



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

LUCIMEIRE FERNANDES CORREIA

**ASPECTOS CLÍNICOS E CARACTERIZAÇÃO DE *Pseudomonas*
aeruginosa ISOLADAS DE PACIENTES INFECTADOS COM SARS-COV-2**

Presidente Prudente – SP

2023



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

LUCIMEIRE FERNANDES CORREIA

**ASPECTOS CLÍNICOS E CARACTERIZAÇÃO DE *Pseudomonas*
aeruginosa ISOLADAS DE PACIENTES INFECTADOS COM SARS-COV-2**

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde. Área de concentração: Ciências da Saúde.

Orientadora:
Profa. Dra. Lizziane Kretli Winkelstroter Eller

Presidente Prudente – SP

2023

Catálogo Internacional na Publicação (CIP)

616.362
C824a

Correia, Lucimeire Fernandes

Aspectos clínicos e caracterização de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de pacientes infectados com SARS-COV-2 \ Lucimeire Fernandes Correia; orientadora Lizziane Kretli Winkelstroter Eller. -- Presidente Prudente, 2023.
49 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) -
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente
Prudente, SP, 2023.
Bibliografia.

1. Biofilmes. 2. resistência bacteriana. 3. Ventilação
mecânica. 4. COVID-19. I. Eller, Lizziane Kretli Winkelstroter,
orient. II. Título.

Bibliotecária: Jakeline Margaret de Queiroz Ortega – CRB 8/6246

LUCIMEIRE FERNANDES CORREIA

ASPECTOS CLÍNICOS E CARACTERIZAÇÃO DE *Pseudomonas aeruginosa* ISOLADAS DE PACIENTES INFECTADOS COM SARS-COV-2

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde

Presidente Prudente, 17 de fevereiro de 2023.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Lizziane Kretli Winkelstroter Eller
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente - SP

Profa. Dra. Enyara Rezende Moraes
Universidade Federal de Uberlândia – UFU
Patos de Minas - MG

Profa. Dra. Valéria Cataneli Pereira
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente - SP

AGRADECIMENTOS

Nesses dois anos de mestrado, de muito estudo, esforço e empenho, gostaria de agradecer algumas pessoas que participaram de forma direta e indireta, e se tornaram fundamentais para a realização de mais um sonho. Assim, expresso aqui, de uma forma carinhosa através de palavras, um pouquinho da importância que tiveram e ainda tem, nesta conquista, e minha enorme gratidão.

Primeiramente aos meus pais, Miguel e Rosa, que sempre me apoiaram e incentivaram, além de compreender minha ausência em momentos de dedicação aos estudos. Obrigada por desejarem sempre o melhor para mim, por todo esforço que fizeram para que pudesse superar cada obstáculo em meu caminho e chegar até aqui e, principalmente pelo amor imenso que sentem por mim.

Gratidão em especial à Prof. Dra. Lizziane Kretli Winkelstroter Eller, minha orientadora, pela pessoa e profissional que é. Obrigada por todo ensinamento, paciência e dedicação, além de acreditar e depositar sua confiança em mim ao longo desse tempo. Sem sua orientação, apoio, confiança e amizade, nada disso seria possível.

Agradecimento especial aos meus amigos de laboratório que também participaram de minha jornada, Karol, Maria Vitória, Adriano, Heloisa e Thais. Quero também agradecer às técnicas que deram todo suporte laboratorial durante as análises, Maria, Adriana e Mayara, e demais envolvidos, cujo auxílio e esforços tornaram possível a realização deste artigo.

Com enorme carinho, agradeço às professoras Dra. Enyara Rezende Moraes e Dra. Valéria Cataneli Pereira, membros da banca de Qualificação e Defesa de Mestrado, dos conselhos, sugestões e interesse em contribuir para a melhoria deste artigo.

Por fim, o agradecimento mais importante, a Deus por guiar e iluminar meu caminho, além de selecionar pessoas especiais para participarem de minha trajetória. Obrigada pela fé e força necessária para lutar e enfrentar todos os obstáculos, sem nunca desistir.

