995) Comparison of arbitrarily primed PCR and macrorestriction (pulsed-field gel electrophoresis) typing of *Pseudomonas aeruginosa* strains from cystic fibrosis patients. J Clin Microbiol 33: 2216-2219
- Khan NH, Ishii Y, Kimata-Kino N, Esaki H, Nishino T, Nishimura M (2007) Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* from open-ocean and comparison with freshwater, clinical, and animal isolates. Microb Ecol 53: 173-186
- Kipnis E, Sawa T, Wiener-Kronish J (2006) Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. Med Mal Infect 36: 78-91



- Klockgether J, Wüdermann D, Reva O, Wielhmann L, Tümmler B (2007) Diversity of the abundant pKLC102/PAGI-2 family of genomic islands in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 189: 2443-2459
- Klockgether J, Würdemann D, Wiehlmann L, Binnewies TT, Ussery DW, Tümmler B (2008) Genome diversity of *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Pseudomonas. Genomic and Molecular Biology*. Cornelis P (ed), Norfolk, Reino Unido; Caister Academic Press, pp. 19-42
- König B, Jaeger K-E, Sage AE, Vasil ML, König W (1996) Role of *Pseudomonas aeruginosa* lipase in inflammatory mediator release from human inflammatory effector cells (platelets, granulocytes, and monocytes). *Infect Immun* 64: 3252-3258
- Kung VL, Ozer EA, Hauser AR (2010) The accessory genome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev* 74: 621-624
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Lamont IL, Konings AF, Reid DW (2009) Iron acquisition by *Pseudomonas aeruginosa* in the lungs of patients with cystic fibrosis. *Biometals* 22: 53-60
- Lamrani AH, Oufdou K, Mezrioui NE (2010) Determination of several potential virulence factors in non-O1 *Vibrio cholerae*, *Pseudomonas aeruginosa*, faecal coliforms and streptococci isolated from Marrakesh groundwater. *Water Sci Technol* 61: 1895-1905
- Langsrud S, Sundheim G, Borgmann-Strahsen R (2003) Intrinsic and acquired resistance to quaternary ammonium compounds in food-related *Pseudomonas* spp. *J App Microbiol* 95: 874-882
- Lanini S, D'Arezzo S, Puro V, Martini L, Imperi F, Piselli P, Montanaro M, Paoletti S, Visca P, Ippolito G (2011) Molecular epidemiology of a *Pseudomonas aeruginosa* hospital outbreak driven by a contaminated disinfectant-soap dispenser. *PLoS One* 6:e17064.
- Lau GW, Ran H, Kong F, Hassett DJ, Mavrodi D (2004) *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin is critical for lung infection in mice. *Infect Immun* 72: 4275-4278
- Lavenir R, Sanroma M, Gibert S, Crouzet O, Laurent F, Kravtsoff J, Mazoyer M-A, Cournoyer B (2008) Spatio-temporal analysis of infra-specific genetic variations among a *Pseudomonas aeruginosa* water network hospital population: invasion and selection of clonal complexes. *J Appl Microbiol* 105: 1491-1501
- Le Roux B, Rouanet H (2004) *Geometric Data Analysis: From correspondence analysis to structured data analysis*, Dordrecht, The Netherlands, Kluwer Academic Publishers, pp. 179-241
- Leclerc H, Moreau A (2002) Microbiological safety of natural mineral water. *FEMS Microbiol Rev* 26: 207-222



