



## **ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E ESTRUTURAIS EM ISOLADOS DE *Pseudomonas aeruginosa* APÓS EXPOSIÇÃO AO MEROPENEM**

Fernanda Meloquero Matias (PIBIC/CNPq/Uem), Regiane Bertin de Lima Scodro, Celso Vataru Nakamura, Rosilene Fressatti Cardoso, Katiany Rizzieri Caleffi-Ferracioli e Vera Lucia Dias Siqueira (Orientador), e-mail: [vldsiqueira@gmail.com](mailto:vldsiqueira@gmail.com).

Universidade Estadual de Maringá/Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina

**Microbiologia (2.12.00.00-9) Bacteriologia (2.12.01.02-1)**

**Palavras-chave:** *Pseudomonas aeruginosa*, Meropenem, Microscopia Eletrônica.

### **Resumo:**

*Pseudomonas aeruginosa* é um importante agente de infecções relacionadas à assistência à saúde e multirresistência é um fenômeno comum nesta espécie bacteriana, o que torna as opções terapêuticas para o seu controle, muito limitadas. Dos agentes antimicrobianos que podem ser ativos contra esta bactéria destacam-se os carbapenêmicos, como o meropenem. Estudos dos mecanismos de resistência antibacteriana podem colaborar na compreensão de como isolados de *P. aeruginosa* respondem e se tornam resistentes aos antimicrobianos, como o meropenem, e assim contribuir para as medidas de controle e prevenção desses multirresistentes. Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar alterações morfológicas e estruturais de *P. aeruginosa* decorrentes da exposição a concentrações subinibitórias de meropenem. A avaliação foi realizada empregando-se microscopia eletrônica de varredura (MEV) e transmissão (MET) em *P. aeruginosa* sensível (Pa ATCC) e resistente (Pa 1071) ao meropenem. As alterações morfológicas observadas pela MET chamam a atenção pelo arredondamento do bacilo e a destruição da parede celular em consequência à exposição ao meropenem. O arredondamento celular também foi a principal alteração observada na MEV. A amostra bacteriana resistente apresentou maior porcentagem de alteração morfológica, com destaque para um acúmulo interno de parede celular, o que pode sugerir uma tentativa de adaptação bacteriana à ação do antimicrobiano.



## Introdução

*Pseudomonas aeruginosa* é um dos principais agentes de infecção relacionada à assistência à saúde. A importância clínica dessa infecção caracteriza-se pela expressão de múltipla resistência aos antibacterianos associada a uma difícil erradicação da doença, conseqüentemente com elevados índices de morbidade e mortalidade (HIRSCH; TAM, 2010).

Carbapenêmicos, como o meropenem, são antimicrobianos de amplo espectro, com atividade bactericida, por atuarem inibindo as proteínas ligadoras de penicilina e conseqüentemente a síntese da parede celular. Os carbapenêmicos possuem considerável estabilidade diante da maioria das betalactamases, incluindo as de amplo espectro (ESBL), por essa razão, os carbapenêmicos são considerados fármacos de reserva e devem ser preservados (RUPP et al., 2003).

Microscopia eletrônica de transmissão e de varredura representam ferramentas importantes para avaliar a morfologia e ultra-estrutura das bactérias e podem ser usadas para elucidar alvos celulares envolvidos nas interações bactéria e anti-bacterianos (SIQUEIRA et al., 2014).

## Materiais e métodos

### *Amostras bacterianas*

Um isolado de *P. aeruginosa* resistente ao meropenem (Pa 1071), proveniente da bacterioteca do setor de Bacteriologia Médica do Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas, da Universidade Estadual de Maringá foi empregada neste estudo. *P. aeruginosa* ATCC 27853 (Pa ATCC) foi utilizada como amostra sensível ao antimicrobiano estudado. A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de meropenem (AstraZeneca, Cotia, Brasil) foi definida pelo método de microdiluição em caldo segundo CLSI (2014).

### *Avaliação da Morfologia e Ultraestrutura Celular por Microscopia Eletrônica*

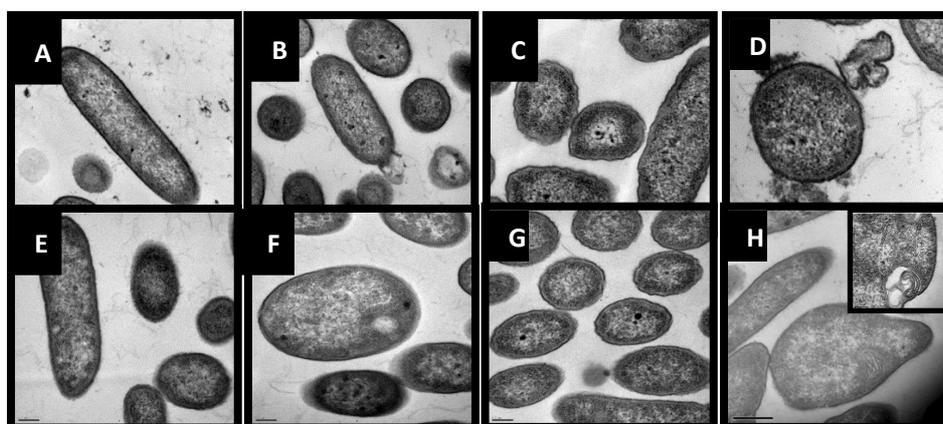
*Pa 1071* e *Pa ATCC* expostas ou não a 0,5 x CIM de meropenem por 3 e 12 h foram recolhidas por centrifugação, lavadas em PBS e fixadas com 2,5% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (EMS - Electron Microscopy Science, Hatfield, PA, EUA) por no mínimo 2 h a 4°C. A microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET) foram realizadas segundo Siqueira et al., (2014).