RESUMO

Aspectos clínicos e caracterização de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de pacientes infectados com SARS-CoV-2

Objetivo: O objetivo deste trabalho foi identificar e caracterizar *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de pacientes em um hospital universitário e comparar o perfil genotípico e fenotípico das estirpes isoladas de pacientes infectados e não infectados com SARS-CoV-2. **Métodos:** Foram utilizados *P. aeruginosa* isoladas de pacientes internados em um Hospital Universitário de Presidente Prudente-SP nos meses de janeiro a dezembro de 2021, com idade entre 18 a 85 anos. Foram coletados dados demográficos e clínicos. Os isolados foram avaliados quanto a resistência antimicrobiana, produção de piocianina, lipase e fosfolipase C e formação de biofilme. Foi avaliado também a presença de genes para fatores de virulência (*exoS*, *exo*, *toxA*, *akgO*, *pclH*, *plcN*, *aprA*, *lasB*) e de produção de metalo- β -lactamases (*blaIMP*, *blaVIM*, *blaSPM*) por meio da Reação da Polimerase em Cadeia. As análises estatísticas consideraram nível de significância de 5%. **Resultados:** Durante o período de coleta foi possível obter um total de 100 isolados de *P. aeruginosa*, sendo estas, 58 obtidas de pacientes infectados com SARS-CoV-2 e 42 isoladas de pacientes não infectados ($p < 0,05$). A maior parcela de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes SARS-CoV-2 positivo foi obtida na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) Covid ($p < 0,05$). A ventilação mecânica foi necessária em cerca de 93% dos pacientes infectados com SARS-CoV-2 e *P. aeruginosa*. Assim, *P. aeruginosa* foram mais frequentemente obtidos de amostras de secreção traqueal em pacientes infectados por SARS-CoV-2 enquanto que, em pacientes sem SARS-CoV-2 a amostra mais comum foi urina ($p < 0,05$). A frequência das infecções secundárias por outras espécies bacterianas foi semelhante nos dois grupos, apresentando diferença apenas na presença de microrganismo do grupo *Staphylococcus* spp. que estiveram em maior porcentagem em pacientes não infectados. A multirresistência estava presente em cerca de 60% dos isolados, valor semelhante em ambos os grupos. Os pacientes infectados com SARS-CoV-2 apresentaram maior taxa de resistência ao antibiótico aztreonam e utilizaram maior diversidade de antibióticos ($p < 0,05$). Os isolados de pacientes infectados por SARS-CoV-2 apresentaram maior produção de fosfolipase C e maior número de isolados classificados como forte formadores de biofilmes ($p < 0,05$). Todos os genes vinculados a fatores de virulência em *P. aeruginosa* estavam presentes em pelo menos 70% dos isolados de ambos os grupos. Foram observados apenas três isolados obtidos de pacientes infectados com SARS-CoV-2 com a presença de genes produtores de metalo- β -lactamases. **Conclusão:** Os dados do presente trabalho demonstraram que a pandemia de COVID-19 é um cenário perfeito para o aumento da infecção secundária por *P. aeruginosa*. Portanto, estratégias baseadas em estudos epidemiológicos como esse, se tornam relevantes para que metas possam ser traçadas a fim de reduzir taxas de infecções por *P. aeruginosa*.

Palavras-chave: biofilmes, resistência bacteriana, ventilação mecânica, COVID-19.

