

MARIANA DE BARROS

**SISTEMAS DE EFLUXO MULTIDROGAS E BIOFILMES EM BACTÉRIAS
MULTIRRESISTENTES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientadora: Maria Aparecida S. Moreira

Coorientadores: Gustavo Costa Bressan
Luis Augusto Nero
Ricardo Seiti Yamatogi

**VIÇOSA – MINAS GERAIS
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

Barros, Mariana de, 1985-

B277s
2022

Sistemas de efluxo multidroga e biofilmes em bactérias
multirresistentes / Mariana de Barros. – Viçosa, MG, 2022.
1 dissertação eletrônica (64 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Veterinária, 2022.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.317>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Agentes antiinfeciosos. 2. Resistência à drogas.
3. Adesão. 4. *Escherichia coli*. 5. *Staphylococcus aureus*.
I. Moreira, Maria Aparecida Scatamburlo, 1963-.
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária. III. Título.

CDD 22. ed. 615.329

Bibliotecário(a) responsável: Bruna Silva CRB6/2552

MARIANA DE BARROS

**SISTEMAS DE EFLUXO MULTIDROGAS E BIOFILMES EM BACTÉRIAS
MULTIRRESISTENTES**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 28 de janeiro de 2022.

Assentimento:



Mariana de Barros

Autora



Maria Aparecida Scatamburlo Moreira

Orientadora

A meu filho Davi.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e por iluminar meus caminhos para chegar aqui.

Agradeço a meu marido e grande amor, Magno, por ser meu suporte, apoiar todas as minhas decisões e me estimular a seguir em frente.

Agradeço a meu filho, Davi, razão para eu ser melhor a cada dia e motivo de felicidade diário.

Agradeço a minha família, fonte de amor e maravilhosa rede de apoio, sem a qual esse trabalho não teria sido concluído.

Agradeço à Maria Aparecida Scatamburlo Moreira, a Cidinha, que muito mais que orientadora, considero uma amiga. Ela foi calma nas minhas tempestades e sempre esteve a disposição para me escutar e auxiliar durante a árdua caminhada da pós-graduação.

Agradeço aos amigos e colegas do LDBAC, sem vocês o lab não teria graça! Obrigada pelos cafés, pelos desabafos, pela descontração e por toda a contribuição. Agradeço especialmente à Lane, que esteve a meu lado durante todo o experimento e topava minhas loucuras de reunir em um dia testes que durariam pelo menos três.

Agradeço às estagiárias, Ana Júlia e Raquel, por aceitarem o desafio de estar comigo na bancada, desvendando e inventando ensaios, me ajudando a cumprir meus objetivos.

Aos amigos da preventiva, por serem apoio e leveza. Por tirarem minhas dúvidas e partilharem minhas angústias.

Aos funcionários do setor, Sr. Luiz, Nívia, Marquinho, Élcio, Batalha, Dagoberto e Alex, que tornavam tudo mais fácil na condução do experimento. Cada um com sua habilidade, contribuiu de alguma forma com a realização desse trabalho.

Agradeço à Rosi, excepcional secretária. Se existe burocracia na Pós-Graduação, desconheço e a razão é ela.

Agradeço aos professores do Departamento de Veterinária, em especial do Setor de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública por cederem reagentes, equipamentos e laboratórios. Sem essas parcerias, nenhum resultado teria sido alcançado.

Agradeço aos professores Mateus Matiuzzi da Costa, Rinaldo Aparecido Mota, Luís Augusto Nero e Luciano dos Santos Bersot por cederem os isolados bacterianos utilizados nesse trabalho.

Agradeço à CAPES (o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil [CAPES] – Código de Financiamento 001), CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro, essencial para a realização dessa pesquisa.

Agradeço à UFV pela minha formação e excelência.

Obrigada!

“Nós, para os outros, apenas criamos pontos de partida.”

(Simone de Beauvoir)

BIOGRAFIA

MARIANA DE BARROS, filha de José Vieira de Barros e Aparecida Helena da Silva de Barros, nasceu em Santo André - SP, em 19 de setembro de 1985.

Em março de 2004 iniciou seus estudos em Bioquímica na Universidade Federal de Viçosa. Em março de 2008 transferiu-se para o curso de Medicina Veterinária na mesma instituição. Em maio de 2011 graduou-se.

Em agosto de 2014 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, nível de mestrado, na Universidade Federal de Viçosa sob orientação da Professora Maria Aparecida Scatamburlo Moreira, tendo defendido tese em julho de 2016 com o tema “Atividade de 7-epiclusianona e do complexo metálico 7-epiclusianona-cobre sobre *Streptococcus* spp. isoladas de mastite bovina”.

Em agosto de 2016, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, nível de doutorado, na Universidade Federal de Viçosa sob orientação da Professora Maria Aparecida Scatamburlo Moreira, submetendo-se a defesa de tese em janeiro de 2022.

RESUMO

BARROS, Mariana de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, janeiro de 2022. **Sistemas de Efluxo Multidroga e Biofilmes em Bactérias Multirresistentes**. Orientadora: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira. Coorientadores: Gustavo Costa Bressan, Luis Augusto Nero e Ricardo Seiti Yamatogi.

A resistência aos antimicrobianos é um desafio mundial já declarado por diversos órgãos e se dá, principalmente, devido ao uso indiscriminado dessas drogas. Sistemas de efluxo multidroga são transportadores de membrana que podem expelir antimicrobianos de diferentes classes conferindo multirresistência a seus hospedeiros e estão também envolvidos na formação de biofilmes. Assim, os objetivos do presente trabalho incluíram compreender o papel desempenhado por SEM na resistência aos antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* multirresistentes, detectar sua atividade e investigar seu envolvimento na formação de biofilmes nesses micro-organismos. Após seleção de *S. aureus* e *E. coli* MDR de diferentes origens, foi detectada a presença de genes de SEM por PCR, as concentrações inibitórias mínimas (MICs) de alguns antimicrobianos foram determinadas na presença e ausência de inibidores de SEM, bem como a formação de biofilme pelos isolados nessas duas condições. Ainda, verificou-se o efluxo de corantes fluorescentes para demonstração de atividade de SEM. Ao final, traçou-se a relação filogenética dos isolados com o auxílio da PFGE. Os genes de SEM estão amplamente difundidos entre *S. aureus* e *E. coli* multirresistentes. Cerca de 20% dos isolados de *E. coli* tiveram redução na MIC de ampicilina e ciprofloxacina. Em *S. aureus* não houve redução na MIC de ciprofloxacina e tetraciclina. Utilizando efluxo de corantes, aproximadamente 79% dos isolados de *E. coli* demonstraram atividade de SEM, enquanto 56% de *S. aureus* o fizeram. O uso de inibidor de SEM não reduziu a formação de biofilme em *E. coli* mas a reduziu em *S. aureus*. Quanto à epidemiologia molecular, os isolados de *E. coli* recuperados de humanos apresentaram um padrão mais diverso, enquanto aqueles obtidos de animais foram mais homogêneos. *S. aureus* de maneira geral foram mais homogêneos, com similaridade superior a 84% dentro dos *clusters*. A atividade de SEM é relevante entre bactérias multirresistentes, porém as tentativas de inibição não culminaram em restituição da sensibilidade, provavelmente devido a ocorrência de outros mecanismos de resistência simultaneamente. Em relação à formação de biofilmes, resultados controversos foram encontrados, e novos estudos com diferentes concentrações do inibidor são sugeridos para conclusões mais contundentes. Além disso, a complementação desses resultados

com estudos de sequenciamento completo dos isolados, já em execução, pode fornecer novas pistas para o esclarecimento do papel de SEM na resistência antimicrobiana e na formação de biofilmes em isolados multirresistentes.

Palavras-chave: Bombas de efluxo. Resistência aos antimicrobianos. Adesão. *Escherichia coli*. *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

BARROS, Mariana de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, January, 2022. **Multidrug Efflux Systems and Biofilms in Multidrug-Resistant Bacteria.** Adviser: Maria Aparecida Scatamburlo Moreira. Co-advisers: Gustavo Costa Bressan, Luis Augusto Nero and Ricardo Seiti Yamatogi.

Antimicrobial resistance is a global challenge that has already been developed by several agencies and is mainly due to the discriminatory use of drugs. Multidrug efflux systems (MES) are membrane transporters that can expel antimicrobials of different classes conferring multidrug resistance (MDR) to their hosts and are also involved in the formation of biofilms. Thus, the objectives of the work include understanding the role played by MES in the resistance to antimicrobials of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, detecting their activity and investigating their involvement in the formation of biofilms in these microorganisms. After selection of *S. aureus* and *E. coli* MDR from different origins, the presence of MES genes was detected by PCR, the minimum inhibitory concentrations (MICs) of some antimicrobials were determined in the presence and absence of SEM inhibitors, as well as the biofilm formation by the isolates under these two conditions. In addition, the efflux of fluorescent dyes was measured to demonstrate MES activity. At the end, the phylogenetic relationship of the isolates was traced with the aid of PFGE. MES genes are widespread among multidrug resistant *S. aureus* and *E. coli*. About 20% of the *E. coli* isolates had a reduction in the MIC of ampicillin and ciprofloxacin. In *S. aureus* there was no reduction in the MIC of ciprofloxacin and tetracycline. Using dye efflux, approximately 79% *E. coli* isolates had MES activity, while 56% *S. aureus* did. The use of SEM inhibitor did not reduce biofilm formation in *E. coli* but reduced it in *S. aureus*. Regarding molecular epidemiology, *E. coli* isolates recovered from humans showed a more diverse pattern, while those obtained from animals were more homogeneous. *S. aureus* were generally more homogeneous, with similarity greater than 84% within the clusters. MES activity is relevant among multidrug-resistant bacteria, however, attempts at MES inhibition did not lead to the restoration of resistance, probably due to the occurrence of other resistance mechanisms simultaneously. Regarding the combination of biofilms, controversial results were found and new studies with different concentrations of the inhibitor are suggested for stronger conclusions. Furthermore, a complementation of these results with studies of whole genome sequencing of the isolates, already running, may provide new clues to clarify the role of MES in antimicrobial resistance and in the formation of biofilms in multidrug-resistant isolates.

Keywords: Efflux pumps. Antimicrobial resistance. Adhesion. *Escherichia coli*.
Staphylococcus aureus.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

Figura 1 – Representação esquemática das famílias de Sistemas de Efluxo Multidrogas presentes em bactérias..... 18

Figura 2 – Ciclo de formação de biofilmes..... 19

Capítulo 1

Figura 1 – Mapa de calor da resistência aos antimicrobianos. 25

Figura 2 – Curvas representativas de efluxo de Nile Red..... 33

Figura 3 - Dendogramas dos isolados de *Escherichia coli* baseados nos padrões de PFGE pós-digestão com *XBal*. 35

Capítulo 2

Figura 1 - Mapa de calor de resistência aos antimicrobianos para isolados de *Staphylococcus aureus* multirresistentes..... 47

Figura 2 - Curvas representativas de efluxo de brometo de etídeo por isolados de *Staphylococcus aureus* multirresistentes recuperados de humanos, animais e alimentos. 54

Figura 3 - Box plot das médias de crescimento planctônico (A) e biomassa de biofilme (B) de 19 isolados de *Staphylococcus aureus* multirresistentes obtidos de humanos, animais e alimentos na presença e ausência do inibidor de sistema de efluxo multidrogas carbonil cianida m-clorofenilhidrazona (CCCP)..... 55

Figura 4 - Dendogramas dos isolados de *Staphylococcus aureus* multirresistentes baseados nos padrões de PFGE pós-digestão com *SmaI* associado com genes de Sistema de Efluxo Multidrogas..... 56

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

- Tabela 1 – Isolados de *Escherichia coli* selecionados para estudo. 24
- Tabela 2 - *Primers* usados para detecção em *Escherichia coli* de genes de sistema de efluxo multidrogas pertencentes a diferentes famílias por meio da técnica de PCR. 27
- Tabela 3 – Tratamentos sob os quais foi avaliada a formação de biofilmes por isolados de *Escherichia coli* multirresistentes..... 29
- Tabela 4 - Médias obtidas nos diferentes ensaios para caracterização da formação de biofilmes por *Escherichia coli* multirresistente isoladas de humanos..... 34
- Tabela 5 - Médias obtidas nos diferentes ensaios para caracterização da formação de biofilmes por *Escherichia coli* multirresistente isoladas de animais..... 34

Capítulo 2

- Tabela 1. – Isolados de *Staphylococcus aureus* multirresistentes selecionados para o estudo..... 46
- Tabela 2 - *Primers* para detecção de genes de sistema de efluxo multidrogas de *Staphylococcus aureus* através da técnica de PCR. 48
- Tabela 3 - Número de isolados de *Staphylococcus aureus* multirresistentes classificados quanto à produção de biofilme de acordo com sua origem de isolamento..... 55

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	16
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
Capítulo 1 – Relação de sistema de efluxo multidrogas na formação de biofilmes em isolados de <i>Escherichia coli</i> multirresistentes	22
1. INTRODUÇÃO	23
2. MATERIAL E MÉTODOS	24
2.1. Isolados bacterianos e condições de multiplicação	24
2.2. Reagentes químicos	26
2.3. Detecção molecular dos sistemas de efluxo multidrogas	26
2.4. Detecção fenotípica dos sistemas de efluxo multidrogas	27
2.4.1. <i>Concentração Inibitória Mínima (MIC)</i>	27
2.4.2. <i>Quantificação de efluxo</i>	28
2.5. Biofilme na ausência e presença de PAβN	28
2.6. Tipagem molecular	30
2.7. Análise estatística	31
3. RESULTADOS	32
3.1. Detecção molecular de sistema de efluxo multidrogas	32
3.2. Detecção fenotípica de sistema de efluxo	32
3.2.1. <i>Concentração inibitória mínima (MIC)</i>	32
3.2.2. <i>Quantificação de efluxo</i>	33
3.3. Biofilme na presença e ausência de PAβN	34
3.4. Tipagem molecular	35
4. DISCUSSÃO	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
Capítulo 2 – Resistência mediada por Sistema de Efluxo Multidrogas em <i>Staphylococcus aureus</i> multirresistentes	43
1. INTRODUÇÃO	44
2. MATERIAL E MÉTODOS	45
2.1. Seleção dos isolados bacterianos e condições de multiplicação	45

2.2. Reagentes químicos	47
2.3. Detecção molecular dos sistemas de efluxo multidrogas	48
2.4. Detecção fenotípica dos sistemas de efluxo multidrogas	49
2.4.1. <i>Concentração Inibitória Mínima (MIC)</i>	49
2.4.2. <i>Quantificação de efluxo</i>	49
2.5. Biofilme na presença e ausência de CCCP	50
2.6. Tipagem molecular	51
2.7. Estatística	52
3. RESULTADOS	53
3.1. Detecção molecular de sistemas de efluxo	53
3.2. Detecção fenotípica de sistemas de efluxo	53
3.3. Biofilmes na presença e ausência de CCCP	54
3.4. Tipagem molecular	55
4. DISCUSSÃO	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
CONCLUSÕES GERAIS	64

INTRODUÇÃO GERAL

Os mecanismos de resistência aos antimicrobianos (AMR) podem ser classificados em três categorias principais, às vezes parcialmente sobrepostas: resistência intrínseca que compreende mecanismos intrínsecos à bactéria, que limitam a ação do fármaco, por exemplo, absorção lenta ou extrusão do antimicrobiano por sistemas de efluxo; resistência adquirida onde uma mutação ou transferência horizontal de um gene de resistência conferem resistência, tipicamente modificando/degradando o antimicrobiano ou modificando/protégendo o alvo do fármaco; e resistência adaptativa, onde ocorre um aumento transitório de resistência devido à indução de um gene pelo próprio antimicrobiano, isto é, a interação com o antimicrobiano é o desencadeante da resistência a esse antimicrobiano e às vezes a outros (HUGHES; ANDERSSON, 2017; MORRISON; ZEMBOWER, 2020).

Avanços na ecologia microbiana levaram ao conceito de resistoma, reservatório ambiental de todos os genes de resistência a antimicrobianos e seus precursores em bactérias patogênicas e não patogênicas, para explicar como a resistência intrínseca pode se desenvolver e se disseminar entre as bactérias (D’COSTA et al., 2006; GAZE et al., 2013). Diante dessa ameaça, a resistência foi identificada como um dos desafios mais importantes para a saúde humana por uma ampla variedade de organismos nacionais e internacionais, incluindo a Organização Mundial de Saúde (WHO), o G8 e o Fundo Monetário Internacional (PAPKOU et al., 2020).