- Lee VT, Smith RS, Tümmler B, Lory S (2005) Activities of *Pseudomonas aeruginosa* effectors secreted via type III secretion system in vitro and during infection. *Infect Immunol* 73: 1695-1705
- Li Z, Korosok MR, Farrell PM, Laxova A, West SE, Green CG, Collins J, Rock MJ, Splaingard ML (2005) Longitudinal development of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* infection and lung disease progression in children with cystic fibrosis. *JAMA* 293: 581-588
- Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND (2009) Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev* 22: 582-610
- Lomholt JA, Poulsen K, Kilian M (2001) Epidemic structure of *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for a clone that is pathogenic to the eye and that has distinct combination of virulence factors. *Infect Immun* 69: 6284-6295
- Lorè NI, Cigana C, de Fino I, Riva C, Juhas M, Schwager S, Eberl L, Bragonzi A (2012) Cystic fibrosis-niche adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* reduces virulence in multiple infection hosts. *PLoS One* 7: e35648
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275
- Ma L, Conover M, Lu H, Parsek MR, Bayles K, Wozniak DJ (2009) Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *PLoS Pathogen* 5: e1000354
- Magiorakos A-P, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL (2011) Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 18: 268-281
- Mahenthalingam E, Campbell ME, Foster J, Lam JS, Speert DP (1996) Random amplified polymorphic DNA typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 34: 1129-1135
- Maslow JN, Slutsky AM, Arbeit RD (1993) Application of pulsed-field gel electrophoresis to molecular epidemiology. In: *Diagnostic molecular microbiology*. Persing, D.H., Smith, T.F., Tenover, F.C., White, T.J. (eds). Washington: American Society for Microbiology, pp. 563-572
- Mavrodi DV, Bonsall RF, Delaney SM, Soule MJ, Phillips G, Thomashow LS (2001) Functional analysis of genes for biosynthesis of pyocyanin and phenazine-1-carboxamide from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol* 183: 6454-6465



- Mazel D, Dychinco B, Webb VA, Davies J (2000) Antibiotic resistance in the ECOR collection: integrons and identification of a novel *aad* gene. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 158-1574
- Mc Cay PH, Ocampo-Sosa AA, Fleming GTA (2009) Effect of sub-inhibitory concentrations of benzalkonium chloride on the competitiveness of *Pseudomonas aeruginosa* grown in continuous culture. *Microbiology* 156:30-38
- McMorran BJ, Kumara HMCS, Sullivan K, Lamont IL (2001) Involvement of a transformylase enzyme in siderophore synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 147: 1517-1524
- Mena KD, Gerba CP (2009) Risk assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in water. *Rev Environ Contam Toxicol* 201: 71-115
- Mesaros N, Nordmann P, Plésiat P, Roussel-Delvallez M, Van Eldere J, Glupczynski Y, Van Laethem Y, Jacobs F, Lebecque P, Malfroot A, Tulkens PM, Van Bambeke F (2007) *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clin Microbiol Infect* 13: 560-578
- Mitov I, Strateva T, Markova B (2010) Prevalence of virulence genes among Bulgarian nosocomial and cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Braz J Microbiol* 41: 588-595
- Miyata, S., Casey, M., Frank, D.W., Ausubel, F.M. and Drenkard, E. (2003) Use of *Galleria mellonella* caterpillar as a model host to study the role of type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Infect Immun* 71: 2404-2413
- Moore G, Ali S, Cloutman-Green EA, Bradley CR, Wilkinson MAC, Hartley JC, Fraise AP, Wilson APR (2012) Use of UV-C radiation to disinfect non-critical patient care items: a laboratory assessment of the Nanoclave Cabinet. *BMC Infect Dis* 12: 174
- Morales-Espinosa R, Soberón-Chávez G, Delgado-Sapién G, Sandner-Miranda L, Méndez JL, González-Valencia G, Cravioto A (2012) Genetic and phenotypic characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* population with high frequency of genomic islands. *PLoS One* 7: e37459
- Nazik H, Öngen B, Erturan Z, Salcioglu M (2007) Genotype and antibiotic susceptibility patterns of *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from cystic fibrosis patients. *Jpn J Infect Dis* 60: 82-86
- Nemergut DR, Robeson MS, Kysela RF, Martin AP, Schmidt SK, Knight R (2008) Insights and inferences about integron evolution from genomic data. *BMC Genomics* 9: 261
- Nicas TI, Iglewski BH (1986) Production of elastase and other exoproducts by environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 23: 967-969