ABSTRACT

Clinical aspects and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients 3 infected with SARS-CoV-2

Objective: The objective of this work was to identify and characterize *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients at a university hospital and compare the genotypic and phenotypic profile of strains isolated from patients infected and not infected with SARS-CoV-2. **Methods:** *P. aeruginosa* isolates from patients aged between 18 and 85 years old were admitted to a University Hospital in Presidente Prudente-SP from January to December 2021. Demographic and clinical data were collected. The isolates were evaluated according to antimicrobial resistance, production of pyocyanin, lipase and phospholipase C and biofilm formation. The presence of genes for virulence factors (*exoS*, *exo*, *toxA*, *akgO*, *pclH*, *plcN*, *aprA*, *lasB*) and production of metallo- β -lactamases (*blaIMP*, *blaVIM*, *blaSPM*) was evaluated by means of the Polymerase Reaction in Chain. Statistical analyzes considered a significance level of 5%. **Results:** During the collection period, it was possible to obtain a total of 100 *P. aeruginosa* isolates, of which 58 were obtained from patients infected with SARS-CoV-2 and 42 were isolated from non-infected patients ($p < 0.05$). The largest portion of *P. aeruginosa* isolated from SARS-CoV-2 positive patients was obtained in the UTI Covid ($p < 0.05$). Mechanical ventilation was required in approximately 93% of patients infected with SARS-CoV-2 and *P. aeruginosa*. Thus, *P. aeruginosa* were more frequently obtained from tracheal secretion samples in patients infected with SARS-CoV-2 while in patients without SARS-CoV-2 the most common sample was urine ($p < 0.05$). The frequency of co-infection with other bacterial species was similar in both groups, differing only in the presence of microorganisms from the *Staphylococcus* spp group. Which were in higher percentage in uninfected patients. Multidrug resistance was present in about 60% of the isolates, a similar value in both groups. Patients infected with SARS-CoV-2 had a higher rate of resistance to the antibiotic aztreonam and used a greater diversity of antibiotics ($p < 0.05$). The isolates from patients infected with SARS-CoV-2 showed a higher production of phospholipase C and a higher number classified as strong biofilm formers ($p < 0.05$). All genes linked to virulence factors in *P. aeruginosa* were present in at least 70% of isolates from both groups. Only three isolates obtained from patients infected with SARS-CoV-2 were observed with the presence of one gene each. **Conclusion:** The data from the present study demonstrated that the COVID-19 pandemic is a perfect scenario for the increase in co-infection with *P. aeruginosa*. Therefore, strategies based on epidemiological studies like this one become relevant so that goals can be set in order to reduce rates of infections by *P. aeruginosa*.

Keywords: biofilms, bacterial resistance, mechanical ventilation, COVID-19

LISTA DE SIGLAS

A	Altamente Móvel
ACE2	Enzima Conversora de Angiotensina 2
ALB	Ágar Luria Bertani
BHI	Brain Heart Infusion Broth
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
D	Densidade
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DO	Densidade Óptica Média
DOc	Densidade Óptica Controle Negativo
EPS	Exopolissacarídeo
F	Fracamente Móvel
For	Forte
Fra	Fraca
IRAS	Infecção Relacionadas a Assistência em Saúde
M	Moderadamente Móvel
MAR	Múltipla Resistência a Antimicrobianos
MBL	Melato- β -lactamase
Mod	Moderado
NA	Não Aderente
NM	Não Móvel
P	Piocianina
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
QS	Quorum Sensing
SWA	Swarming
SWI	Swimming
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TSA	Trypticase Soy Ágar
TWI	Twitching
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
UV	Ultravioleta
WHO	World Health Organization

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Visão geral das características do paciente, comorbidades, dados demográficos e hospitalares de pacientes Sars-Cov-2 + e Sars-Cov-2.. 21
- Figura 2 - Dados hospitalares dos pacientes SARS-CoV-2 positivo e negativo com cultura positiva para *P. aeruginosa*: A) Distribuição anual do número de isolados B) Principais comorbidades dos pacientes C) Local de internação do paciente D) Tempo de ventilação mecânica do paciente..... 24
- Figura 3 - Dados hospitalares dos pacientes SARS-CoV-2 positivo e negativo com cultura positiva para *P. aeruginosa*: A) Tipo de amostras B) Espécies bacterianas em co-infecção com *P. aeruginosa* C) Nível de resistência a antimicrobiano D) N° antibióticos utilizados..... 26
- Figura 4 - Dados laboratoriais do fenótipo de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes SARS-CoV-2 positivo e negativo: A) ensaios de motilidade tipos Swarming (SWA), Swimming (SWI) e Twitching (TWI) B) Ensaio de formação de biofilme..... 27
- ..