O reconhecimento intersetorial da ligação intrincada entre a saúde animal, a saúde humana e o meio ambiente é fundamental. Esforços combinados e colaborativos entre todas as partes são essenciais para lidar com este complexo problema de resistência (POKHAREL; SHRESTHA; ADHIKARI, 2020).

Dessa maneira, selecionou-se as espécies bacterianas *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, como modelos das bactérias Gram positivas e Gram negativas, respectivamente, para compreender como Sistemas de Efluxo Multidrogas se relacionam com a resistência antimicrobiana e formação de biofilmes em isolados multirresistentes.

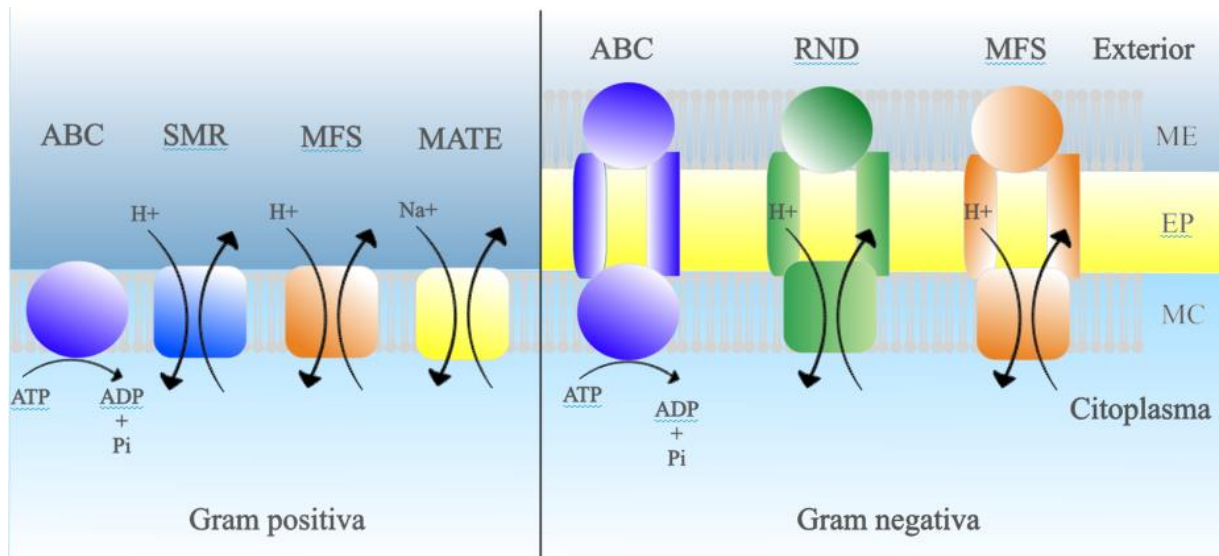
S. aureus é uma bactéria Gram-positiva que tem a forma de cocos e tende a se organizar em cachos descritos como "parecidos com uvas". Em laboratório, esses organismos podem crescer em até 10% de cloreto de sódio e as colônias costumam ser douradas ou amarelas. Esses organismos podem crescer aerobicamente ou anaerobicamente (facultativo) e em temperaturas

entre 18 e 40 ° C. Os testes típicos de identificação bioquímica incluem catalase positiva, coagulase positiva, sensibilidade à novobiocina e fermentação de manitol (LOWY, 1998). *S. aureus* é encontrado no meio ambiente e também na microbiota humana normal, localizado na pele e nas membranas mucosas (mais frequentemente na área nasal) da maioria dos indivíduos saudáveis (LOWY, 1998). *S. aureus* é um importante patógeno bacteriano humano que possui uma gama de hospedeiros cosmopolita, incluindo animais domésticos, animais de produção e selvagens (MATUSZEWSKA et al., 2020).

E. coli é uma bactéria anaeróbia facultativa Gram-negativa originalmente descoberta no cólon humano em 1885 pelo bacteriologista alemão Theodor Escherich (PONTRELLI et al., 2018). É um micro-organismo comensal do intestino de vertebrados e está cada vez mais envolvido em várias infecções intestinais e extra-intestinais como um patógeno oportunista (DENAMUR et al., 2021). Além disso, *E. coli* também pode causar infecções graves em animais e existe a preocupação com a possível transmissão de *E. coli* virulenta e/ou resistente entre animais e humanos por meio de várias vias, como contato direto, contato com excreções animais ou via cadeia alimentar (POIREL et al., 2018). *E. coli* também representa um importante reservatório de genes de resistência que podem ser responsáveis por falhas no tratamento tanto na medicina humana quanto na veterinária (POIREL et al., 2018).

Dentre a gama de mecanismos de resistência que as bactérias apresentam, selecionou-se os Sistemas de Efluxo Multidroga (SEM) para estudo. Essas bombas são encontradas em todas as espécies bacterianas e são complexos de proteínas capazes de transportar moléculas de vários tamanhos e propriedades do interior da célula bacteriana para o espaço extracelular (BLAIR; PIDDOCK, 2009). De acordo com a sua composição, o número de regiões transmembrana e fontes de energia e substratos, os sistemas de efluxo são classificados em seis famílias: família *Resistance-nodulation-division* (RND), *Major facilitator superfamily* (MFS), superfamília *ATP (adenosine triphosphate)-binding cassette* (ABC), família *Small multidrug resistance* (SMR), família *Multidrug and toxic compound extrusion* (MATE) e superfamília *Drug metabolite transporter* (DMT) (UGHACHUKWU; UNEKWE, 2012), sendo que as cinco primeiras famílias já foram descritas em bactérias. MFS, SMR, MATE e RND usam energia próton-motora enquanto os transportadores da família ABC usam hidrólise direta de ATP para conduzir o transporte (BLAIR; PIDDOCK, 2009). Exceto para a superfamília RND que é encontrada apenas em bactérias Gram-negativas, as outras famílias são amplamente distribuídas tanto em bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas (SUN; DENG; YAN, 2014). A Figura 1 mostra um esquema das famílias de SEM.

Figura 1 – Representação esquemática das famílias de Sistemas de Efluxo Multidrogas presentes em bactérias. A superfamília *ATP (adenosine triphosphate)-binding cassette* (ABC), utiliza a energia derivada da quebra do ATP para realizar o efluxo. As famílias *Resistance-nodulation-division* (RND), *Major facilitator superfamily* (MFS) e *Small multidrug resistance* (SMR), utilizam o antiporte de prótons e a família *Multidrug and toxic compound extrusion* (MATE) o antiporte com íons Na^+ .

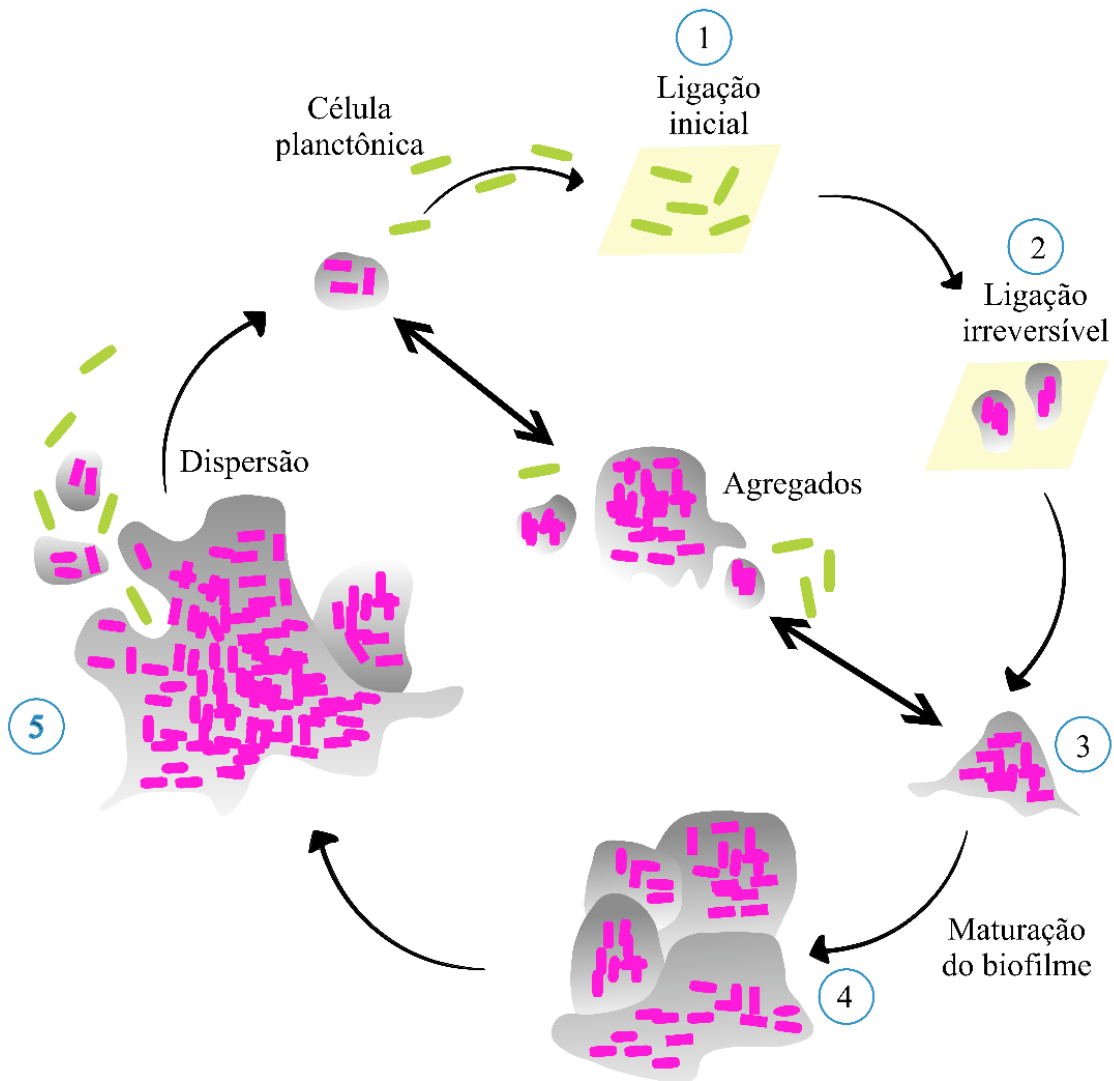


ME: membrana externa; EP: espaço periplasmático; MC: membrana citoplasmática. Fonte: elaborado pela autora.

Dentre os diversos papéis desempenhados pelos SEM, há o envolvimento na formação de biofilmes. As bactérias exibem dois modos de crescimento: o modo planctônico de vida livre e o modo sésil aderido à superfície em biofilmes, que são comunidades estruturadas encerradas em uma matriz polimérica autoproduzida (RUMBAUGH; SAUER, 2020). As etapas de formação do biofilme são mostradas na Figura 2.

O uso generalizado de antimicrobianos é o principal impulsionador da resistência emergente. O combate à disseminação exige esforços multidisciplinares para limitar o uso desnecessário de antimicrobianos e implementar medidas de prevenção e controle para limitar a transmissão desses patógenos perigosos (MORRISON; ZEMBOWER, 2020).

Figura 2 – Ciclo de formação de biofilmes. O processo é iniciado após o contato superficial por células planctônicas através de uma ligação reversível (etapa 1), seguida pela ligação irreversível (etapa 2) e maturação do biofilme (etapas 3 e 4). O ciclo de vida do biofilme se completa quando os biofilmes se dispersam (etapa 5).



Fonte: adaptado de Rumbaugh e Sauer (2020).

Dessa maneira, os objetivos do presente trabalho incluem compreender o papel desempenhado por SEM na resistência aos antimicrobianos em bactérias multirresistentes e seu envolvimento na formação de biofilmes nesses micro-organismos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BLAIR, J. M.; PIDDOCK, L. J. Structure, function and inhibition of RND efflux pumps in Gram-negative bacteria: an update. **Current Opinion in Microbiology**, v. 12, n. 5, p. 512–519, 2009.
- D’COSTA, V. M. et al. Sampling the antibiotic resistome. **Science**, v. 311, n. 5759, p. 374–377, 2006.
- DENAMUR, E. et al. The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 1, p. 37-54, 2021.
- GAZE, W. H. et al. Influence of humans on evolution and mobilization of environmental antibiotic resistome. **Emerging infectious diseases**, v. 19, n. 7, p. e120871, 2013.
- HUGHES, D.; ANDERSSON, D. I. Environmental and genetic modulation of the phenotypic expression of antibiotic resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, n. 3, p. 374–391, 2017.
- LOWY, F. D. *Staphylococcus aureus* Infections. **The New England Journal of Medicine**, v. 339, n. 8, p. 520–532, 1998.
- MATUSZEWSKA, M. et al. The Evolutionary Genomics of Host Specificity in *Staphylococcus aureus*. **Trends in Microbiology**, v. 28, n. 6, p. 475-477, 2020.
- MORRISON, L.; ZEMBOWER, T. R. Antimicrobial Resistance. **Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America**, v. 30, n. 4, p. 619-635, 2020.
- NATHAN, C. Resisting antimicrobial resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 18, n. 5, p. 259- 260, 2020.
- PAPKOU, A. et al. Efflux pump activity potentiates the evolution of antibiotic resistance across *S. aureus* isolates. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1–15, 2020.
- POIREL, L. et al. Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli*. **Microbiology Spectrum**, v. 6, n. 4, p. 1-27, 2018.
- POKHAREL, S.; SHRESTHA, P.; ADHIKARI, B. Antimicrobial use in food animals and human health: time to implement ‘One Health’ approach. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 9, n. 181, p. 1–5, 2020.
- PONTRELLI, S. et al. *Escherichia coli* as a host for metabolic engineering. **Metabolic Engineering**, v. 50, p.16-46, 2018.
- RUMBAUGH, K. P.; SAUER, K. Biofilm dispersion. **Nature Reviews Microbiology**, v.18, n. 10, p. 571-586, 2020.

SUN, J.; DENG, Z.; YAN, A. Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 453, n. 2, p. 254–267, 2014.

THAKUR, S.; GRAY, G. C. The mandate for a global “one health” approach to antimicrobial resistance surveillance. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, n. 2, p. 227-228, 2019.

UGHACHUKWU, P.; UNEKWE, P. Efflux pump-mediated resistance in chemotherapy. **Annals of medical and health sciences research**, v. 2, n. 2, p. 191–8, 2012.

WHITE, A.; HUGHES, J. M. Critical Importance of a One Health Approach to Antimicrobial Resistance. **EcoHealth**, v. 16, n. 3, p. 404–409, 2019.

Capítulo 1 – Relação de sistema de efluxo multidrogas na formação de biofilmes em isolados de *Escherichia coli* multirresistentes

1. INTRODUÇÃO

Escherichia coli é componente normal da microbiota do intestino de humanos e animais. Porém é também a causa mais frequente de infecções em diferentes sistemas e é um dos principais agentes veiculados por alimentos em todo o mundo (WHO, 2014).

Os sistemas ou bombas de efluxo estão amplamente implicadas na resistência aos antimicrobianos uma vez que são capazes de expulsar a maioria dos antimicrobianos de dentro das células para o ambiente extracelular (ALAV; SUTTON; RAHMAN, 2018). Um único sistema de efluxo multidrogas (SEM) pode exportar vários antimicrobianos, contribuindo para a multirresistência (MDR) bacteriana (NISHINO et al., 2021).

Acredita-se que a promiscuidade original dos sistemas de efluxo foi incidentalmente explorada pelas bactérias para fornecer resistência antimicrobiana, uma vez que estão sob intensa pressão seletiva desde o início do seu uso (HENDERSON et al., 2021). Ainda, o uso excessivo dessas drogas levou muitos micro-organismos a superexpressar esses sistemas de efluxo (WILLERS et al., 2016), contribuindo com o perfil multirresistente.

Há evidências que os SEM desempenham papel na formação de biofilme (ALAV; SUTTON; RAHMAN, 2018), que é definido como uma população bacteriana que está irreversivelmente ligada a um substrato e incorporadas em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares autoproduzidas (WANG et al., 2016).