## Resultados e Discussão

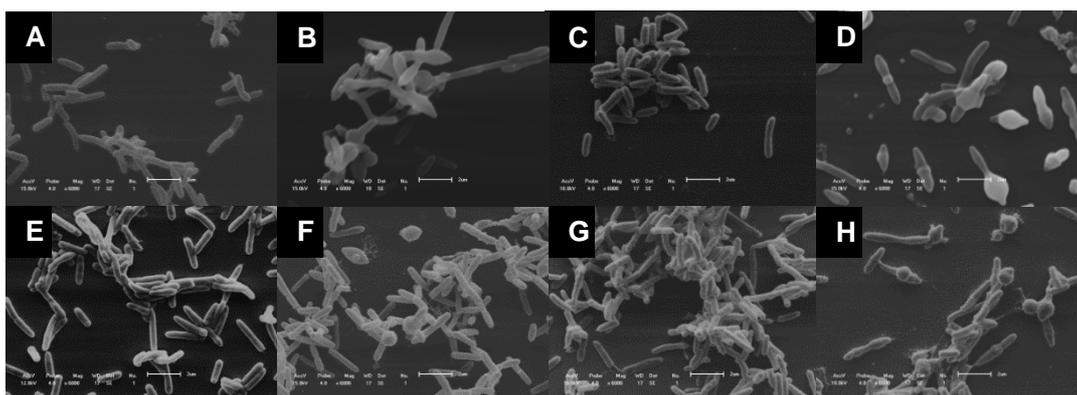
*Pa 1071* foi resistente ao meropenem com CIM = 32 µg/mL, enquanto *Pa ATCC* com CIM = 0,25 µg/mL foi usada como amostra sensível ao meropenem. As alterações morfológicas observadas pela microscopia de



transmissão (Figura 1) e varredura (Figura 2) chamam a atenção pelo arredondamento do bacilo e a destruição da parede celular em consequência à exposição ao meropenem. A amostra bacteriana resistente (Pa1071) apresentou maior porcentagem de alteração celular que a amostra sensível (Tabela 1) e um acúmulo de parede bacteriana no interior da célula (Figura 1 H inset).



**Figura 1-** Eletromicrografias de *P. aeruginosa* obtidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão. (A e C) Pa ATCC na ausência do tratamento com 3 e 12 horas, respectivamente. (B e D) Pa ATCC exposta a 0,5 x CIM de meropenem por 3 e 12 horas, respectivamente. (E e G) Pa1071 na ausência do tratamento com 3 e 12 horas, respectivamente. (F e H) Pa1071 exposta a 0,5 x CIM de meropenem em 3 e 12 horas, respectivamente (Magnificação A – H = 40.000x, Hinset = 60.000x).



**Figura 2--** Eletromicrografias de *P. aeruginosa* obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura. (A e C) Pa ATCC na ausência do tratamento com 3 e 12 horas, respectivamente. (B e D) Pa ATCC exposta a 0,5 x CIM em 3 e 12 horas, respectivamente. (E e G) Pa 1071 na ausência do tratamento com 3 e 12 horas, respectivamente. (F e H) Pa 1071 exposta a 0,5 x CIM em 3 e 12 horas, respectivamente (Magnificação A-H = 6000x).

**TABELA 1** – Porcentagem de alterações morfológicas e estruturais em *Pseudomonas aeruginosa* sensível (Pa ATCC) e resistente (Pa 1071) ao meropenem, após 3 e 12 horas



de incubação com ou sem 0,5 x a concentração inibitória mínima de meropenem, por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e varredura (MEV).

Tratamento antimicrobiano	Alterações ATCC (%)		Alterações (%) Pa 1071	
	MET	MEV	MET	MEV
Sem tratamento 3 h	3,4	0,73	2,6	2,59
Meropenem 3 h	12,4	20,27	20,4	9,38
Sem tratamento 12h	7,6	1,18	5,9	3,03
Meropenem 12 h	11,0	25,75	72,7	52,52

## Conclusões

No presente estudo observamos que, em comparação com a bactéria sensível, o isolado resistente (Pa1071) apresentou maior porcentagem de alteração morfológica e um acúmulo interno de parede celular, sugerindo uma tentativa de adaptação bacteriana à ação do antimicrobiano testado.

## Agradecimentos

CNPq/UEM

## Referências

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility testing; Twenty-fourth Informational Supplement**. CLSI document M100-S24. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2014.

HIRSCH, E.B.; TAM, V.H. Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection on patient outcomes. **Expert review of pharmacoeconomics and outcomes research**, London, v. 10, n. 4, p. 441-51. 2010.

RUPP, M. E.; FEY, P. D. Extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae*: considerations for diagnosis, prevention and drug treatment. **Drugs**, Auckland, v. 63, n. 4, p. 353-65, 2003.

SIQUEIRA, V.L.D.; et al. Structural changes and differentially expressed genes in *Pseudomonas aeruginosa* exposed to meropenem-ciprofloxacin combination. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Washington DC, v. 58, n. 7, p. 3957-67, 2014.