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Iniciadores utilizados para a determinação dos fatores de virulência em <i>P. aeruginosa</i> segundo Lanotte <i>et al.</i> (2004) e Lomholt <i>et al.</i> (2001).....	19
Tabela 2 - Iniciadores utilizados para a determinação dos genes que codificam metalo- β -lactamase segundo Dogonchi <i>et al.</i> (2018).....	19
Tabela 3 - Dados demográficos dos pacientes com cultura positiva para <i>P. aeruginosa</i> infectados ou não com SARS-CoV-2.....	22
Tabela 4 - Resultados da amplificação dos genes de virulência e genes para a produção de metalo- β -lactamase de isolados de <i>P. aeruginosa</i> em relação a pacientes com cultura positiva para <i>P. aeruginosa</i> infectados ou não com SARS-CoV-2.....	28

SUMÁRIO

ARTIGO CIENTÍFICO – Aspectos Clínicos e Caracterização de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isoladas de Pacientes Infectados com SARS-CoV-2.....	11
Introdução.....	12
Materiais e Métodos.....	14
Resultados.....	20
Discussão.....	29
Conclusão.....	32
Referências.....	33
ANEXO – Normas de Submissão Journal of Applied Microbiology.....	38

**Aspectos Clínicos e Caracterização de *Pseudomonas aeruginosa*
isoladas de Pacientes Infectados com SARS-CoV-2**

Lucimeire Fernandes Correia¹, Lizziane Kretli Winkelstroter Eller¹

1 Mestrado em Ciências da Saúde – Universidade do Oeste Paulista/UNOESTE,
Presidente Prudente, SP, Brasil

Autor correspondente: Profa. Dra. Lizziane Kretli Winkelstroter Eller
Faculdade Ciências da Saúde
Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE)
Rua José Bongiovani, 700 – Cidade Universitária, Presidente Prudente-SP, Brasil
CEP: 19050-920

Email: lizziane@unoeste.br

O trabalho está apresentado sob a forma de artigo, segundo as normas do periódico o qual será submetido: Journal of Applied Microbiology, Fator de impacto: 4,0 Qualis A3

1 Introdução

Pseudomonas aeruginosa pertence a família Pseudomonaceae, é uma bactéria com característica morfotintorial de bastonetes Gram-negativos, aeróbia e móvel. Pode ser encontrada na microbiota intestinal e na pele dos seres humanos, além de ser comumente isolada de amostras hospitalares (Jernigan et al., 2020).

P. aeruginosa é um dos principais agentes etiológicos de infecções hospitalares, principalmente em casos de infecção urinária, pneumonia, bacteremias além de infecção de feridas cirúrgicas. Também é frequentemente associada a complicações em pacientes queimados e com fibrose cística (Camus et al., 2022).

Há relatos de que *P. aeruginosa* possam colonizar até 50% dos pacientes hospitalizados. Este fato se deve principalmente a procedimentos invasivos ou utilização de aparelhos/equipamentos medico-hospitalar como ventilador mecânico, endoscópios, próteses, entre outros (Rossi et al., 2021; Kwok et al., 2021). Vale ressaltar que a grande maioria dos pacientes em ambiente hospitalar apresentam comorbidades e são imunocomprometidos, e desta maneira, essa condição pode contribuir para um prognóstico ruim do paciente colonizado ou infectado por *P. aeruginosa* no ambiente hospitalar (De Souza et al., 2021).