Em geral, biofilmes são resistentes a antimicrobianos, desinfetantes e a alguns tratamentos físicos, também são capazes de se evadir do sistema imunológico do hospedeiro (BANIN; HUGHES; KUIPERS, 2017; MATSUMURA et al., 2011). Os mecanismos desta resistência são complexos e incluem presença de células persistentes, heterogeneidade do biofilme e ação de diferentes genes que contribuem para a resistência e tolerância aos antimicrobianos nessas comunidades (HALL; MAH, 2017).

Assim, objetivou-se no presente estudo identificar como SEM influenciam a formação de biofilmes em isolados de *E. coli* multirresistentes obtidos de humanos, animais e alimentos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Isolados bacterianos e condições de multiplicação

Foram selecionados isolados de *Escherichia coli* obtidos de humanos, alimentos e animais provenientes de diferentes bacteriotecas de laboratórios parceiros de pesquisa. Os isolados foram selecionados com base em testes prévios de resistência aos antimicrobianos. Para participar do estudo, adotou-se o critério proposto por Magiorakos e colaboradores (2012) para resistência multidroga (MDR): não-sensibilidade a pelo menos uma droga em três classes antimicrobianas. As informações sobre a origem dos isolados selecionados estão dispostas na Tabela 1 e as informações resumidas sobre resistência aos antimicrobianos são mostradas na Figura 1.

Tabela 1 – Isolados de *Escherichia coli* selecionados para estudo. Apresentação dos isolados quanto ao laboratório (LAB) cedente, identificação no estudo, fonte e origem de isolamento.

Laboratório	Identificação	Fonte de isolamento	Origem
LAB A	EC178	Urocultura	Humano
LAB A	EC253	Cultura de vigilância - swab retal	Humano
LAB A	EC256	Cultura de vigilância - swab retal	Humano
LAB A	EC264	Partes moles	Humano
LAB A	EC265	Partes moles	Humano
LAB A	EC286	Cultura de vigilância - swab retal	Humano
LAB A	EC293	Urocultura	Humano
LAB A	EC294	Hemocultura	Humano
LAB A	EC295	Urocultura	Humano
LAB A	EC296	Cultura de vigilância - swab retal	Humano
LAB A	EC300	Partes moles subcutânea	Humano
LAB A	EC304	Secreção + Fragmento de ferida	Humano
LAB A	EC308	Cultura de vigilância - swab retal	Humano
LAB A	EC312	Cultura de vigilância - swab retal	Humano
LAB A	EC327	Cultura de vigilância - swab retal	Humano
LAB B	AY1	Linguiça frescal suína	Alimento
LAB B	AY4	Linguiça frescal suína	Alimento
LAB B	AY5	Linguiça frescal suína	Alimento
LAB C	1UFV	Mastite caprina	Animal
LAB C	1UFV14	Mastite caprina	Animal
LAB C	2RN	Mastite caprina	Animal
LAB C	3UFV	Mastite caprina	Animal
LAB C	3UFV14	Mastite caprina	Animal
LAB C	4CCC	Mastite caprina	Animal
LAB C	5RDR	Mastite caprina	Animal
LAB C	28EU	Mastite caprina	Animal
LAB C	11CP	Mastite caprina	Animal
LAB C	91UFV	Mastite caprina	Animal

Após o recebimento, todos os isolados foram reativados em caldo *Brain Heart Infusion* – BHI (Himedia) e congelado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ utilizando glicerol a 20% como crioprotetor. Foram reativados em caldo BHI por incubação *overnight* a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ para a realização dos ensaios.

A confirmação da espécie foi realizada por meio de PCR para o gene *uspA*, utilizando os primers *uspA* – *u* CCGATACGCTGCCAATCAGT e *uspA* – *d* ACGCAGACCGTAGGCCAGAT (CHEN; GRIFFITHS, 1998). Os ciclos foram: desnaturação inicial a $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 min, seguida por 30 ciclos com desnaturação a $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 min, anelamento a $65,6^{\circ}\text{C}$ (temperatura determinada por gradiente) por 1 min e extensão a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 min. A extensão final ocorreu a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 4 min e os produtos foram resfriados à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ antes da corrida eletroforética em gel de agarose a 1%.

Figura 1 – Mapa de calor da resistência aos antimicrobianos. Os isolados foram separados por laboratório (LAB) de origem.



SMT: sulfametoxazol trimetoprim

2.2. Reagentes químicos

Os inibidores de sistema de efluxo fenil-arginil- β -naftilamida (PA β N), o desacoplador de prótons carbonil cianida m-clorofenilhidrazona (CCCP); os corantes Nile Red e brometo de etídeo e os antimicrobianos ciprofloxacina e ampicilina foram adquiridos da Sigma-Aldrich Brasil.

2.3. Detecção molecular dos sistemas de efluxo multidrogas

Foi utilizada a técnica de PCR para detectar os genes dos sistemas de efluxo multidrogas. A extração do DNA foi realizada por fervura: cerca de cinco colônias isoladas em ágar BHI foram transferidas para microtubos de 1,5 mL contendo 150 μ L de água ultrapura. O conteúdo foi homogeneizado e os microtubos levados ao banho seco por 10 min a 95 °C. Em seguida os tubos foram resfriados a 25 °C (2 min). Na sequência, foram centrifugados a 15000 rpm por 2 min e o sobrenadante transferido para um novo microtubo estéril previamente identificado. As reações simples de amplificação foram conduzidas para cada isolado em 25 μ L de mistura de reação contendo 12,5 μ L de GoTaq® Green Master Mix (Promega), 20 pmol de cada primer, 2 μ L de material genético e 6,5 μ L de água nucleasse *free*.

Os genes pesquisados, *primers* utilizados e tamanho dos produtos estão especificados na Tabela 2. O controle positivo para todas as reações foi o isolado *E. coli* 30 (OSPINA BARRERO et al., 2014). Os ciclos, realizados para cada gene separadamente foram: desnaturação inicial a 95 °C por 15 min, seguido de 35 ciclos com desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 48,2 °C (temperatura definida por gradiente) por 1 min e polimerização a 72 °C por 1 min. A extensão final ocorreu a 72 °C por 5 min. Os produtos das reações foram resfriados à 4 °C antes da corrida eletroforética em gel de agarose a 1%.

Tabela 2 - Primers usados para detecção em *Escherichia coli* de genes de sistema de efluxo multidrogas pertencentes a diferentes famílias por meio da técnica de PCR (VIVEIROS et al., 2007).

Gene	Família	Primer	Sequência (5'-3')	Produto (bp)
<i>acrA</i>	RND	<i>acrA</i> - f	CTTAGCCCTAACAGGATGTG	189
		<i>acrA</i> - r	TTGAAATTACGCTTCAGGAT	
<i>acrB</i>	RND	<i>acrB</i> - f	CGTACACAGAAAGTGCTCAA	183
		<i>acrB</i> - r	CGCTTCAACTTTGTTTTCTT	
<i>acrE</i>	RND	<i>acrE</i> - f	GCCCTCCTTTATTCTGATCT	166
		<i>acrE</i> - r	GGCTATACGATAAGCATTGG	
<i>acrF</i>	RND	<i>acrF</i> - f	TAGCAATTTCCCTTTGTGGTT	247
		<i>acrF</i> - r	CCTTTACCCTCTTTCTCCAT	
<i>emrB</i>	MFS	<i>emrB</i> - f	ATTATGTATGCCGCTGCTT	196
		<i>emrB</i> - r	TTCGCGTAAAGTTAGAGAGG	
<i>emrE</i>	SMR	<i>emrE</i> - f	GGATTGCTTATGCTATCTGG	156
		<i>emrE</i> - r	GTGTGCTTCGTGACAATAAA	
<i>tehA</i>	SMR	<i>tehA</i> - f	TGCTTCATTCTGGAGTTTCT	232
		<i>tehA</i> - r	TCATTCTTTGTCCTCTGCTT	

MFS: major facilitator superfamily; RND: resistance nodulation-cell division family; SMR: small multidrug resistance family.

2.4. Detecção fenotípica dos sistemas de efluxo multidrogas

Os isolados que apresentaram genes relacionados aos SEM foram caracterizados fenotipicamente através da avaliação da concentração inibitória mínima na ausência e presença do inibidor de sistema de efluxo (EPI), PA β N, e por meio da quantificação do efluxo de Nile Red, para demonstrar a atividade de SEM.

2.4.1. Concentração Inibitória Mínima (MIC)

Foram determinadas as Concentrações Inibitórias Mínimas (MICs) na presença e ausência do PA β N a 50 μ g/mL (OSPINA BARRERO et al., 2014) para os antimicrobianos, ampicilina e ciprofloxacina, devido à importância dos β -lactâmicos e quinolonas na vigilância em resistência aos antimicrobianos em *E. coli* (WHO, 2014).

As concentrações de ampicilina variaram de 8 a 128 μ g/mL e de ciprofloxacina de 0,25 a 8 μ g/mL. As MICs foram determinadas em placa de microtitulação de 96 poços por microdiluição em caldo conforme diretrizes do CLSI (2018) utilizando um inóculo final de 5×10^5 UFC/mL padronizado anteriormente por contagem padrão em placa, após reativação *overnight* a 37 °C dos isolados. O teste de MIC foi feito em triplicata e repetido três vezes,

sendo considerada a MIC a menor concentração capaz de inibir a multiplicação bacteriana, comparando-se a turbidez aos controles. *E. coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle de qualidade dos testes.

2.4.2. *Quantificação de efluxo*

Seguiu-se o protocolo publicado por Bohnert, Karamian e Nikaido (2010) com algumas modificações. Para tal, os isolados de *E. coli* foram reativados a 37 °C em caldo Luria Bertani (LB) por 24 h, sob agitação (140 rpm). Em seguida, foram repicados em 3 mL de caldo LB *overnight* (37 °C, 140 rpm). Depois os isolados foram centrifugados a 4400 rpm durante 10 min à temperatura ambiente. O sedimento foi ressuspensão em 1 mL de tampão fosfato de potássio 20 mM contendo 1 mM de MgCl₂ (PPB, pH 7,0). Seguiu-se outra etapa de centrifugação e ressuspensão, e as células foram ajustadas para uma OD₆₆₀ de 1,0 no PPB. As células foram deixadas em repouso por 15 min e o volume ajustado para 1 mL. Na sequência, os tubos receberam CCCP (solução de estoque 5 mM em 50% de DMSO) a uma concentração final de 5 μM e as culturas permaneceram em repouso por 15 min. Alíquotas de 100 μL foram transferidas para três microtubos de 0,5 mL, um contendo PAβN (50 μg/mL), outro contendo ampicilina (32 μg/mL) e outro vazio, formando-se, assim, três tratamentos. As culturas descansaram por 15 min. Em seguida, cada tratamento recebeu Nile Red (solução estoque 5 mM em 10% de dimetilformamida-90% de etanol [vol/vol]) a uma concentração final de 5 μM e a suspensão celular foi incubada sob agitação (140 rpm; 37 °C) por 2,5 h. Posteriormente as células foram deixadas à temperatura ambiente por 30 min e depois centrifugadas durante 5 min a 4400 rpm. Em seguida, a maior parte do sobrenadante foi descartada, e as células ressuspensas em 100 μL de PPB. Imediatamente após, a fluorescência foi acompanhada em um termociclador Rotor Gene Q® com os parâmetros: fonte a 530 nm e detecção a 630 nm, com aquisição a cada 5 segundos por 20 ciclos. Em seguida, o efluxo do Nile Red foi desencadeado pela rápida energização com 5 μL de glicose 1M e monitorado por mais 200 s.

2.5. **Biofilme na ausência e presença de PAβN**

A presença de SEM se relaciona à formação de biofilmes, principalmente em condições de estresse. Testou-se o comportamento dos isolados em relação à formação de biofilmes em diferentes condições, mostradas na tabela 2.

Tabela 3 – Tratamentos sob os quais foi avaliada a formação de biofilmes por isolados de *Escherichia coli* multirresistentes.

TRAMENTO	CONCENTRAÇÃO (µG/ML)
Meio LB	--
PAβN	20 ^a
Ampicilina	32 ^b
PAβN + ampicilina	20 + 32

LB: Luria-Bertani; PAβN: fenilarginil-beta-naftilamida; ^a Concentração estabelecida por Kvist; Hancock e Klemm, 2008; ^b dose subinibitória para os isolados testados

Para esse ensaio foram selecionados os isolados sabidamente resistentes à ampicilina e positivos para os genes de sistema de efluxo na PCR. Ampicilina foi selecionado para esse teste por ser o antimicrobiano com maior número de isolados resistentes e pela sua importância na vigilância em resistência aos antimicrobianos por *E. coli* (WHO, 2014).

Foram mensurados o crescimento planctônico dos isolados, a biomassa de biofilme e verificada a viabilidade dos biofilmes, como descrito por Bay e colaboradores (2017). Para realização dos testes, colônias isoladas foram cultivadas em caldo a 37°C *overnight* (18-20 h) para preparar um inóculo padrão de 10⁸ UFC/mL. Em seguida, os cultivos foram diluídos 1/20 em 3 mL de caldo LB, e 5 µL dessa diluição foram distribuídos em placas de microtitulação de 96 poços, onde os poços tiveram o volume completado para 200 µL com os diferentes tratamentos (10⁷ UFC/mL/poço). Um poço não inoculado serviu como controle de esterilidade. Os isolados foram inoculados em duplicata.

Para determinação do crescimento planctônico, as placas foram incubadas sob agitação (100-150 rpm) a 37°C. Com 24 e 48 h, foram realizadas medidas da densidade ótica a 550 nm, em um espectrofotômetro leitor de placas.

Para os testes de viabilidade de células de biofilme e quantificação de biomassa as placas foram incubadas a 37°C sem agitação durante 24h e 48h.

Após o período de incubação, para a determinação da viabilidade dos biofilmes, os poços foram lavados duas vezes com 200 µL/poço de solução salina 0,9% (p/v) esterilizada. Os biofilmes sobreviventes foram desalojados por sonicação (Banho Ultrassom Quimis Q33502) durante 10 min, com 200 µL/poço de meio de recuperação estéril (LB com 1% [v/v] de Tween 80). Os biofilmes recuperados foram inoculados (20 µL/inóculo) em placas de ágar LB em duplicata e incubados a 37°C por 24 h.

Os biofilmes crescidos 24 ou 48 h foram corados pelo método de coloração de Cristal Violeta (CV) descrito por Stepanovic e colaboradores (2000) para quantificar a formação de biomassa do biofilme. Resumidamente, os poços foram lavados duas vezes com 200 µL de água destilada estéril e secos ao ar durante 10 min. Em seguida, cada poço recebeu 200 µL de metanol

80% para fixação por 15 min. Após descarte do metanol, as placas foram secas ao ar. Depois a coloração foi realizada com 175 µL/poço de CV 0,5% (p/v) por 5 min. Os poços foram enxaguados duas vezes com 200 µl de água destilada estéril e depois descorados durante 2 min com 200 µL de etanol 95%. A OD₅₅₀ foi imediatamente medida para minimizar a evaporação. Os experimentos foram realizados em duplicata e com duas repetições.

Os resultados obtidos em meio de LB foram comparados ao controle negativo (meio não inoculado) para classificar os isolados quanto à produção de biofilmes, utilizando-se os critérios propostos por Stepanovic e colaboradores (2000): $OD \leq OD_c$ = não produtor; $OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$ = fraco produtor; $2 \times OD_c < OD \leq 4 \times OD_c$ = produtor moderado e $4 \times OD_c < OD$ = forte produtor. Onde OD é a média das densidades óticas obtidas para o isolado avaliado e OD_c a média das densidades óticas do controle negativo.

2.6. Tipagem molecular

Para estabelecer a epidemiologia e traçar a relação filogenética entre os isolados separados por origem foi utilizada a técnica de Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (*Pulsed Field Gel Electrophoresis* - PFGE).