- Nonaka L, Inubushi A, Shinomiya H, Murase M, Suzuki S (2010) Differences of genetic diversity and antibiotics susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospital, river and coastal seawater. *Environ Microbiol Rep* 2: 465-472
- Nordmann P, Guibert M (1998) Extended-spectrum beta-lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 42: 128-131
- Okumura Y, Matsui T, Ogawa K, Uchiya K, Nikai T (2008) Biochemical properties and primary structure of elastase inhibitor AFUEI from *Aspergillus fumigatus*. *J Med Microbiol* 57: 803-808
- Oldak E, Trafny EA (2005) Secretion of proteases by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms exposed to ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 3281-3288
- Organização Mundial da Saúde (2006) Managing water and air quality. In: Guidelines for safe recreational water environments, Volume 2: Swimming pools and similar environments. Geneva, Suíça. Organização Mundial da Saúde, pp. 80-99
- Osborn CE (2006) Phi coefficient. Statistical applications for health information management, 2ª edição. Osborn CE (ed). Massachusetts, EUA, Jones and Bartlett Publishers, pp. 258-260
- Palleroni NJ (2005) Genus I. *Pseudomonas* Migula 1894. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2<sup>nd</sup> edition, vol. 2. The Proteobacteria, part B, The Gammaproteobacteria. Brenner DJ, Krieg NR e Staley JT (eds), Nova Iorque, Estados Unidos da América; Springer, pp. 323-379
- Palleroni NJ (2010) The *Pseudomonas* story. *Environ Microbiol* 12: 1377-1383
- Paterson DL, Bonomo RA (2005) Extended-spectrum-beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev* 18: 657-686
- Peña C, Gómez-Zorrilla S, Suarez C, Dominguez MA, Tubau F, Arch O, Oliver A, Pujol M, Ariza J.(2012) Extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk of bloodstream infection in hospitalized patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31:2791-2797
- Peng C-YJ, So T-KH (2002) Logistic regression analysis and reporting: a primer. *Understanding Statistics* 1: 31-70
- Pereira SG, Reis T, Mendez IP, Cardoso O (2013) Prevalence and molecular epidemiology of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* carrying metallo-beta-lactamases from two central hospitals in Portugal. *Microb Drug Resist*. doi: 10.1089/mdr.2013.0029
- Pestana MH, Gageiro JN (2008) Análise de correspondência – Anacor e MCA. In: Análise de dados para ciências sociais – A complementaridade do SPSS, 5ª edição. Pestana MH, Gageiro JN (eds). Lisboa, Portugal, Edições Silabo, pp. 202-228