P. aeruginosa multirresistentes a antimicrobianos são comuns no ambiente hospitalar, e esse fato desperta grande interesse entre os pesquisadores, uma vez que há projeção de mortalidade em cerca de 10 milhões/ano de pacientes hospitalizados com infecção multirresistente até 2050 (Jara et al., 2021). Seus principais mecanismos de resistência são: a produção de β -lactamase - considerada a mais importante; mecanismo não enzimático de bomba de efluxo e a redução de permeabilidade por meio da diminuição de porinas. Também há relatos de baixa expressão de proteínas de membrana externa (Jernigan et al., 2020).

A resistência dessa bactéria a classe dos antimicrobianos carbapenêmicos vem aumentando cada vez mais. O motivo dessa resistência é multifatorial podendo destacar a produção de metalo- β -lactamases (MBL). Também tem sido observada a resistência às quinolonas por meio de alterações genéticas envolvendo as enzimas DNA-girase e topoisomerase IV, e resistência as polimixinas devido a redução de expressão proteica específica da membrana externa e alterações lipídicas (Teo et al., 2021).

Diversos fatores de virulência são relatados em *P. aeruginosa* (Hadadi-Fishani et al, 2020; Jurado-Martín et al., 2021). Podemos citar por exemplo, as fímbrias e cápsulas de polissacarídeos que atuam na aderência ao epitélio respiratório, traqueal e as endotoxinas que resultam em febre, choque, oligúria, leucopenia ou leucocitose, coagulação intravascular disseminada e anormalidades metabólicas como a inibição da síntese proteica (Jurado-Martín, 2021).

Algumas enzimas produzidas por esse microrganismo também possuem grande potencial de causar danos no hospedeiro. A elastase provoca uma lesão do tecido vascular e inibe a função dos neutrófilos. A protease alcalina pode causar lesão tecidual, inativação da IgG e inibição da função dos neutrófilos. A fosfolipase C produz uma lesão tecidual e a leucocidina, produz uma inibição da função dos neutrófilos e linfócitos (De Souza et al., 2021).

Considerado também um fator de virulência, os biofilmes consistem em um aglomerado de células microbianas aderidas em uma superfície, envolvidas por uma matriz de exopolissacarídeos (EPS). Alguns elementos, como substrato, meio de cultura, pH, temperatura e características da célula bacteriana favorecem essa adesão inicial. Além destes, devem ser considerados fatores como hidrofobicidade, rugosidade superficial, motilidade, presença de pili, flagelos e produção de EPS (Hadadi-Fishani et al., 2020; Jurado-Martín et al., 2021).

Os três tipos distintos de motilidade em *P. aeruginosa* são swimming, swarming, e twitching. A motilidade Swarming é uma adaptação complexa e multicelular usada para translocação de superfície. As características gerais dessa motilidade incluem a necessidade de flagelos, a produção de um surfactante (ramnolipídios) e o alongamento das células. A fixação flagelar é importante no estabelecimento inicial do biofilme, enquanto o mecanismo de motilidade está associado à dispersão nas etapas finais do biofilme (Tuon et al., 2022; Coleman et al., 2021). Há relatos também de que a motilidade Swarming favorece a superexpressão de vários fatores de virulência, sugerindo que esta ação pode estar ligado à virulência (Coleman et al., 2021; Cai et al., 2020; Sultan et al., 2021).

A formação de biofilme por *P. aeruginosa* é bastante comum em pacientes que requerem auxílio de dispositivos invasivos durante internações, como cateter vesical, cateter venoso central e principalmente pacientes que fazem uso de ventilação mecânica em unidades de terapia intensiva (UTI). Os biofilmes constituem um mecanismo de proteção dos microrganismos, uma vez que impossibilita penetração de antimicrobianos na sua matriz extracelular e impedem a ação do sistema imunológico do hospedeiro (Katharios et al., 2021). A capacidade de adesão a dispositivos invasivos pode acontecer de forma rápida e a formação dos biofilmes pode ser estabelecida em poucas horas. Desta forma, a presença dessa característica em isolados de *P. aeruginosa* contribui para as Infecções Relacionadas a Assistência em Saúde (IRAS) em pacientes diagnosticados com SARS-CoV-2 (Covid-19) (Jurado-Martín et al., 2021).