A PFGE foi realizada seguindo o protocolo da PulseNet, conforme descrito por Ribot e colaboradores (2006) com modificações. Para a confecção dos *plugs* os isolados de *E. coli* foram inoculados em caldo BHI a 37 °C por 18 h. A concentração bacteriana foi ajustada a uma densidade óptica de 1,0 (DO_{610nm}). Em seguida, 400 µL da suspensão bacteriana foi transferida para microtubos de 1,5 mL e centrifugados a 15000 rpm por 5 min, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensado em 400 µL de *Cell Suspension Buffer* (50 mM de Tris-HCl, 100 mM de EDTA), posteriormente foi adicionado 20 µL de proteinase K (PK, 20 mg/mL) e manteve-se em repouso por 10 min à temperatura ambiente. Na sequência, adicionou-se 400 µL agarose com baixo ponto de fusão (Bio-Rad) a 1% a uma temperatura de 55 °C e a mistura foi transferida para o molde de *plugs*, confeccionando-se quatro *plugs* por isolado. Após a solidificação dos *plugs* (5 min a 4 °C), estes foram incubados com 5 mL de *Cell Lysis Buffer* (50 mM Tris-HCl, 50 mM de EDTA; 1% sarcosil) e 25 µL de PK em um tubo de centrifugação de 15 mL por 1,5 h a 55 °C em banho-maria. Após descarte do tampão, os *plugs* foram lavados três vezes com 10 mL de água ultrapura estéril a 55 °C por 10 min. Em seguida, a água foi descartada, e foram realizadas quatro lavagens com 10 mL de TE Buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) a 55 °C por 10 min. Ao fim, adicionou-se 5 mL do TE Buffer em cada tubo para armazenamento dos *plugs* a 4 °C. Para a digestão enzimática, cerca de 1/3 do *plug* foi

seccionado e transferido para microtubo de 1,5 mL contendo 20 μ L de MultiCore® 10 \times (Promega), 1 μ L de BSA (Promega), 5 μ L de *Xba*I (50 U - Promega) e 174 μ L de água nuclease *free* (Sigma-Aldrich). Os microtubos foram incubados a 37 °C por 1,5 h em banho seco. O gel de corrida foi preparado a 1% com agarose de baixo ponto de fusão e a corrida realizada utilizando o aparelho CHEF DR-III (BIO-RAD laboratories, Hercules, CA, USA) com 2 L de TBE 0,5 X mantido a 14 °C. As condições de corrida foram: tempo de troca inicial, 6,7 s; tempo de troca final, 35,4s; tempo de execução 18 h; 6 V/cm; ângulo 120°. Foi utilizado como marcador *Salmonella enterica* serotype Braenderup H9812 (CDC), digeridas com 50 U de *Xba*I (HUNTER et al., 2005) e adicionado em três canaletas por gel realizado. Os géis obtidos foram corados em banho de imersão com brometo de etídeo a 1%, visualizados em transiluminador sob luz ultravioleta e fotografados para análise posterior. A relação entre os padrões de bandas foi calculada usando um coeficiente de similaridade baseado em banda (Dice) e agrupamento Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) (BioNumerics, Applied Maths Sint-Martens-Latem, Bélgica) a configuração de tolerância de posição para 1,5% e otimização de 5 %. Os tipos PFGE foram atribuídos com base em padrões > 80% semelhantes.

2.7. Análise estatística

As médias obtidas nas contagens de colônias por plaqueamento, nas densidades ópticas da determinação da biomassa de biofilme e de crescimento planctônico foram submetidas ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, após, foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis, seguida do teste de comparação múltipla de Dunn. Para avaliar a associação entre número de genes de efluxo e número de resistência a agentes antimicrobianos, formação de biofilmes e número de genes de efluxo, formação de biofilmes e quantidade de classes de resistência aos antimicrobianos utilizou-se o teste de Chi-quadrado (Teste Exato de Fisher). Sempre se adotou 95% de nível de significância ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS

3.1. Detecção molecular de sistema de efluxo multidrogas

Os genes de SEM detectados nos isolados de *E. coli* são apresentada na Figura 3, sendo o gene mais frequentemente encontrado o *acrB*, positivo em todos os isolados. Na sequência, *acrF*, ausente em apenas um isolado e os genes *emrB* e *tehA* ausentes em dois isolados. O gene menos prevalente foi *emrE* encontrado em apenas 10 isolados, sete de origem humana e três de origem animal. O gene *acrA* foi encontrado em 18 isolados, sendo oito de origem animal, três de alimento e sete de origem humana. Considerando-se o número de genes nos isolados, aproximadamente 90% dos isolados carregavam cinco genes ou mais simultaneamente, e nenhum carregou apenas um gene. Dois isolados continham quatro genes e um isolado foi positivo para dois dos genes testados (Figura 3). Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre o número de genes de SEM e número de antimicrobianos para os quais os isolados eram resistentes.

3.2. Detecção fenotípica de sistema de efluxo

3.2.1. Concentração inibitória mínima (MIC)

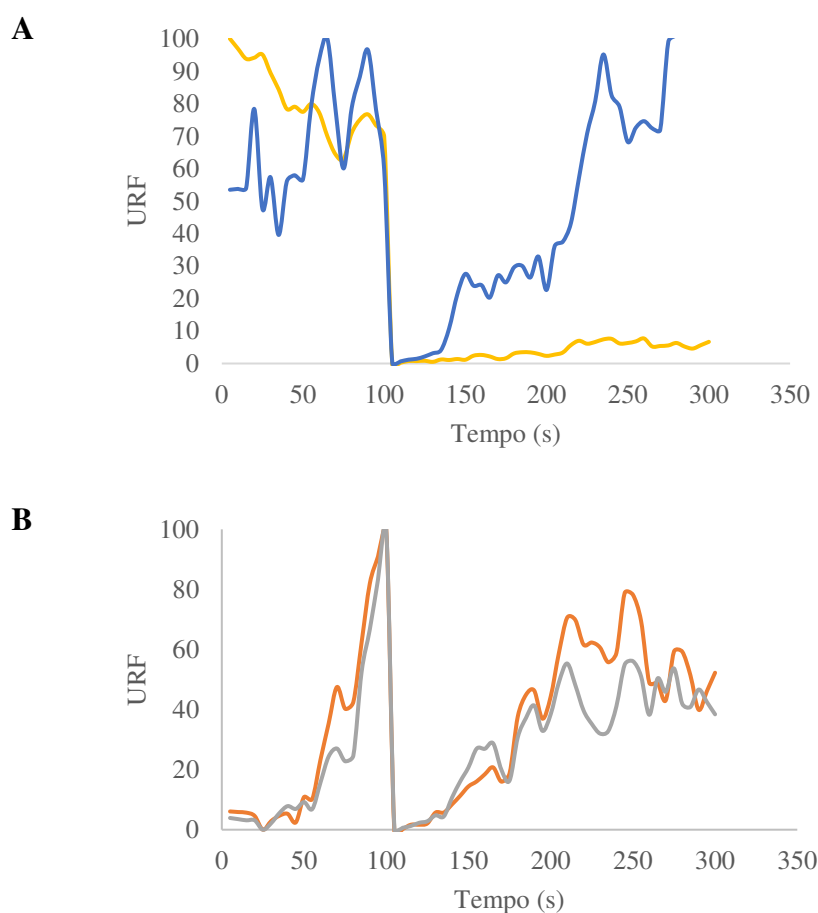
Para realização da MIC da ampicilina e da ciprofloxacina foram selecionados os isolados resistentes a essas drogas e que possuíam os genes *acrA*, *acrB*, *acrE* ou *acrF*, pois estes genes estão relacionados aos sistemas de efluxo AcrAB-TolC e AcrEF-TolC que têm a propriedade de expelir antimicrobianos das classes dos β -lactâmicos e quinolonas (VAN BAMBEKE; PAGÈS; LEE, 2006).

Foram testados 27 isolados com ampicilina e cinco (18,51%) tiveram redução da MIC na presença de PA β N. Com ciprofloxacina, 11 isolados foram testados, e houve redução na MIC de dois desses (18,18%). Houve em média uma redução em quatro vezes o valor da MIC. Dentre os isolados que tiveram redução na MIC, apenas um mudou sua categoria de “resistente” a “intermediário” (CLSI, 2018).

3.2.2. Quantificação de efluxo

Foi quantificado o efluxo de todos os 28 isolados. Do total, 22 (78,57%) mostraram atividade de SEM, representado pelo rápido transporte de Nile Red para fora das células após a adição de glicose. A **Figura 2** mostra curvas representativas de efluxo de Nile Red.

Figura 2 – Curvas representativas de efluxo de Nile Red. Depois do pré-carregamento com Nile Red ($5 \mu\text{M}$) as células foram energizadas aos 100 s com glicose (50 mM). Em A, observa-se na linha amarela rápida diminuição de fluorescência após adição de glicose ao meio, evidenciando atividade de Sistema de Efluxo Multidroga (SEM). Na linha azul, a fluorescência captada após adição de glicose continua elevada, deduzindo-se ausência de atividade de SEM. Em B, a linha cinza representa o efluxo de Ampicilina – AMP, que não foi capaz de impedir o efluxo de Nile Red, apresentando comportamento semelhante ao controle (tampão fosfato de potássio acrescido de MgCl_2 1mM – PPB), representado pela linha laranja. Os níveis de fluorescência pré-energização foram ajustados para 100 unidades relativas de fluorescência (URF). As linhas representam as médias.



A ampicilina não foi capaz de impedir o efluxo de Nile Red, tendo resultado semelhante ao controle PPB (Figura 2) em todos os isolados. Os resultados de ampicilina e PPB se assemelham às curvas de PA β N dos isolados sem atividade de efluxo.

3.3. Biofilme na presença e ausência de PA β N

Todos os isolados formaram biofilmes, 17 foram classificados como forte produtores e 11 como produtores moderados. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na formação de biofilme em relação à quantidade simultânea de genes de efluxo no isolado e em relação ao número de classes para as quais o isolado apresentou resistência.

Também se comparou a formação de biofilmes na presença de PA β N, na presença de ampicilina, e na presença de PA β N + ampicilina em relação ao controle (caldo LB). Não foi possível fazer a comparação entre os isolados e origem alimentar devido ao pequeno número de isolados representantes dessa categoria. Os resultados obtidos para humanos e animais são apresentados nas tabelas 3 e 4, respectivamente.

Tabela 4 - Médias obtidas nos diferentes ensaios para caracterização da formação de biofilmes por *Escherichia coli* multirresistente isoladas de humanos. Foram comparados os tratamentos caldo Luria-Bertani (LB), fenil-arginil- β -naftilamida (PA β N) a 20 μ g/mL, ampicilina (AMP) a 32 μ g/mL (dose subinibitória) e PA β N + AMP (20 + 32 μ g/mL). Os resultados representam médias de absorbância (densidade ótica a 550 nm).

Tratamentos	LB	PA β N	AMP	PA β N + AMP
Biomassa de biofilme 24h	28,87a	25,93a	33,87a	33,33a
Biomassa de biofilme 48h	24,30b	25,40b	19,30b	53,00a
Crescimento planctônico 24h	41,33a	31,80a	26,80a	22,07b

UFC: Unidades formadoras de colônia. Médias seguidas de mesma letra na horizontal não diferem entre si pelo teste de Dunn ($p \leq 0,05$). n=15.

Com 24 horas não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na formação de biofilme entre os tratamentos, porém houve menor multiplicação bacteriana na presença de PA β N + AMP em relação ao LB (controle). Com 48 horas, observou-se maior formação de biofilme no tratamento PA β N + AMP pelos isolados de origem humana (Tabela 3).

Tabela 5 - Médias obtidas nos diferentes ensaios para caracterização da formação de biofilmes por *Escherichia coli* multirresistente isoladas de animais. Foram comparados os tratamentos caldo Luria-Bertani (LB), fenil-arginil- β -naftilamida (PA β N) a 20 μ g/mL, ampicilina (AMP) a 32 μ g/mL (dose subinibitória) e PA β N + AMP (20 + 32 μ g/mL). Os resultados representam médias de absorbância (densidade ótica a 550 nm).

Tratamentos	LB	PA β N	AMP	PA β N + AMP
Biomassa de biofilme 24h	19,90a	15,20a	15,60a	31,30a
Biomassa de biofilme 48h	12,00b	16,30b	18,60b	35,10a
Crescimento planctônico 24h	31,90a	23,00a	14,20b	12,90b

UFC: Unidades formadoras de colônia. Médias seguidas de mesma letra na horizontal não diferem entre si pelo teste de Dunn ($p \leq 0,05$). n=15.

Analisando-se os isolados de origem animal, com 24 horas não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na formação de biofilme entre os tratamentos, porém houve menor multiplicação bacteriana na presença de AMP e de PA β N + AMP, comparado ao controle (LB).

Com 48 horas, observou-se maior formação de biofilme no tratamento PA β N + AMP bem como ocorreu com os isolados de origem humana (Tabela 4).

3.4. Tipagem molecular

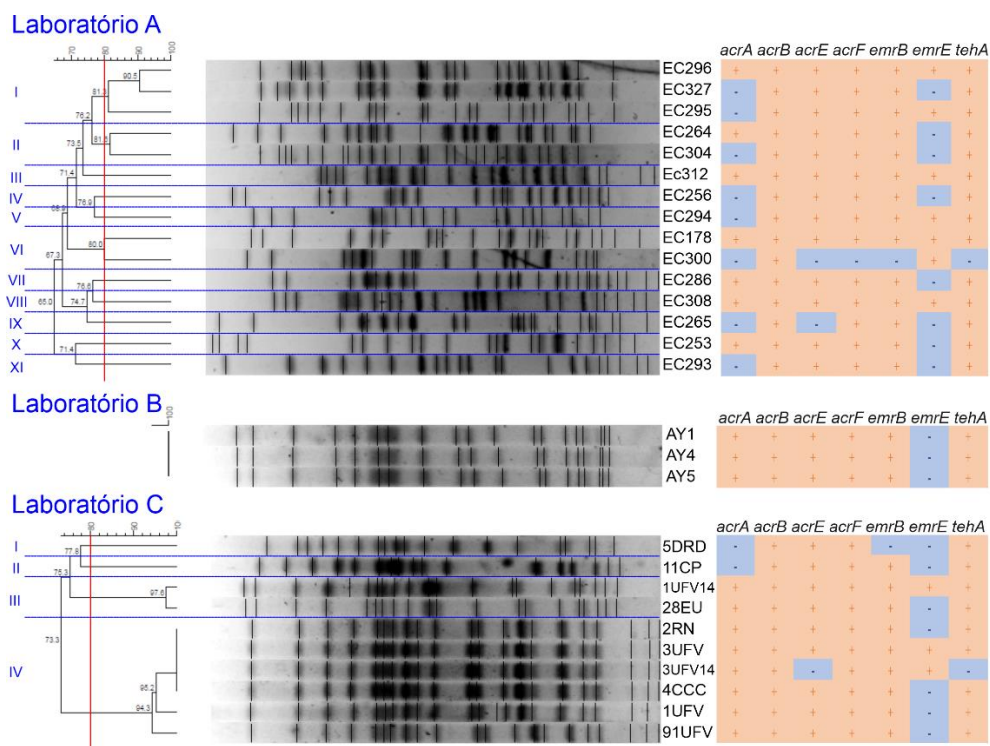
Três dendrogramas foram criados usando o programa BioNumerics versão 6.6. para comparar os isolados divididos por origem (Figura 3).

Os isolados obtidos de humanos (Laboratório A), apresentaram a maior diversidade, formando 11 clusters (I a XI), sendo a maioria deles, formado por um único isolado.

Os três isolados obtidos de alimentos (Laboratório B) formaram um único pulsotipo, sendo considerados um único clone. Além do mesmo pulsotipo, também apresentaram o mesmo perfil de resistência e os mesmos genes de SEM, o que corrobora a identificação de um único clone.

Dos isolados de origem animal (Laboratório C), obtiveram-se quatro clusters, sendo o cluster IV o maior, formado por seis isolados.

Figura 3 - Dendrogramas dos isolados de *Escherichia coli* baseados nos padrões de PFGE pós-digestão com *Xba*I. O agrupamento foi baseado em coeficiente de similaridade de Dice com Tolerância de 1,5% e otimização de 5,0% e UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) usando o software BioNumerics 6.6. A linha vermelha representa o coeficiente de similaridade de 80%. Os clusters formados foram designados por algarismos romanos. Os isolados oriundos do Laboratório A foram recuperados de humanos, enquanto os do Laboratório B vieram de alimentos e os do Laboratório C foram obtidos de animais.



4. DISCUSSÃO

A tolerância intrínseca a uma ampla gama de agentes antimicrobianos é frequentemente causada por sistemas de efluxo ativos (NIKAIDO, 1996). Para esse estudo foram selecionados isolados multirresistentes (MDR) selecionados de bacteriotecas mantidas por laboratórios parceiros com o perfil de resistência já definido numa tentativa de elucidar o papel de SEM na formação de biofilmes por esses micro-organismos.