- Petermann SR, Doetkott C, Rust L (2001) Elastase deficiency phenotype of *Pseudomonas aeruginosa* canine otitis externa isolates. *Clin Diag Lab Immunol* 8: 632-636
- Pierson 3rd LS, Pierson EA (2010) Metabolism and function of phenazines in bacteria: impacts on the behavior of bacteria in the environment and biotechnological processes. *Appl Microbiol Biotechnol* 86: 1659-1670
- Poole K (2005) Aminoglycoside resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 479-487
- Portugal (2007) Decreto Regulamentar nº 5/97. *Diário da República Portuguesa, I série B*, 75 – 31 de março de 2007, pp. 1397-1422
- Portugal (2004) Decreto-Lei nº 142/2004. *Diário da República Portuguesa, I série A*. 136 – 11 de junho de 2004, pp. 3632-3640
- Portugal (2007) Decreto-Lei nº 306/2007. *Diário da República Portuguesa, I série A*. 164 – 27 de agosto de 2007, pp. 5747-5765
- Portugal (1990) Decreto-Lei nº 86/90. *Diário da República Portuguesa, I série A*. 63 – 16 de março de 1990, pp. 1254-1264
- Portugal (1990) Decreto-Lei nº 90/90. *Diário da República Portuguesa, I série A*. 63 – 16 de março de 1990, pp. 1296-1304
- Portugal (2000) Portaria nº 1220/2000. *Diário da República Portuguesa, I série B*. 299 – 29 de dezembro de 2000, pp. 7486-7487
- Queenan AM, Bush K (2007) Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 20: 440-458
- Quinteira S, Peixe L (2006) Multiniche screening reveals the clinically relevant metallo-beta-lactamase VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* far from the hospital setting: an ongoing dispersion process? *Appl Environ Microbiol* 72: 3743-3745
- Ramette A (2007) Multivariate analysis in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol* 62: 142-160
- Ramisse F, Van Delden C, Gidenne S, Cavallo J, Hernandez E (2000) Decreased virulence of a strain of *Pseudomonas aeruginosa* O12 overexpressing a chromosomal type 1 beta-lactamase could be due to reduced expression of cell-to-cell signaling dependent virulence factors. *FEMS Immunol Med Microbiol* 28: 241-245
- Read RC, Roberts O, Munro N (1992) Effect of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids on mucociliary transport and ciliary beating. *J Appl Physiol* 72: 2271-2277



- Renders N, Römling U, Verbrugh H, Van Belkum A (1996) Comparative typing of *Pseudomonas aeruginosa* by random amplification of polymorphic DNA or pulsed-field gel electrophoresis of DNA macrorestriction fragments. *J Clin Microbiol* 34: 3190-3195
- Robertson DM, Parks QM, Young RL, Kret J, Poch KR, Malcolm KC, Nichols DP, Nichols M, Zhu M, Cavanagh HD, Nick JA (2011) Disruption of contact lens-associated *Pseudomonas aeruginosa* biofilms formed in the presence of neutrophils. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52: 2844-2850
- Rocha G, Veríssimo A, Bowker R, Bornstein N, da Costa MS (1995) Relationship between *Legionella* spp. and antibody titres at a therapeutic thermal *thermae* in Portugal. *Epidemiol Infect* 115: 79-88
- Römling U, Tümmler B (2000) Achieving 100% typeability of *Pseudomonas aeruginosa* by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 38: 464-465
- Ruimy R, Genauzeau E, Barnabe C, Beaulieu A, Tibayrenc M, Andremont A (2001) Genetic diversity of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from ventilated patients with nosocomial pneumonia, cancer patients with bacteremia, and environmental water. *Infect Immun* 69: 584-588
- Ruiz-Martinez L, López-Jiménez L, Fusté E, Vinuest T, Martín JL, Viñas M (2011) Class 1 integrons in environmental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents* 38: 398-402
- Sadikot RT, Blackwell TS, Christman JW, Prince AS (2005) Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 171: 1209-1223
- Saha R, Saha N, Donofrio RS, Bestervelt LL (2012) Microbial siderophores: a mini review. *J Basic Microbiol* 52: 1-15
- Said MB, Khefacha S, Maalej L, Daly I, Hassen A (2011) Effect of ultraviolet, electromagnetic radiation subtype C (UV-C) dose on biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Afr J Microbiol Res* 25: 4353-4358
- Salunkhe P, Smart CHM, Morgan AW, Panagea S, Walshaw MJ, Hart A, Geffers R, Tümmler B, Winstanley C (2005) A cystic fibrosis epidemic strain of *Pseudomonas aeruginosa* displays enhanced virulence and antimicrobial resistance. *J Bacteriol* 187: 4908-4920
- Schilliger P, Bardelay G (1989) Effects indésirables des cures thermals. In: La cure thermale: savoir évaluer et prescrire. Conseils & arguments. Schilliger P, Bardelay G (eds). Paris, France, Editions Frison-Roche, pp.131-141
- Selezska K, Kazmierczak M, Müsken M, Garbe J, Schobert M, Häussler S, Wiehlmann L, Rohde C, Sikorski J (2012) *Pseudomonas aeruginosa* population structure revisited under environmental focus: impact of water quality and phage pressure. *Environ Microbiol* 14: 1952-1967