A Covid-19, doença infecciosa causada pelo vírus SARS-CoV-2, foi declarada pandemia de nível mundial pela World Health Organization (WHO) em março de 2020. Seus sintomas mais comuns se assemelham a sintomas gripais, como hipertermia, mialgia, anosmia, cefaleia, tosse seca, podendo evoluir em casos graves com desconforto

respiratório pelo comprometimento pulmonar e demais órgãos vitais necessitando assim, de suporte intensivo.

Seus sintomas vão desde leves a moderados, entretanto, alguns pacientes podem evoluir para a forma grave da doença, sendo necessário cuidados hospitalares. De acordo com a WHO (2023), a doença causou quase 15 milhões de mortes desde o início da pandemia. Desta forma, pacientes com Covid-19 se tornam grandes alvos para infecções secundárias por *P. aeruginosa*, uma vez que apresentam sistema imunológico comprometido, e estão expostos à diversos dispositivos invasivos (Balbi et al., 2021; Tauffer et al., 2021).

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi identificar e caracterizar *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de pacientes infectados ou não com SARS-CoV-2 em um hospital universitário e realizar uma comparação genotípica e fenotípica das estirpes. Desta forma, espera-se contribuir para melhor entendimento em relação a epidemiologia, gerenciamento, tratamento e prevenção de infecções hospitalares envolvendo esse microrganismo.

2 Materiais e Métodos

2.1 Aspectos éticos e tipo de estudo

Trata-se de um estudo prospectivo, observacional e epidemiológico. Este estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do referido Hospital e da Universidade do Oeste Paulista, respeitando a Resolução nº 196/96 sobre pesquisas envolvendo seres humanos e foi aprovado com protocolo CAAE 39598620.6.0000.5515. Todos os participantes e/ou responsáveis foram convidados a assinar o Termo de Assentimento/Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Isolados de *P. aeruginosa* foram gentilmente doadas e utilizadas de acordo com a rotina padrão de coletas. Os pacientes não foram submetidos a nenhum procedimento de coleta exclusivamente para o estudo.

A assinatura do TCLE foi realizada apenas após confirmação da amostra positiva pelo laboratório. Os pesquisadores entraram em contato com o paciente/responsável para assinatura.

2.2 Coleta das amostras

P. aeruginosa coletadas no período de janeiro a dezembro de 2021 foram gentilmente doadas pelo laboratório de Análises Clínicas do Hospital Regional – Presidente Prudente – SP para o desenvolvimento deste estudo, de acordo com a rotina normal das coletas. Os pacientes não foram submetidos a nenhum procedimento de coleta exclusivamente para o projeto. A autorização para utilização destas bactérias foram acordadas com os responsáveis pelo laboratório e a assinatura do TCLE foi realizada apenas após confirmação da amostra

positiva pelo laboratório. *P. aeruginosa* foram isoladas de acordo com os métodos microbiológicos clínicos padrão utilizando Kit de Identificação de Bacilos Gram-negativos não Fermentadores de Glicose por placa de microtitulação com 19 provas. Os isolados previamente identificados foram conduzidos até o laboratório de microbiologia da Universidade do Oeste Paulista em caldo Brain Heart Infusion Broth (BHI) sob refrigeração. Os isolados foram inoculados em caldo BHI suplementado com glicerol a 20% e armazenados a -20°C até o momento da realização dos outros testes propostos.

A partir dos isolados de *P. aeruginosa* obtidos no laboratório, coletou-se os dados demográficos (Sexo, Idade, Profissão, Escolaridade) e clínicos/hospitalares (Causa da internação, Local de internação, Duração da hospitalização, Tempo de antibioticoterapia, Necessidade de suporte intensivo, Tempo de ventilação mecânica, Co-infecções, Cirurgias e procedimentos invasivos, Necessidade de Transfusão sanguínea, Alergia medicamentosa, Comorbidades, Positividade para SARS-CoV-2, Desfecho, Reinternação após 12 meses do paciente).