Em relação à presença de genes que codificam para SEM, *acrB* foi encontrado em 100% dos isolados e *acrA* em 64,4%, sabendo-se que AcrAB-TolC, é constitutivamente expresso em *E. coli* (CHOWDHURY et al., 2019), esperava-se alto número de positivos para esses genes, resultado que encontra consonância em outros (GAWAD et al., 2018; WENG; MI, 2010).

De maneira geral, a prevalência de todos os genes de SEM analisados foi elevada nos isolados selecionados, e todos os isolados carregavam mais de um gene que codifica para SEM (Figura 3), reforçando a hipótese que a presença de SEM gera um perfil MDR.

Quando explorado o aspecto fenotípico da presença de SEM, a comparação das MICs na presença e ausência de PA β N não revelou grandes modificações. Tanto para o beta-lactâmico ampicilina, quanto para a fluorquinolona ciprofloxacina, a diminuição da MIC ocorreu em menos de 20% dos isolados testados. Bohnert e colaboradores (2010) alegaram também não conseguirem sucesso em demonstrar competição entre antimicrobianos e EPIs por meio da determinação da MIC, da mesma forma que ocorreu no presente trabalho. Essa dificuldade pode ser decorrente do fato da metodologia de MIC não ser refinada o bastante para detectar modificações sutis no perfil de resistência dos isolados.

Além disso, a regulação dos genes de sistema de efluxo é complexa e ocorre de maneira local, global, pós-transcricional e pós-traducional e Mar é um ativador da transcrição de *acrAB* que também controla outros genes envolvidos em resistência (WESTON et al., 2018). Dessa maneira, na presença de PA β N, pode ter ocorrido ativação de outros mecanismos de resistência relacionados à ampicilina e ciprofloxacina, como a presença de beta-lactamases e modificação de alvo, respectivamente.

Cunrath e colaboradores (2019) afirmam que se outros mecanismos de resistência estão presentes, a inibição de SEM sozinha frequentemente não é capaz de restaurar completamente a sensibilidade aos antimicrobianos. Assim, o uso do EPI sozinho em isolados MDR pode não ser capaz de reverter a resistência e outras estratégias devem ser pensadas para reestabelecimento da sensibilidade. No caso da ampicilina, talvez uma associação com um

inibidor de β -lactamase, enzima que confere resistência aos β -lactâmicos, através da quebra do anel β -lactâmico (SCHWARZ; LOEFFLER; KADLEC, 2017) possa colaborar com a restauração da sensibilidade, visto que todos os isolados de origem humana (LAB A) são também resistentes à associação β -lactâmico com inibidor de β -lactamase, além de resistentes a cefalosporinas de 3^a e 4^a gerações (Figura 1).

Além disso, a resistência foi determinada por meio de MIC, o que não reflete a expressão do efluxo das drogas nas diferentes fases de crescimento bacteriano (KOBAYASHI et al., 2006). Se medidas em menores tempos fossem tomadas, como, por exemplo, de hora em hora, poderia ter sido evidenciada alguma competição entre PA β N e os antimicrobianos ampicilina e ciprofloxacina. Ainda, outras combinações EPI-droga poderiam resultar na restauração da sensibilidade (CUNRATH et al., 2019), visto que os isolados são MDR, diversos antimicrobianos poderiam ter sido testados, bem como diversos EPIs já que possuem também outros SEM e o PA β N é capaz de interagir apenas com AcrAB e AcrEF (MISRA et al., 2015). Ainda, inibir AcrB não significa necessariamente inibir completamente o efluxo (CUNRATH et al., 2019), assim uma outra estratégia que poderia ser empregada seria a combinação de EPIs, de modo a ter uma inibição do efluxo mais efetiva, refletindo no aumento de sensibilidade aos antimicrobianos testados.

Whittle e colaboradores (2019) trabalhando com bactérias Gram negativas, concluíram que o efluxo de Nile Red é um ensaio para mostrar a presença de SEM. No presente estudo, aproximadamente 70% dos isolados exibiram atividade de SEM por meio do efluxo de Nile Red utilizando o inibidor PA β N. A diferença encontrada entre os testes fenotípicos (efluxo de Nile Red e MIC) reforça a hipótese de que outros mecanismos de resistência aos beta-lactâmicos e fluorquinolonas estão presentes e ativos nos isolados testados, uma vez que a MIC não foi significativamente alterada e a maioria dos isolados demonstrou atividade de efluxo.

Da mesma maneira que descrito por Bohnert, Karamian e Nikaido(2010), ampicilina não foi capaz de impedir o efluxo de Nile Red, apesar de ser um substrato conhecido de AcrAb-TolC e de AcrEF-TolC (BAMBEKE; PAGÈS; LEE, 2010).

É conhecido que SEM contribuem com a formação de biofilme em *E. coli* (GAWAD et al., 2018; MATSUMURA et al., 2011; REZA; MARK SUTTON; RAHMAN, 2019). No presente estudo o uso de PA β N associado a ampicilina em dose subinibitória e ampicilina sozinha reduziram o crescimento planctônico dos isolados em relação ao controle ($p < 0,05$) e houve aumento na produção de biofilme na presença de PA β N+AMP em relação ao controle ($p < 0,05$), assim, entende-se que a associação de PA β N com ampicilina estimula a formação de

biofilme, porque uma menor concentração de bactérias é capaz de formar mais biofilmes em sua presença em relação ao controle (meio LB).

Estudando cepas de *E. coli* com deleções de genes de SEM, Bay e colaboradores (2017) encontraram diminuição do crescimento planctônico, redução da formação de biofilme e aumento da susceptibilidade a antimicrobianos. Aqui, foi avaliada a estratégia de se usar um inibidor de sistema de efluxo (PA β N) com o intuito de se reduzir a formação de biofilme pelos isolados, porém não foi alcançado esse efeito. No presente estudo, utilizou-se PA β N a 20 μ g/mL, concentração preconizada por Kvist, Hancock e Klemm (2008), que alcançaram redução de 50% na formação de biofilmes. Esperava-se alcançar uma redução ainda maior em relação ao reportado por estes pesquisadores quando na combinação com ampicilina, porém os resultados foram contrários. Uma vez que a inibição de AcrAB-TolC por PA β N é dose-dependente (BOHNERT; KARAMIAN; NIKAIDO, 2010), utilizar uma concentração maior desse inibidor poderia resultar na redução da formação de biofilme. São necessários mais testes para avaliar o impacto da variação da concentração de PA β N na presença de ampicilina na formação de biofilme.

Há também que se pensar nos complexos mecanismos regulatórios de vários estágios da formação de biofilmes em *E. coli*. Uma vez que condições adversas são percebidas pelas bactérias, sistemas de sinalização de dois componentes cumprem sua transdução para o genoma, transferindo as populações microbianas para o modo de existência estruturado através da construção de biofilmes (MARKOVA et al., 2018). Assim, a presença de PA β N junto com ampicilina pode ter levado a ativação de alguma das vias de sinalização que culminou na mudança para o modo de vida sésil.

Quanto a tipagem molecular por PFGE, houve alta diversidade clonal entre os isolados de origem humana mesmo adotando-se um *cutoff* abrangente de 80%. Formaram-se entre esses 11 *clusters* entre os quais oito incluíam apenas um isolado, ou seja, houve grande diversidade genética, mesmo com todos os isolados sendo obtidos em um único hospital, em ambiente de tratamento intensivo. Sendo *E. coli* tipicamente associada à infecção em sistema urinário e sepse, ainda é agente causal de meningite em neonatos e está associada a infecções em pele e tecidos moles (WHO, 2014); infere-se, assim, que essas bactérias foram oriundas dos portadores das diferentes infecções, que provavelmente vinham de distintas regiões e não se caracterizam como uma contaminação hospitalar.

Dentre os isolados animais, formaram-se quatro *clusters*, e apenas dois foram formados por um único isolado. Diferente do que foi demonstrado para os isolados de origem humana, os

isolados de origem animal foram mais homogêneos, com um *cluster* formado por seis isolados com similaridade superior a 94%. Sendo *E. coli* considerado um patógeno ambiental para mastite (RADOSTITS et al., 2002), se deduz que clones similares estão presentes nas diferentes fazendas de onde os isolados foram obtidos.

Apesar de ter sido demonstrada a atividade de efluxo nos isolados aqui estudados, as tentativas de inibi-la não resultaram em diminuição da resistência à ampicilina e à ciprofloxacina, bem como não diminuíram a formação de biofilme. Uma vez que as bactérias possuem um amplo repertório de estratégias para superar os antimicrobianos (BYRD et al., 2021), acredita-se que outros mecanismos de resistência possam estar atuando simultaneamente nos isolados do presente estudo. Assim, mais estudos serão necessários para definir o papel de SEM na formação de biofilmes em isolados de *E. coli* multirresistentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALAV, I.; SUTTON, J. M.; RAHMAN, K. M. Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, p. 2003–2020, 2018.
- BAMBEKE, F. VAN; PAGÈS, J.; LEE, V. J. Inhibitors of Bacterial Efflux Pumps as Adjuvants in Antibacterial Therapy and Diagnostic Tools for Detection of Resistance by Efflux. **Frontiers in Anti-Infective Drug Discovery**, v. I, p. 138–175, 2010.
- BANIN, E.; HUGHES, D.; KUIPERS, O. P. Editorial: Bacterial pathogens, antibiotics and antibiotic resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, n. 3, p. 450–452, 2017.
- BAY, D. C. et al. Secondary multidrug efflux pump mutants alter *Escherichia coli* biofilm growth in the presence of cationic antimicrobial compounds. **Research in Microbiology**, v. 168, n. 3, p. 208–221, 2017.
- BOHNERT, J. A.; KARAMIAN, B.; NIKAIDO, H. Optimized Nile red efflux assay of AcrAB-TolC multidrug efflux system shows competition between substrates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 9, p. 3770–3775, 2010.
- BYRD, B. A. et al. The AcrAB-TolC Efflux Pump Impacts Persistence and Resistance Development in Stationary-Phase *Escherichia coli* following Delafloxacin Treatment. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 65, n. 8, p. e00281-21, 2021.
- CHEN, J.; GRIFFITHS, M. W. PCR differentiation of *Escherichia coli* from other Gram-negative bacteria using primers derived from the nucleotide sequences flanking the gene encoding the universal stress protein. **Letters in Applied Microbiology**, v. 27, p. 369–371, 1998.
- CHOWDHURY, N. et al. Identification of *AcrAB-TolC* Efflux Pump Genes and Detection of Mutation in Efflux Repressor *AcrR* from Omeprazole Responsive Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Isolates Causing Urinary Tract Infections. **Microbiology Insights**, v. 12, p. 1–10, 2019.
- CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 28th. CLSI ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratorial Standards Institute, 2018.
- CUNRATH, O. et al. Quantitative contribution of efflux to multi-drug resistance of clinical *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* strains. **EBioMedicine**, v. 41, p. 479–487, 2019.
- GAWAD, W. E. et al. Antimicrobial Resistance, Biofilm Formation, and Phylogenetic Grouping of Uropathogenic *Escherichia coli* Isolates in Egypt: The Role of Efflux Pump-Mediated Resistance. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 11, n. 2, p. 1–7, 2018.
- HALL, C. W.; MAH, T.-F. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, n. 3, p. 276–301, 2017.
- HENDERSON, P. J. F. et al. Physiological Functions of Bacterial “multidrug” Efflux Pumps. **Chemical Reviews**, v. 121, n. 9, p. 5417–5478, 2021.

HUNTER, S. B. et al. Establishment of a universal size standard strain for use with the PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocols: converting the national databases to the new size standard. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n. 3, p. 1045–1050, 2005.

KOBAYASHI, A. et al. Growth Phase-Dependent Expression of Drug Exporters in *Escherichia coli* and Its Contribution to Drug Tolerance. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 16, p. 5693–5703, 2006.

KVIST, M.; HANCOCK, V.; KLEMM, P. Inactivation of Efflux Pumps Abolishes Bacterial Biofilm Formation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 23, p. 7376–7382, 2008.

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

MARKOVA, J. A. et al. Regulation of *Escherichia coli* Biofilm Formation (Review). **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 1–11, 2018.

MATSUMURA, K. et al. Roles of multidrug efflux pumps on the biofilm formation of *Escherichia coli* K-12. **Biocontrol Science**, v. 16, n. 2, p. 69–72, 2011.

MISRA, R. et al. Importance of Real-Time Assays to Distinguish Multidrug Efflux Pump-Inhibiting and Outer Membrane-Destabilizing Activities in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 197, n. 15, p. 2479–2488, 2015.

NIKAIDO, H. Multidrug Efflux Pumps of Gram-Negative Bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 20, p. 5853–5859, 1996.

NISHINO, K. et al. Function and Inhibitory Mechanisms of Multidrug Efflux Pumps. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 2021.

OSPINA BARRERO, M. A. et al. Effect of the inhibitors phenylalanine arginyl β -naphthylamide (PA β N) and 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine (NMP) on expression of genes in multidrug efflux systems of *Escherichia coli* isolates from bovine mastitis. **Research in Veterinary Science**, v. 97, n. 2, p. 176–181, 2014.

RADOSTITS, O. M. et al. **Clínica veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos**. [s.l.] Guanabara Koogan, 2002.

REZA, A.; MARK SUTTON, J.; RAHMAN, K. M. Effectiveness of efflux pump inhibitors as biofilm disruptors and resistance breakers in gram-negative (ESKAPEE) bacteria. **Antibiotics**, v. 8, n. 4, 2019.

RIBOT, E. M. et al. Standardization of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocols for the Subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 3, n. 1, p. 59–67, 2006.

SCHWARZ, S.; LOEFFLER, A.; KADLEC, K. Bacterial resistance to antimicrobial agents and its impact on veterinary and human medicine. **Veterinary Dermatology**, v. 28, n. 1, p. 82–e19, 2017.

STEPANOVIC, S. et al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 40, n. 2, p. 175–179, 2000.

VAN BAMBEKE, F.; PAGÈS, J.-M.; LEE, V. J. Inhibitors of bacterial efflux pumps as adjuvants in antibiotic treatments and diagnostic tools for detection of resistance by efflux. **Recent patents on anti-infective drug discovery**, v. 1, n. 2, p. 157–175, 2006.

VIVEIROS, M. et al. Antibiotic stress, genetic response and altered permeability of *E. coli*. **PLoS ONE**, v. 2, n. 4, 2007.

WANG, S. et al. Sub-MIC tylosin inhibits *Streptococcus suis* biofilm formation and results in differential protein expression. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1–9, 2016.

WENG, X.; MI, Z. Seven Drug Efflux Genes in Multi-drug Resistant Strains of *Escherichia coli* Isolated from Urine. **Chinese Journal of Nosocomiology**, v. 20, n. 6, p. 759–762, 2010.

WESTON, N. et al. Regulation of the AcrAB-TolC efflux pump in Enterobacteriaceae. **Research in Microbiology**, v. 169, n. 7–8, p. 425–431, 2018.

WHITTLE, E. E. et al. Flow Cytometric Analysis of Efflux by Dye Accumulation. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019.

WHO – World Health Organization. **Antimicrobial resistance: Global Report on Surveillance**. World Health Organization, França, 2014.

WILLERS, C. et al. Efflux as a mechanism of antimicrobial drug resistance in clinical relevant microorganisms: the role of efflux inhibitors. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 21, n. 1, p. 23–36, 2016.

Capítulo 2 – Resistência mediada por Sistema de Efluxo Multidrogas em *Staphylococcus aureus* multirresistentes

1. INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus desenvolve resistência a antimicrobianos por diferentes mecanismos. Esses mecanismos incluem limitação da absorção, modificação do alvo, inativação enzimática e efluxo ativo da droga (YILMAZ; ÖZCENGİZ, 2017).

Sistemas de efluxo multidrogas (SEM) evitam o acúmulo de drogas dentro da bactéria por meio de sistemas de transporte ativo que transportam substâncias tóxicas, como antimicrobianos, para o meio extracelular (LI; NIKAIDO, 2009). Segundo Shamkhi e colaboradores (2019), SEM têm papel vital na multirresistência aos antimicrobianos (MDR) em *S. aureus*, sendo MDR definida como não-suscetibilidade a pelo menos um agente em três ou mais classes antimicrobianas (MAGIORAKOS et al., 2012).