- Shrivastava R, Upreti RK, Jain SR, Prasad KN, Seth PK, Chaturvedi UC (2004) Suboptimal chlorine treatment of drinking water leads to selection of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Ecotoxicol Environ Saf* 58: 277-283
- Slekovec C, Plantin J, Cholley P, Thouverez M, Talon D, Bertrand X, Hocquet D (2012) Tracking down antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a wastewater network. *PLoS ONE* 7: e49300
- Smibert RM, Krieg NR (1981) General characterization. In: *Manual methods for general microbiology*. Gerhardt P, Murray RGE, Costilow RNE, Nester W, Wood WA, Krieg NR, Phillips GH (eds). Washington, Estados Unidos da America, American Society for Microbiology, pp. 409-433
- Smillie C, Garcillán-Barcia MP, Francia MV, Rocha EPC, de la Cruz F (2010) Mobility of plasmids. *Microbiol Mol Biol Ver* 74: 434-452
- Smith K, Hunter IS (2008) Efficacy of common hospital biocides with biofilms of multi-drug resistant clinical isolates. *J Med Microbiol* 57: 966-973
- Spiers AJ, Buckling A, Rainey PB (2000) The causes of *Pseudomonas* diversity. *Microbiol* 146: 2345-2350
- Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (SMEWW), 20<sup>a</sup> edição (1998) Part 9000 – Microbiological examination. American Public Health Association, American Water Works Association e Water Environment Federation, Washington DC, EUA
- Stapper AP, Narashimhan G, Ohman DE, Barakat J, Hentzer M, Molin S, Kharazmi A, HØiby N, Mathee K (2004) Alginate production affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development and architecture, but is not essential for biofilm formation. *J Med Microbiol* 53: 679-690
- Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW (2002) Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* 56: 187-209
- Stover CK, Pham WQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrener P, Hickey MJ, Brinkman FSL, Hufnagle WO, Kowalik DJ, Lagrou M, Garber RL, Goltry L, Toletino E, Westbrook-Wadman S, Yuan Y, Brody LL, Coulter SN, Folger KR, Kas A, Larbig K, Lim R, Smith K, Spencer D, Wong GK-S, Wu Z, Paulsen IT, Reizer J, Saier MH, Hancock REW, Lory S, Olson MV (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature* 406: 959-964
- Strateva I, Yordanov D (2009) *Pseudomonas aeruginosa* – a phenomenon of bacterial resistance. *J Med Microbiol* 58: 1133-1148
- Strateva T, Mitov I (2011) Contribution of an arsenal of virulence factors to pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Ann Microbiol* 61: 717-732