2.3 Critérios de inclusão e exclusão

Qualquer tipo de amostra clínica como por exemplo; urina, fezes, líquor, escarro e sangue que tenham sido avaliadas pelo laboratório de análises clínicas do Hospital Universitário de Presidente Prudente-SP e tenham a presença confirmada para *P. aeruginosa* foram aptas a serem incluídas no estudo, desde que o paciente ou seu responsável tenham consentido a sua participação. Foram consideradas amostras de pacientes adultos entre 18 a 85 anos de idade em qualquer unidade de internação do Hospital.

As amostras clínicas recebidas pelo laboratório de análises clínicas do Hospital Universitário de Presidente Prudente-SP, que tiveram ausência de *P. aeruginosa* ou tenham sido positivas exclusivamente para outros microrganismos foram excluídas do trabalho.

2.4 Caracterização fenotípica de *P. aeruginosa*

2.4.1 Produção de Lipases

A produção de lipases foi determinada segundo o método utilizado por Zha e colaboradores (2021). Os isolados foram inoculados em Tryptic Soy Agar (TSA) enriquecido com 1% Tween 80, e incubados a 37°C, durante 24 horas. A formação de um halo turvo em torno da zona de crescimento foi considerada positiva para a produção de lipases.

2.4.2 Produção de Fosfolipase C

Para determinar a produção de fosfolipase C, foi utilizado o mesmo método que Olofinsae e colaboradores (2022) com modificações. Os isolados foram inoculados em spots em placas contendo meio de cultivo TSA enriquecido com 10% (vol/vol) de solução de gema

de ovo com telurito. As placas foram incubadas em estufa por 24 horas à 37°C. A produção de um precipitado negro sobre a zona de crescimento foi considerada positivo para redução de fosfolipase C.

2.4.3 Ensaio de quantificação de Piocianina

Após incubação durante a noite a 37°C, foram adicionados 3mL de clorofórmio a 5mL de sobrenadante da cultura e misturados vigorosamente. Um mililitro de ácido clorídrico 0,2M foi adicionado à camada orgânica e a absorvância foi medida a 520nm. A concentração de piocianina (mg/L) foi calculada como: P (Piocianina) = DO (Densidade óptica) \times 17,072 \times (5/3) onde DO é a densidade óptica a 520nm, 17,072 é o coeficiente de extinção de piocianina e 5/3 é o fator de diluição. Três experimentos independentes foram realizados para cada isolado (Persyn et al., 2019).

2.4.4 Ensaio de motilidade Swarming

A avaliação da motilidade Swarming foi avaliada conforme o método descrito por Yamada (2020). Foi preparado ágar Swarming (glicose 1%, peptona 0,5%, extrato de levedura 0,2% e ágar 0,5%) e um volume de 10 μ L das suspensões bacterianas crescidas em caldo BHI foi inoculado no centro das placas e incubado a 30°C por 24 horas. Foram calculadas as médias dos diâmetros (d) de crescimento e categorizadas segundo Abdouchackour et al. (2018) como: não ou fracamente móvel ($d < 20\text{mm}$); moderadamente móvel ($20\text{mm} \leq d < 40\text{mm}$); e altamente móvel ($d \geq 40\text{mm}$).

2.4.5 Ensaio de motilidade Swimming

A avaliação da motilidade Swimming foi avaliada conforme o método descrito por Yamada (2020) com modificações. Foi preparado ágar Swimming (triptona 1%, cloreto de sódio 0,5% e ágar 0,3%) e um volume de 10 μ L das suspensões bacterianas crescidas em caldo BHI foi inoculado no centro das placas e incubado a 30°C por 24 horas. Foram calculadas as médias dos diâmetros de crescimento e categorizadas segundo Abdouchackour et al. (2018) como: não ou fracamente móvel ($d < 20\text{mm}$); moderadamente móvel ($20\text{mm} \leq d < 40\text{mm}$); e altamente móvel ($d \geq 40\text{mm}$).