Evidências sugerem que SEM também desempenham um papel na formação de biofilme (ALAV; SUTTON; RAHMAN, 2018), que é definido como uma comunidade séssil, caracterizada por células que estão irreversivelmente ligadas a um substrato ou interface ou entre si, incorporadas em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares autoproduzidas e exibem um fenótipo alterado em relação à taxa de crescimento e transcrição de genes (SOTO, 2013). O crescimento na forma de biofilme desempenha um papel importante durante a infecção, fornecendo defesa contra vários mecanismos de eliminação, protegendo as bactérias (LISTER; HORSWILL, 2014).

Assim, os objetivos do estudo foram detectar a atividade de Sistemas de Efluxo Multidrogas em *S. aureus* multirresistentes obtidos de diferentes bacteriotecas, averiguar sua influência na multirresistência e verificar sua interferência na produção de biofilmes por esses isolados.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Seleção dos isolados bacterianos e condições de multiplicação

Foram selecionados isolados de *Staphylococcus aureus* multirresistentes pertencentes a diferentes bacteriotecas de laboratórios de pesquisa parceiros (Tabela 1). As informações sobre resistência aos antimicrobianos dos isolados de origem humana e de alimento estão resumidas na Figura 1. O isolado de origem animal (St 754), foi resistente à oxacilina, ciprofloxacina, eritromicina e tetraciclina. Todos os isolados selecionados para o estudo são resistentes à meticilina (MRSA).

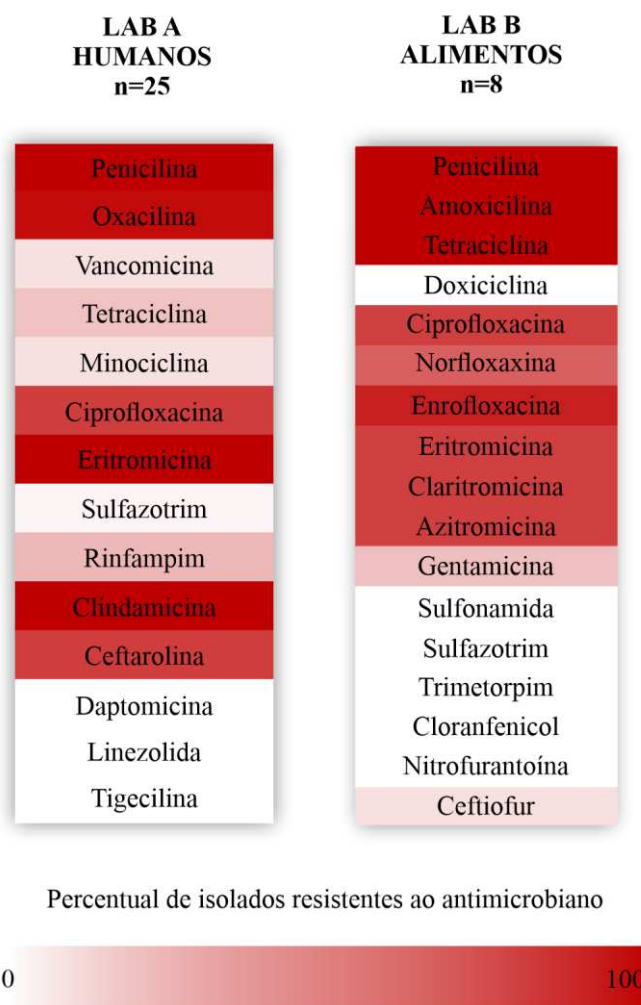
Tabela 1 – Isolados de *Staphylococcus aureus* multirresistentes selecionados para o estudo.

Identificação	Laboratório	Fonte de isolamento	Origem
St 05	A	Secreção de ferida	Humano
St 08	A	Tecido ósseo	Humano
St 09	A	Tecido ósseo	Humano
St 10	A	Parafuso ortopédico	Humano
St 14	A	Fragmento ósseo	Humano
St 18	A	Hemocultura	Humano
St 30	A	Cultura de vigilância -Swab Nasal	Humano
St 33	A	Secreção subdural	Humano
St 37	A	Síntese	Humano
St 38	A	Partes moles	Humano
St 39	A	Cultura de vigilância - swab nasal	Humano
St 67	A	Hemocultura	Humano
St 74	A	Secreção traqueal	Humano
St 77	A	Hemocultura	Humano
St 78	A	Hemocultura	Humano
St 80	A	Cultura de vigilância - swab nasal	Humano
St 82	A	Secreção traqueal	Humano
St 92	A	Cultura de vigilância - swab retal	Humano
St 104	A	Cultura de vigilância - swab nasal	Humano
St 112	A	Secreção traqueal	Humano
St 261	A	Osso crânio	Humano
St 262	A	Secreção	Humano
St 282	A	Fragmento de ferida de mie	Humano
St 319	A	Tecido fistuloso	Humano
St 331	A	Secreção traqueal	Humano
St 574	A	Swab nasal	Animal
RP 01	B	Queijo coalho de cabra	Alimento
RP 03	B	Queijo coalho de cabra	Alimento
RP 05	B	Queijo coalho de cabra	Alimento
RP 06	B	Queijo coalho de cabra	Alimento
RP 07	B	Queijo coalho de cabra	Alimento
RP 09	B	Queijo coalho de cabra	Alimento
RP 27	B	Queijo coalho de cabra	Alimento
RP 28	B	Queijo coalho de cabra	Alimento

Todos os isolados foram reativados em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI, Himedia) para, em seguida, serem congelados, utilizando glicerol a 20% como crioprotetor. Todos os isolados foram mantidos à -80 °C e foram reativados em caldo por incubação *overnight* a 37 °C para a realização dos ensaios.

A confirmação da espécie foi realizada por meio de PCR para o gene *nuc*, utilizando os primers *nuc* – 1 5'-GCGATTGATGGTGATACGGTT-3' e *nuc* – 2 5'-AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC-3' (YANG et al., 2007).

Figura 1 - Mapa de calor de resistência aos antimicrobianos para isolados de *Staphylococcus aureus* multirresistentes. Os isolados foram divididos por laboratório (LAB) de origem.



Fonte: elaborado pela autora.

2.2. Reagentes químicos

O desacoplador de prótons carbonil cianida m-clorofenilhidrazona (CCCP); o corante brometo de etídeo (EtBr) e os antimicrobianos ciprofloxacina (CIP) e tetraciclina (TET) foram adquiridos da Sigma-Aldrich Brasil.

2.3. Detecção molecular dos sistemas de efluxo multidrogas

Foi utilizada a técnica de PCR para detectar os genes dos sistemas de efluxo multidrogas. A extração do DNA genômico foi realizada por meio do Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) seguindo as orientações do fabricante. As reações de amplificação foram conduzidas para cada isolado em 25 µL de mistura de reação contendo 12,5 µL de GoTaq® Green Master Mix (Promega), 20 pmol de cada primer, 2 µL de material genético e 6,5 µL de água nucleasse *free*. A mistura de reação foi submetida a termociclagem. Ao final, o produto da reação foi separado em corrida eletroforética a 75V em gel de agarose a 1% corado com UniSafe Dye® (Uniscience). Os géis foram visualizados sob luz UV e fotodocumentados utilizando-se o L-Pix EX. O tamanho dos *amplicons* foi estimado por comparação a um padrão de peso molecular de 50 pb.

Os genes pesquisados, *primers* utilizados, tamanho dos produtos e programas estão especificados na Tabela 2. O controle utilizado nas reações de *norA*, *norC*, *lmrS* e *tet38* foi o isolado *S. aureus* 4^c (LIMA et al., 2020). Para os genes *norB* e *msrA* utilizou-se como controle, o tamanho do amplicon formado.

Tabela 2 - Primers para detecção de genes de sistema de efluxo multidrogas de *Staphylococcus aureus* através da técnica de PCR.

Gene	Família	Primer	Sequência (5'-3')	Produto (pb)	Referência
<i>tet38</i>	MFS	<i>tet38 - 1</i>	TTCAGTTTGGTTATAGACAA	400	(TRUONG-BOLDUC et al., 2005)
		<i>tet38 - 2</i>	CGTAGAAATAAATCCACCTG		
<i>norA</i>	MFS	<i>norA1</i>	TGCAATTTTCATATGATCAATCCC	150	(TRUONG-BOLDUC; ZHANG; HOOPER, 2003)
		<i>norA2</i>	AGATTGCAATTCATGCTAAATATT		
<i>norB</i>	MFS	<i>norB1</i>	GAAGATAGTTTCAATACAGA	400	(TRUONG-BOLDUC et al., 2005)
		<i>norB2</i>	ATTATAAATGATAGGATGAA		
<i>norC</i>	MFS	<i>norC - f</i>	AAATGGTTCTAAGCGACCAA	200	(TRUONG-BOLDUC et al., 2006)
		<i>norC - r</i>	ATAAATACCTGAAGCAACGCCAAC		
<i>lmrS</i>	MFS	<i>LmrS - f</i>	GCAAGCTTATGGCTAAAGTTGAATTA ACAAC	1400	(FLOYD et al., 2010)
		<i>LmrS - r</i>	GCGGATCCTTAAAATTTTCCTTCTATT ACTTT		
<i>msrA</i>	ABC	<i>msrA - f</i>	TCCAATCATTGCACAAAATC	163	(MARTINEAU et al., 2000)
		<i>msrA - r</i>	AATCCCTCTATTTGGTGGT		

ABC: ATP-Binding Cassette; MFS: Major Facilitator Superfamily

2.4. Detecção fenotípica dos sistemas de efluxo multidrogas

Os isolados confirmados como *S. aureus* e que apresentaram genes relacionados aos Sistemas de Efluxo foram caracterizados fenotipicamente através da avaliação da concentração inibitória mínima na ausência e presença de CCCP e através da quantificação do efluxo de brometo de etídeo para verificar a atividade de SEM pelos isolados.

2.4.1. Concentração Inibitória Mínima (MIC)

Foram determinadas as Concentrações Inibitórias Mínimas (MICs) de ciprofloxacina e tetraciclina na presença e ausência do inibidor de sistema de efluxo CCCP. Esses antimicrobianos foram escolhidos pelo grande número de isolados resistentes a eles e que possuíam genes de SEM relacionados a seu efluxo (Figuras 1 e 3). As MICs foram determinadas em placa de microtitulação de 96 poços por microdiluição em caldo conforme diretrizes do CLSI (2018) utilizando um inóculo final de 5×10^5 UFC/mL após reativação *overnight* a 37 °C dos isolados. O teste de MIC foi feito em duplicata e repetido três vezes, sendo considerada a MIC a menor concentração capaz de inibir a multiplicação bacteriana, comparando-se os resultados aos controles.

2.4.2. Quantificação de efluxo

Foi utilizado o corante EtBr conforme protocolo descrito por Kaatz e col. (2000) com algumas modificações. Para o ensaio, as cepas de *S. aureus* foram cultivadas *overnight* em caldo BHI. O cultivo foi diluído a uma DO_{660} de 0,7 a 0,8, e permaneceu em repouso a temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida a DO_{660} foi ajustada a 0,4 com caldo BHI contendo CCCP (100 μ M) e EtBr (10 μ g/mL). As culturas permaneceram em repouso por uma hora à temperatura ambiente para possibilitar o carregamento das bactérias com EtBr. Depois da incubação, 400 μ L da cultura foram sedimentadas (4000 rpm/5 min), o sobrenadante descartado, e então ressuspensas em 400 μ L de tampão fosfato-salino (PBS) pH 7,2. Na sequência, 50 μ L da cultura foi distribuída em microtubos de 500 μ L que previamente haviam recebido 50 μ L de PBS, ou 50 μ L de BHI com CCCP ou 50 μ L de glicose (1M), uma duplicata por tratamento. A fluorescência da suspensão foi acompanhada através da aquisição por 60 ciclos de 10 segundos em um termociclador Rotor-Gene Q (Qiagen), utilizando-se os comprimentos de onda de excitação e emissão de 530 e 610 nm, respectivamente.

2.5. Biofilme na presença e ausência de CCCP

Foram avaliadas a formação de biofilmes pelos isolados de *S. aureus* na presença e ausência de CCCP, para verificar a influência dos SEM em sua formação. Os biofilmes foram avaliados quanto à quantidade de biomassa formada e à viabilidade. Também se analisou o crescimento planctônicos dos isolados submetidos aos mesmos tratamentos.

Para representar o crescimento planctônico, os isolados foram cultivados *Tryptic Soy Broth* (TSB) adicionado de glicose (1%) com ou sem CCCP (0,78 $\mu\text{L/mL}$). Colônias isoladas foram cultivadas em a 37 °C *overnight* (18-20 h) para preparar um inóculo padrão de 10^8 UFC/mL. Em seguida, os cultivos foram diluídos 1/20 em 3 mL de TSB, e 100 μL dessa diluição foram distribuídos em placas de microtitulação de 96 poços, onde os poços tiveram o volume completado para 200 μL com TSB estéril (10^7 UFC/mL/poço). Um poço não inoculado serviu como controle de esterilidade. Os isolados foram inoculados em triplicata, e incubados sob agitação (100-150 rpm) a 37 °C. Após 24 horas, foi realizada medida da densidade ótica a 550 nm, em um espectrofotômetro leitor de placas.

Para os testes de viabilidade de células de biofilme e quantificação da biomassa de biofilme as placas foram incubadas a 37 °C sem agitação durante 24h. Os biofilmes crescidos 24 h foram corados pelo método de coloração de Cristal Violeta (CV), descrito por Stepanovic et al. (2000), para quantificar a biomassa. Em resumo, após o período de incubação, os poços foram enxaguados com 200 μL tampão PBS estéril e secos ao ar durante 10 minutos. Os biofilmes foram fixados adicionando 150 μL /poço de metanol 99% por 15 minutos. A coloração foi feita com 150 μL /poço de CV 2% (p/v) por 15 minutos. Os poços foram enxaguados em água corrente até a retirada de todo o corante livre e depois descorados durante 30 minutos com 200 μL de etanol 95%. A OD_{550} foi medida em seguida.

Para verificar a viabilidade dos biofilmes, após o período de incubação, os poços foram lavados duas vezes com 200 μL /poço de solução salina 0,9% (p/v) esterilizada. Os biofilmes sobreviventes foram desalojados por sonicação durante 10 min, com 200 μL /poço de meio de recuperação estéril (TSB com 1% (v/v) de Tween 80). Os biofilmes recuperados foram inoculados (10 μL /inóculo) em placas de ágar BHI e incubados a 37°C por 24 h para determinar a viabilidade das células de biofilme de acordo com a sua UFC/poço.

Os resultados obtidos em TSB foram comparados ao controle negativo (meio não inoculado) para classificar os isolados quanto à produção de biofilmes, utilizando-se os critérios propostos por Stepanovic e col. (2000): $OD \leq OD_c$ = não produtor; $OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$ = fraco produtor; $2 \times OD_c < OD \leq 4 \times OD_c$ = produtor moderado e $4 \times OD_c < OD$ = forte produtor.

Onde OD é a média das densidades óticas obtidas para o isolado avaliado e OD_c a média das densidades óticas do controle negativo.