- Tabata A, Nagamune H, Maeda T, Murakami K, Miyake Y, Kourai H (2003) Correlation between resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to quaternary compounds and expression of outer membrane protein OprR. *Antimicrob Agents Chemother* 47: 2093-2099
- Tateda K, Ishii Y, Horikawa M, Matsumoto T, Myiari S, Pechere JC, Standiford TJ, Ishiguro M, Yamaguchi K (2003) The *Pseudomonas aeruginosa* autoinducer N-3-oxododecanoyl homoserine lactone accelerates apoptosis in macrophages and neutrophils. *Infect Immun* 71: 5785-5793
- Teixeira F (2012) O termalismo na Região Centro. In: Águas minerais naturais e de nascente da Região Centro. Cortez JAS (ed). Aveiro, Portugal, *Mare Liberum* Editora, pp. 264-300
- Thai TP, Keast DH, Campbell KE, Woodbury MG, Houghton PE (2005) Effect of ultraviolet light C on bacterial colonization in chronic wounds. *Ostomy Wound Manage* 51: 32-45
- Tirodimos I, Arvanitidou M, Dardavessis L, Bisiklis A, Alexiou-Daniil S (2010) Prevalence and antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from swimming pools in northern Greece. *East Mediterr Health* 16: 783-787
- União Europeia (2009) Diretiva 2009/54/CE do Parlamento Europeu e do Conselho, de 18 de junho de 2009, relativa à exploração e comercialização de águas minerais naturais. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*. L 164/45-58
- União Europeia (1975) Diretiva 76/160/CEE do Conselho, de 8 de dezembro de 1975, relativa à qualidade das águas balneares. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*. L 31/1-7
- União Europeia (1998) Diretiva 98/83/CE do Conselho, de 3 de novembro de 1998, relativa à qualidade da água destinada ao consumo humano. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*. L 330/32-54
- Van Delden C, Iglewski BH (1998) Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg Infect Dis* 4: 551-560
- Vinogradova, Y., Hippisley-Cox, J. and Coupland, C. (2009) Identification of new risk factors for pneumonia: population-based case-control study. *Br J Gen Pract* 59: e329-338
- Webb JS (2007) Differentiation and dispersal in biofilms. In: *The biofilm mode of life: mechanisms and adaptations*. Kjelleberg S, Givskov M (eds) Norfolk, Reino Unido, Horizon Bioscience, pp. 165-175
- Wiedmann-al-Ahmad M, Tichy HV, Schön G (1994) Characterization of *Acinetobacter* type strains and isolates obtained from wastewater treatment plants by PCR fingerprinting. *Appl Environm Microbiol* 60: 4066-4071
- Wilheim S, Gdynia A, Tielen P, Rosenau F, Jaeger KE (2007) The autotransporter esterase EstA of *Pseudomonas aeruginosa* is required for rhamnolipid production, cell motility, and biofilm formation. *J Bacteriol* 189: 6695-6703



- Wingender J, Flemming HC (2011) Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. *Int J Hyg Environ Health* 214: 417-423
- Wolfgang MC, Kulasekara BR, Liang X, Boyd D, Wu K, Yang Q, Miyada CG, Lory S (2003) Conservation of genome content and virulence determinants among clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 8484-8489
- Woods DE, Schaffer MS, Rabin HR, Campbell GD, Sokol PA (1986) Phenotypic comparison of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a variety of clinical sites. *J Clin Microbiol* 24: 260-264
- Xi C, Zhang Y, Marrs CF, Ye W, Simon C, Foxman B, Nriagu J (2009) Prevalence of antibiotic resistance in drinking water treatment and distribution systems. *App Environ Microbiol* 75: 5714-5718
- Yamane K, Doi Y, Yokoyama K, Yagi T, Kurokawa H, Shibata N, Shibayama K, Kato H, Arakawa Y (2004) Genetic environments of the *rmtA* gene in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 2069-2074
- Yu Y-S, Qu T-T, Zhou J-Y, Wang J, Li H-Y, Walsh TR (2006) Integrons containing the VIM-2 metallo-beta-lactamase gene among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains from different Chinese hospitals. *J Clin Microbiol* 44: 4242-4245





## **Carta de Desintenção, ou des-intencionada.**

Não há vãos para sintomas de ausências, rumores internos e eternos...

É tempo de des-equilíbrios.

Crescem assim, quase entre os dedos, no silêncio, controlados sem controle, e paradoxalmente, desejados: “seres”.

Replicam soluções “in” e solúveis, a olhos vistos, o que ainda não é, já sendo.

Provar o mais leve mover-se. Suspiros nas pontas das mãos...estranhos prazeres esses da ciência.

A prova-ação entre a ficção e o real.

“Presente”, gritou a bactéria, contou-me o cientista.

Moucos, contentamo-nos, por incapacidades, a ver, com nossos olhos, o que entre os dedos da ciência cresceu, no silêncio.

Homenagem aos pesquisadores capazes de, além das descobertas, nos por a sonhar.

Fátima Roque