2.6. Tipagem molecular

As análises de macrorrestrição do DNA foram realizadas seguindo o protocolo descrito por André e col. (2008) com algumas modificações. Para a confecção dos *plugs*, os isolados foram inoculados em caldo BHI e incubados a 37 °C por 16 a 18 horas até a obtenção da densidade ótica 0,8-1 (DO_{590nm}). Após o ajuste da DO, 200 µl da suspensão bacteriana foram transferidos para microtubos de 1,5 mL e centrifugados a 15000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em 150 µl de solução *Cell Suspension Buffer* (10 mM Tris-HCl pH 7,2, 20 mM NaCl, 50 mM EDTA). Em seguida adicionou-se 7 µl de lisostafina (1 mg/ml) e 7 µl de lisozima (10 mg/ml). Após homogeneização, 150 µl de agarose de baixo ponto de fusão a 2% e foi adicionada à solução, e a mistura foi transferida para o molde de *plug*, preenchendo-se dois poços por isolado. O molde foi mantido a 4 °C por 5 minutos para solidificação. Depois os *plugs* foram transferidos para microtubos de 2,0 mL contendo 1,0 mL de *Lysis Buffer* (10 mM Tris-HCl pH 7,2, 50 mM NaCl, 50 mM EDTA, 0,2% deoxycholate, 0,5% sarkosyl) e incubados por 1 h a 37 °C em banho-maria. Após a incubação removeu-se o *Lysis Buffer* e adicionou-se 500 µL de *PK-PK Buffer* (60 U/mL – 250 mM EDTA pH 9,0, 1% sarkosyl). Seguiu-se uma incubação a 50 °C por 30 min. Depois o *PK-PK Buffer* foi descartado e os *plugs* enxaguados com 1,4 mL de *Wash Buffer* (10 mM Tris-HCl pH 7,6, 0,1 mM EDTA). Depois, seguiram-se três lavagens com 1,4 mL de *Wash Buffer* a 50 °C por 30 min. Ao final das lavagens, adicionou-se 1,4 mL de *Wash Buffer* aos microtubos para armazenamento a 4 °C. Para a restrição enzimática, cerca de 1/3 do *plug* original foi seccionado e adicionado em microtubos de 1,5 mL devidamente identificados. Os *plugs* foram submetidos à equilíbrio inicial em 300 µL do tampão da enzima (MultiCore®, Promega) 1X por 10 min à temperatura ambiente. Após descarte do tampão de equilíbrio, 150 µL do tampão 1X adicionado de 25 U da enzima de restrição *SmaI* (Promega Corporation, Madison, EUA), foi transferido para os microtubos. Os *plugs* foram incubados a 25 °C por 4 h em banho seco. O DNA presente nos *plugs*, foi separado utilizando o aparelho CHEF-DRIII (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA), seguindo o protocolo de corrida: 5,3 a 34,9 segundos, por 18 horas, em ângulo de 120°, 6V/cm, em tampão TBE 0,5 X mantido a 14 °C. Foi utilizado como marcador *Salmonella enterica* serotype Braenderup H9812 (CDC), restringidas com 20 UI de *XbaI* (HUNTER et al., 2005) e adicionado em três canaletas por gel realizado. Os géis obtidos foram revelados em

banho de imersão com brometo de etídeo 1% e visualizados em transiluminador sob luz ultravioleta e fotografados para análise posterior (L-PIX EX). As bandas obtidas foram analisadas usando o software BioNumerics v.6.6.4 (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica). Para a análise e interpretação dos resultados foi construído um dendrograma, utilizando-se o coeficiente de similaridade de *Dice* e *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA) com grau de tolerância de 1,5% e otimização de 5%. Para agrupamento dos isolados, adotou-se 80% de similaridade como ponto de corte.

2.7. Estatística

A prevalência dos genes e a quantidade simultânea de genes foi comparada quanto à origem (humano ou alimento) pelo Teste Exato de Fisher. A classificação da produção de biofilmes foi comparada em relação ao número de genes de resistência, número de classes de antimicrobianos resistentes e em relação à origem também pelo Teste Exato de Fisher.

As médias dos dados de crescimento planctônico e biomassa de biofilme foram submetidas ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e depois comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn. Sempre se adotou 95% de significância.

3. RESULTADOS

3.1. Detecção molecular de sistemas de efluxo

Os genes detectados por isolado são apresentados na Figura 3. O gene mais prevalente foi o *norC*, detectado em todos os 34 isolados estudados, seguido de *norA* em 33 e *lmrS* em 32 isolados. O gene menos prevalente foi o *msrA*, encontrado em dois isolados, ambos de origem humana. O gene *norB* foi o único a apresentar diferença na prevalência quanto à origem, tendo sido mais detectado entre os isolados de humanos ($p < 0,05$).

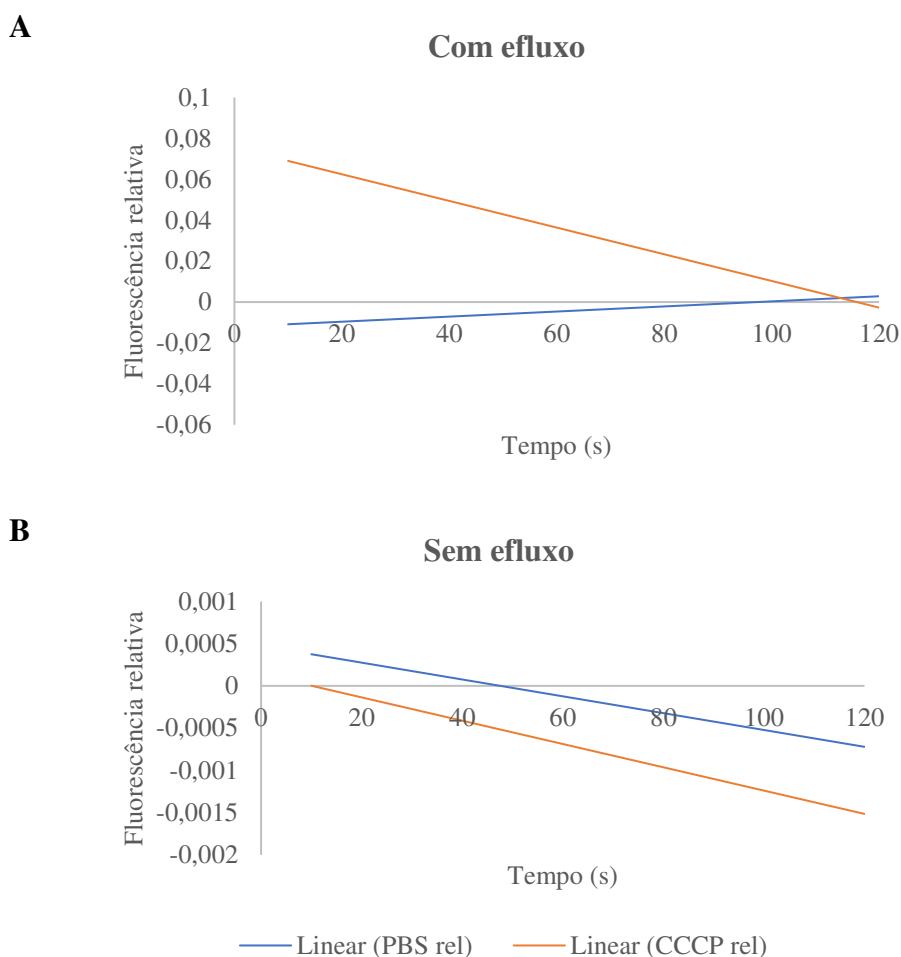
Em relação à quantidade de genes carregados ao mesmo tempo pelos isolados, aproximadamente 41% carregavam cinco genes e 47% carregavam quatro. Um isolado foi positivo para um único gene e também um isolado foi positivo para todos os genes pesquisados. Não houve diferença significativa quanto ao número simultâneo de genes carregados em relação à origem (humano ou alimento) de isolamento ($p > 0,05$).

3.2. Detecção fenotípica de sistemas de efluxo

Foram comparadas as MICs de ciprofloxacina e tetraciclina na ausência e presença de CCCP. Com ciprofloxacina foram testados 21 isolados (um de alimento, 19 de humano e o isolado de origem animal). Com tetraciclina foram testados sete isolados de origem alimentar, 20 de humano e o isolado animal, totalizando 28 isolados. Não houve redução na MIC de nenhum deles, tanto para ciprofloxacina quanto para tetraciclina.

Utilizando o efluxo de EtBr, 19 (55,9%) isolados demonstraram atividade de SEM, sendo três (37,5%) de origem alimentar, 15 (60%) de humano e o único (100%) isolado animal. A Figura 2, mostra curvas representativas de isolados sem efluxo e isolados com efluxo de EtBr.

Figura 2 - Curvas representativas de efluxo de brometo de etídeo por isolados de *Staphylococcus aureus* multirresistentes recuperados de humanos, animais e alimentos. Em A, há um isolado com atividade de Sistema de Efluxo Multidrogas (SEM) e em B, sem atividade de SEM. A linha laranja marca a fluorescência captada na presença de carbonil cianida m-clorofenilhidrazona (CCCP). Observe que em A, a linha laranja se mantém acima da linha azul (tampão fosfato-salino – PBS). Em B, a linha laranja fica abaixo. Os dados de fluorescência foram normalizados em relação à fluorescência emitida quando há glicose no meio, e representam os dois primeiros minutos de acompanhamento. Aqui apresentamos as linhas de tendência obtidas a partir das médias de duplicatas.



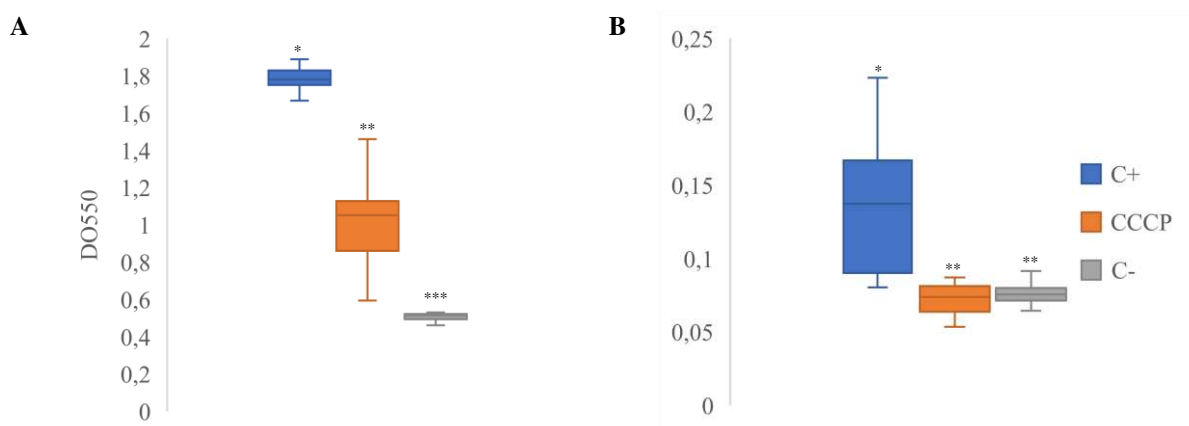
3.3. Biofilmes na presença e ausência de CCCP

Os 19 isolados de *S. aureus* que demonstraram atividade de efluxo de EtBr foram avaliados em relação à formação de biofilme.

Na presença de CCCP o crescimento planctônico dos isolados foi menor que o do controle positivo e maior que o do controle negativo ($p < 0,05$). Em relação à quantificação de biomassa de biofilmes, quando submetidos ao CCCP os isolados produziram menos biofilme que o

controle positivo ($p < 0,05$), com resultados semelhantes aos obtidos no controle negativo (Figura 3).

Figura 3 - Box plot das médias de crescimento planctônico (A) e biomassa de biofilme (B) de 19 isolados de *Staphylococcus aureus* multirresistentes obtidos de humanos, animais e alimentos na presença e ausência do inibidor de sistema de efluxo multidrogas carbonil cianida m-clorofenilhidrazona (CCCP).



C+: controle positivo, meio TSB adicionado de glicose; CCCP a 0,78 $\mu\text{g}/\text{mL}$; C-: Controle negativo, meio TSB não inoculado.

Quanto à produção de biofilme, a classificação dos isolados testados é apresentada na Tabela 3, segundo sua origem de isolamento.

Tabela 3 - Número de isolados de *Staphylococcus aureus* multirresistentes classificados quanto à produção de biofilme de acordo com sua origem de isolamento.

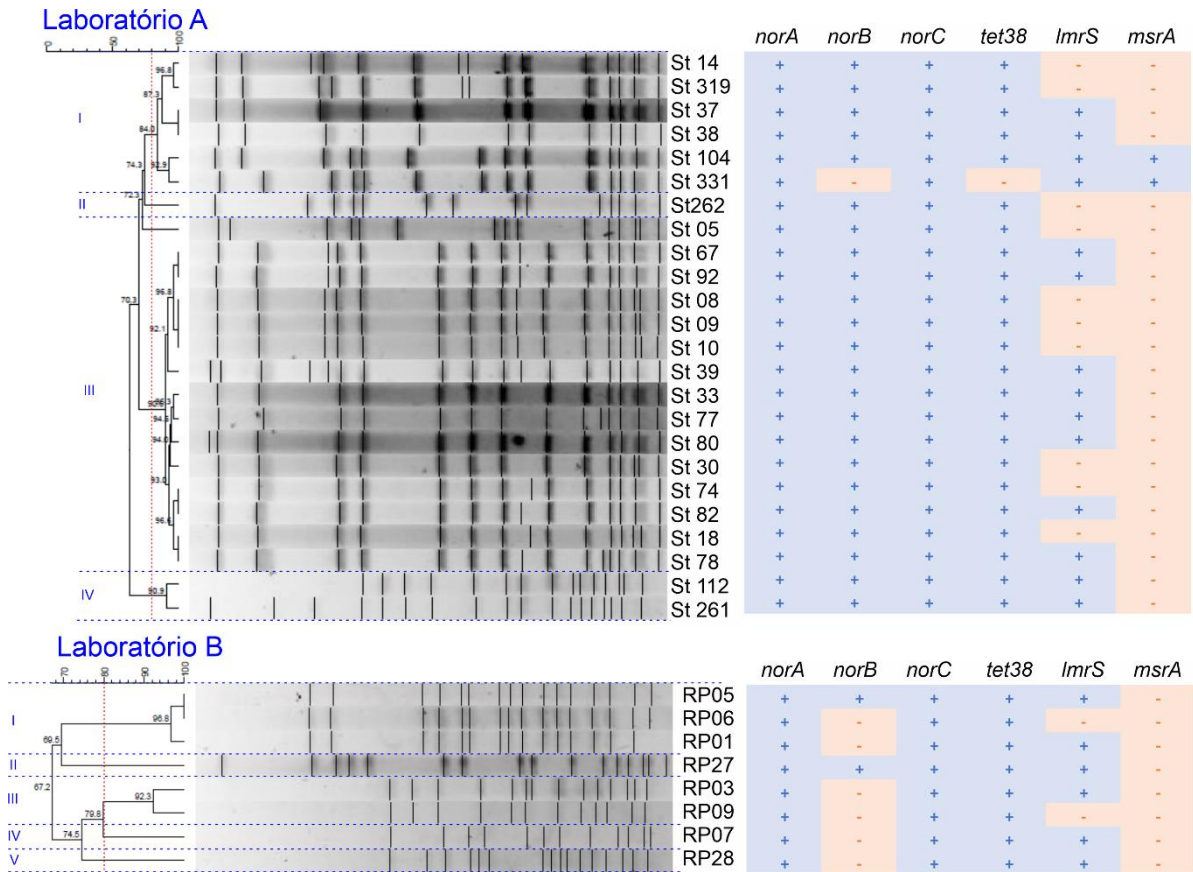
ORIGEM	CLASSIFICAÇÃO				TOTAL
	Forte	Moderado	Fraco	Não produtor	
Humano	1	5	8	1	15
Animal	0	0	1	0	1
Alimento	1	1	0	1	3

Não houve diferença estatística na classificação dos isolados quanto à formação de biofilme em relação à origem de isolamento ($p > 0,05$).

3.4. Tipagem molecular

Dois dendrogramas foram criados usando o programa BioNumerics versão 6.6, um para os isolados obtidos de humanos e outros para aqueles oriundos de alimentos (Figura 4).

Figura 4 - Dendogramas dos isolados de *Staphylococcus aureus* multirresistentes baseados nos padrões de PFGE pós-digestão com *SmaI* associado com genes de Sistema de Efluxo Multidrogas. O agrupamento foi baseado em coeficiente de similaridade de Dice com Tolerância de 1,5% e otimização de 5,0% e UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) usando o software BioNumerics 6.6. A linha vermelha pontilhada representa o coeficiente de similaridade de 80%. Os *clusters* foram designados por algarismos romanos e separados por linhas pontilhadas azuis. Os isolados do Laboratório A foram recuperados de humanos enquanto os do Laboratório B foram recuperados de alimentos.



Fonte: elaborado pela autora.

Os isolados obtidos de humanos (Laboratório A), foram bastante homogêneos se distribuindo em 4 *clusters* (I a IV). O *cluster* III foi o maior, abrangendo 15 isolados. Houve também a formação de um *singleton* (II), conforme ilustra a Figura 4.

Os isolados obtidos de alimento foram mais diversos, com oito isolados distribuindo-se em cinco *clusters*. Desses, três são formados por apenas um isolado – *singletons* (II, IV e V). O *cluster* I compreende três isolados e o *cluster* III, dois isolados (Figura 4).

4. DISCUSSÃO

O uso não planejado e excessivo de antimicrobianos nos setores agrícola, veterinário e médico contribuem para o aumento epidêmico global da resistência antimicrobiana (AMR) (SAMREEN et al., 2021). Uma vez que os antimicrobianos usados na saúde humana e animal compreendem em grande parte as mesmas classes, pode ocorrer transmissão de genes de resistência entre animais e pessoas, diretamente ou através do meio ambiente (ROBINSON et al., 2016).

Dentre os isolados selecionados, verificou-se alta resistência (94,1%) à eritromicina, um antimicrobiano da classe dos macrolídeos (Figura 1), uma das classes de escolha para o tratamento de infecções por *S. aureus* devido às suas propriedades farmacocinéticas e seu perfil antimicrobiano. De acordo com Fiebelkorn e col. (2003), em *Staphylococci*, a resistência a macrolídeos pode ser devido ao efluxo ativo (codificado por *msrA*) ou modificação do alvo ribossômico (resistência a macrolídeo-lincosamida-estreptogramina B [MLSB]; geralmente codificado por *ermA* ou *ermC*). Em nosso estudo apenas dois (5,9%) isolados apresentaram o gene *msrA*. Evidências mostram que a modificação de alvo codificada por *ermA*, *ermB* e *ermC* é o principal mecanismo em *S. aureus* para a resistência cruzada aos antimicrobianos MLSB, incluindo resistência à eritromicina e resistência cruzada à lincosamida clindamicina (SUN et al., 2018). Assim, acredita-se que no presente estudo, a resistência da maior parte dos isolados deu-se por modificação de alvo, uma vez que houve pouca amplificação de *msrA* e há elevada resistência à clindamicina (Figura 1).

Quanto à ciprofloxacina, um dos mecanismos de resistência em *S. aureus* é a presença de bombas de efluxo (RAJABI et al., 2020), e os SEM NorA, NorB e NorC têm a capacidade de expelir essa fluorquinolona (BAMBEKE; PAGÈS; LEE, 2010; TRUONG-BOLDUC et al., 2006). A detecção dos genes *norA*, *norB* e *norC* foi de 97,1, 76,5 e 100%, respectivamente, e em todos os isolados do estudo pelo menos um desses genes foi detectado (Figura 4), o que pode explicar a alta resistência à ciprofloxacina (Figura 1).

NorA, NorB e NorC pertencem à *Major Facilitator Superfamily* (MFS), família de transportadores ativos secundários impulsionados por gradientes de íons. Sendo CCCP, um desacoplador de energia, é capaz de atuar como um inibidor desses SEM. No entanto, seu uso não foi capaz de diminuir a MIC em nenhum dos isolados resistentes à ciprofloxacina.

Outro mecanismo que causa resistência à fluoroquinolona, são mutações que ocorrem na região determinante de resistência às quinolonas (QRDR) da topoisomerase IV codificada por

grlA/grlB e DNA girase codificada por *gyrA/gyrB*, essas mutações diminuem a afinidade da droga (HASSANZADEH et al., 2017) e podem estar presentes nos isolados estudados.

Em relação à tetraciclina, 44,1% de *S. aureus* estudados apresentaram resistência (Figura 1). Segundo Wendlant e colaboradores (2013), dois mecanismos de resistência às tetraciclinas foram identificados entre os estafilococos: o efluxo ativo e a proteção ribossomal. O SEM Tet38 da família MFS, confere, entre outros, resistência à tetraciclina (TRUONG-BOLDUC; WANG; HOOPER, 2021). NorB também é capaz de efluxar tetraciclinas (BAMBEKE; PAGÈS; LEE, 2010). Porém, da mesma maneira que aconteceu com ciprofloxacina, o uso de CCCP não foi capaz de reduzir a MIC de tetraciclina em nenhum dos isolados avaliados. Assim, a proteção ribossomal pode ser a estratégia utilizada por esses isolados.

Ainda, em *S. aureus* MgrA atua como um regulador indireto da expressão de *norA*, *norB*, *norC* e *tet38*, regulando negativamente a transcrição desses genes (TRUONG-BOLDUC; STRAHILEVITZ; HOOPER, 2006). Assim, a dificuldade em diminuir as MICs dos isolados resistentes e positivos para os genes de SEM com o uso de EPI também pode ter ocorrido devido à baixa transcrição desses, o que implicaria em poucos sistemas de efluxo atuantes e passíveis de serem inibidos.

O gene *lmrS* que codificam para essa proteína está localizado no cromossomo bacteriano e foi detectado em 94,1% dos *S. aureus* multirresistentes selecionados para esse estudo (Figura 4). O SEM LmrS também pertence à família MFS e possui como substratos linezolidina, cloranfenicol, florfenicol, trimetoprim, eritromicina, canamicina, ácido fusídico, lincomicina, estreptomicina, tetrafenilfosfônio e brometo de etídeo.

Brometo de etídeo é substrato para diferentes SEM, dentre os pesquisados no presente trabalho, é efluxado por NorA e LmrS (HASSANZADEH et al., 2017). Comparando-se seu efluxo na presença e ausência de CCCP, 55,9% dos isolados exibiram atividade de SEM. Brometo de etídeo é particularmente adequado para ser usado como uma sonda para esses estudos porque emite fluorescência fraca em solução aquosa e torna-se fortemente fluorescentes em ambientes não polares e hidrofóbicos, especialmente quando penetram na parede celular bacteriana e se acumulam no citoplasma (VIVEIROS et al., 2010).

Não é de nosso conhecimento o uso dessa ferramenta como *screening* para detectar atividade de efluxo em *S. aureus*, sendo mais comumente utilizada para comparar a atividade de SEM em isolados alterados geneticamente para superexpressar ou nocaute para genes de SEM. Também há relatos de seu uso na comparação da fluorescência emitida para determinar atividade de novos compostos como EPI (DE SOUSA ANDRADE et al., 2020; ESPINOZA et

al., 2019). No entanto, utilizar o efluxo de EtBr em nossa bacterioteca nos possibilitou evidenciar a atividade de SEM mesmo quando não conseguimos esse feito por meio do uso da MIC, a técnica mais tradicionalmente utilizada. Descrevemos aqui, portanto, uma nova aplicação da técnica que pode ser utilizada como suporte às técnicas tradicionais para detecção de atividade de SEM.

Para determinar o efeito da inibição do efluxo na formação de biofilme, utilizamos CCCP. Em comparação ao controle, a presença de CCCP diminuiu a formação de biofilme dos isolados que tiveram atividade de SEM (Figura 3). Diminuição da formação de biofilme de *S. aureus* utilizando CCCP havia sido relatada previamente (BAUGH et al., 2014; GARRISON et al., 2015). A inibição da formação de biofilme não foi resultado de ação antibacteriana, uma vez que os isolados foram capazes de se multiplicar na presença de CCCP. Assim, a inibição do efluxo é uma estratégia antibiofilme promissora.

Em relação à epidemiologia molecular, o padrão de restrição obtidos com *SmaI* dos isolados submetidos à PFGE foram avaliados de acordo com a origem: humanos ou alimento.

Dentre aqueles de origem humana, houve grande homogeneidade, com distribuição de 23 isolados entre apenas quatro *clusters* com similaridade superior a 84% entre os isolados agrupados (Figura 4). Todos os isolados de origem humana foram recuperados do mesmo hospital, dentro de ambiente de terapia intensiva. Tendo em vista a grande semelhança encontrada nos padrões de restrição, acredita-se que esses isolados sejam residentes do ambiente e capazes de causar infecções hospitalares. Além disso, pode-se pensar adoção do modo de vida sésil por esses isolados, que dificulta a sua eliminação do ambiente, mesmo utilizando técnicas corretas de desinfecção e assepsia.

Analisando-se os isolados de origem alimentar, oito isolados foram distribuídos em cinco *cluster*. Diferente do demonstrado nos isolados de origem humana, nesse caso o padrão foi bastante heterogêneo. Essa diversidade provavelmente reflete as múltiplas fontes de contaminação por *S. aureus*, ou seja, animais e seu leite cru, ambiente de processamento e pessoal envolvido na cadeia de produção (LONCAREVIC et al., 2005).

Assim, isolados de *S. aureus* multirresistentes de humanos, animal e alimento carregam distintos genes de SEM, e tiveram sua atividade detectada através do efluxo de brometo de etídeo. A inibição dessa atividade não alterou a resistência aos antimicrobianos ciprofloxacina e tetraciclina, porém resultou na diminuição da formação de biofilme por esses isolados. Essa pode ser uma estratégia adotada na tentativa de diminuir as infecções hospitalares causadas por essa bactéria, que pode estar se mantendo no ambiente através de biofilmes. Destacamos ainda,

a utilização da quantificação do efluxo de brometo de etídeo como uma ferramenta de triagem para detecção de atividade de SEM em *S. aureus*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALAV, I.; SUTTON, J. M.; RAHMAN, K. M. Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, p. 2003–2020, 2018.
- ANDRÉ, M. C. D. P. B. et al. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from food handlers, raw bovine milk and Minas Frescal cheese by antibiogram and pulsed-field gel electrophoresis following *Sma*I digestion. **Food Control**, v. 19, n. 2, p. 200–207, 2008.
- BAMBEKE, F. VAN; PAGÈS, J.; LEE, V. J. Inhibitors of Bacterial Efflux Pumps as Adjuvants in Antibacterial Therapy and Diagnostic Tools for Detection of Resistance by Efflux. **Frontiers in Anti-Infective Drug Discovery**, v. 1, p. 138–175, 2010.
- BAUGH, S. et al. Inhibition of multidrug efflux as a strategy to prevent biofilm formation. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 3, p. 673–681, 2014.
- CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 28th. CLSI ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratorial Standards Institute, 2018.
- DE SOUSA ANDRADE, L. M. et al. Antimicrobial activity and inhibition of the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus* by extract and isolated compounds from *Arrabidaea brachypoda*. **Microbial Pathogenesis**, v. 140, p. 103935, 2020.
- ESPINOZA, J. et al. Essential oil, extracts, and sesquiterpenes obtained from the heartwood of *Pilgerodendron uviferum* act as potential inhibitors of the *Staphylococcus aureus* NorA multidrug efflux pump. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. 337, p. 1–15, 2019.
- FIEBELKORN, K. R. et al. Practical disk diffusion method for detection of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative Staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 10, p. 4740–4744, 2003.
- FLOYD, J. L. et al. LmrS is a multidrug efflux pump of the major facilitator superfamily from *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 12, p. 5406–5412, 2010.
- GARRISON, A. T. et al. Halogenated Phenazines that Potently Eradicate Biofilms, MRSA Persister Cells in Non-Biofilm Cultures, and *Mycobacterium tuberculosis*. **Angewandte Chemie**, v. 127, n. 49, p. 15032–15036, 2015.
- HASSANZADEH, S. et al. Frequency of efflux pump genes mediating ciprofloxacin and antiseptic resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. **Microbial Pathogenesis**, v. 111, p. 71–74, 2017.
- KAATZ, G. W. et al. Evidence for the existence of a multidrug efflux transporter distinct from NorA in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 5, p. 1404–1406, 2000.
- LI, X.-Z.; NIKAIDO, H. Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria: an Update. **Drugs**, v. 69, n. 12, p. 1555–1623, 2009.

LIMA, M. C. et al. Profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from goat persistent mastitis before and after treatment with enrofloxacin. **BMC Microbiology**, v. 20, n. 1, 2020.

LISTER, J. L.; HORSWILL, A. R. *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 4, n. 178, p. 1–9, 2014.

LONCAREVIC, S. et al. Diversity of *Staphylococcus aureus* enterotoxin types within single samples of raw milk and raw milk products. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, n. 2, p. 344–350, 2005.

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

MARTINEAU, F. et al. Correlation between the Resistance Genotype Determined by Multiplex PCR Assays and the Antibiotic Susceptibility Patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 2, p. 231–238, 2000.

RAJABI, S. et al. Evaluation of multidrug efflux pump expression in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **Gene Reports**, v. 18, n. 100537, p. 1–4, 2020.

ROBINSON, T. P. et al. Antibiotic resistance is the quintessential One Health issue. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 110, n. 7, p. 377–380, 2016.

SAMREEN et al. Environmental antimicrobial resistance and its drivers: a potential threat to public health. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 27, p. 101–111, 2021.

SHAMKHI, G. J.; SAADEDIN, S. M. K.; JASSIM, K. A. Detection the Prevalence of Some Chromosomal Efflux Pump Genes in Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated from Iraqi Patients. **Iraqi journal of biotechnology**, v. 18, n. 3, p. 33–42, 2019.

SOTO, S. M. Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. **Virulence**, v. 4, n. 3, p. 223–229, 2013.

STEPANOVIC, S. et al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 40, n. 2, p. 175–179, 2000.

SUN, X. et al. Biofilm formation in erythromycin-resistant *Staphylococcus aureus* and the relationship with antimicrobial susceptibility and molecular characteristics. **Microbial Pathogenesis**, v. 124, n. March, p. 47–53, 2018.

TRUONG-BOLDUC, Q. C. et al. MgrA Is a Multiple Regulator of Two New Efflux Pumps in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 7, p. 2395–2405, 2005.

TRUONG-BOLDUC, Q. C. et al. NorC, a New Efflux Pump Regulated by MgrA of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 150, n. 3, p. 1104–1107, 2006.

TRUONG-BOLDUC, Q. C.; STRAHILEVITZ, J.; HOOPER, D. C. NorC, a new efflux pump regulated by MgrA of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 3, p. 1104–1107, 2006.

TRUONG-BOLDUC, Q. C.; WANG, Y.; HOOPER, D. C. *Staphylococcus aureus* Tet38 Efflux Pump Structural Modeling and Roles of Essential Residues in Drug Efflux and Host Cell Internalization. **Infection and Immunity**, v. 89, n. 5, p. 1–10, 2021.

TRUONG-BOLDUC, Q. C.; ZHANG, X.; HOOPER, D. C. Characterization of NorR protein, a multifunctional regulator of norA expression in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 10, p. 3127–3138, 2003.

VIVEIROS, M. et al. Evaluation of efflux activity of bacteria by a semi-automated fluorometric system. In: GILLESPIE, S.; MCHUGH, T. (Eds.). . **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**. Second Edi ed. [s.l.] Springer Science+Business Media, 2010. v. 642p. 159–172.

WENDLANDT, S. et al. The diversity of antimicrobial resistance genes among staphylococci of animal origin. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, p. 338–349, 2013.

YANG, Y. et al. Detection of *Staphylococcus aureus* in Dairy Products by Polymerase Chain Reaction Assay. **Agricultural Sciences in China**, v. 6, n. 7, p. 857–862, 2007.

YILMAZ; ÖZCENGİZ, G. Antibiotics: Pharmacokinetics, toxicity, resistance and multidrug efflux pumps. **Biochemical Pharmacology**, v. 133, p. 43–62, 2017.

CONCLUSÕES GERAIS

Em isolados multirresistentes de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* recuperados de humanos e animais, os sistemas de efluxo multidrogas estão amplamente difundidos. Nesses isolados, essas bombas são funcionais e têm atividade relevante. No entanto, as tentativas de inibição desses sistemas não culminaram em restituição da sensibilidade aos antimicrobianos avaliados, provavelmente devido a ocorrência de outros mecanismos de resistência simultaneamente, embora para *E. coli* tenha havido diminuição da MIC.

Em relação à formação de biofilmes, resultados controversos foram encontrados: em *E. coli*, o uso do inibidor de SEM não resultou na diminuição da formação de biofilme enquanto em *S. aureus*, sim. Novos estudos com diferentes concentrações de EPIs são sugeridos para conclusões mais contundentes em *E. coli*.

Sobre o perfil genético dos isolados, verificou-se grande heterogeneidade dentre os isolados de *E. coli* humanos e mais homogeneidade dentre aqueles advindos de animais, sugerindo contaminação ambiental no grupo dos animais. Em relação à *S. aureus*, de uma maneira geral, os isolados foram semelhantes geneticamente, com formação de poucos *clusters* como homogeneidade elevada, inferindo-se dispersão ambiental dos isolados, com posterior infecção ou contaminação dos pacientes e alimentos, respectivamente.

Esse estudo trouxe dados inéditos e relevantes sobre o papel de sistemas de efluxo multidrogas em isolados multirresistentes. Destaca-se ainda a utilização de maneira original da de quantificação de efluxo como triagem para a detecção de atividade de sistemas de efluxo multidrogas em isolados multirresistentes.

A complementação dos resultados aqui publicados com estudos de sequenciamento completo (*Whole Genome Sequencing*) dos isolados, já em andamento, irá fornecer ainda mais pistas para o esclarecimento do papel de SEM na resistência antimicrobiana e na formação de biofilmes em bactérias modelo multirresistentes.