2.4.6 Ensaio de motilidade Twitching

Colônias únicas foram inoculadas no fundo de uma placa de ágar Luria Bertani (ALB) a 1%. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C. O ágar foi removido cuidadosamente após a incubação e as bactérias aderentes coradas com corante violeta de cristal, seguidas de lavagem com água da torneira para remover o corante não ligado. As áreas da zona de contração foram medidas (Persyn et al., 2019).

Foram calculadas as médias dos diâmetros de crescimento e categorizados conforme Wolska and Kot (2013): não móvel ($d < 7\text{mm}$); fracamente móvel ($d 7\text{-}15\text{mm}$); moderadamente móvel ($d 15\text{-}25\text{mm}$); e altamente móvel ($d > 25\text{mm}$).

2.4.7 Avaliação da formação de biofilmes

Os isolados de *P. aeruginosa* foram cultivados em caldo BHI a 37°C por 24 horas. As culturas foram ajustadas por meio de espectrofotometria a 600nm para o valor 0,1. Alíquotas de $20\mu\text{L}$ da suspensão de células de cada isolado foram adicionadas a $200\mu\text{L}$ de caldo BHI presente nas cavidades das microplacas de 96 poços, em seguida foram incubadas a 37°C por 24 horas. As placas foram, então, lavadas três vezes com solução salina 0,9% (m/v) para remoção das células não aderidas. As células aderidas foram coradas com $200\mu\text{L}$ de cristal violeta 0,1% (m/v) por 5 minutos. O corante foi removido, a microplaca lavada novamente três vezes e, após secagem por 30 minutos em estufa, foi realizada a solubilização do corante com solução de álcool/acetona (80:20). As densidades ópticas da solução foram lidas em comprimento de onda de 595nm . O valor encontrado foi representativo para a adesão de células bacterianas. A densidade óptica média (DO) do controle negativo (DOc) foi utilizada como ponto de corte. Os isolados foram classificados em: $\text{DO} \leq \text{DOc}$ Não aderente; $\text{DOc} < \text{DO} \leq 2\text{x DOc}$ fraca aderência; $2\text{x DOc} < \text{DO} \leq 4\text{x DOc}$ moderada aderência; $4\text{x DOc} < \text{DO}$ forte aderência (Mohamed et al., 2022).

2.4.8 Técnica de disco-difusão dos antimicrobianos em Ágar

O teste de sensibilidade aos antimicrobianos foi realizado pela técnica da difusão do antimicrobiano em Ágar Muller-Hinton conforme recomendado pelo Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) (2019).

Foram utilizadas colônias recentemente crescidas em ágar sólido para preparação de inóculo microbiano na escala 0,5 de McFarland em salina. Uma vez ajustada a densidade do inóculo, a semeadura foi feita por meio de swab estéril na superfície de Ágar Mueller Hinton, e a seguir aplicados os discos impregnados com os antimicrobianos. As placas foram incubadas a temperatura de 35°C por 24 horas. A atividade do antimicrobiano foi avaliada pelo diâmetro do halo de inibição do crescimento e em seguida interpretado com base nas normas estabelecidas pelo CLSI (CLSI, 2019). As informações mais atualizadas para seleção de drogas, interpretação e controle de qualidade também levou em consideração os breakpoints do suplemento M100 (CLSI, 2020).

Os antimicrobianos avaliados foram: Aminoglicosídeos ($30\mu\text{g}/\text{Amicacina}$, $10\mu\text{g}/\text{Gentamicina}$); - Penicilinas antipseudomonas ($110\mu\text{g}/\text{Piperacilina}$ associado ao Tazobactam); - Cefalosporinas de terceira geração ($30\mu\text{g}/\text{Ceftazidima}$); - Cefalosporinas de quarta geração ($30\mu\text{g}/\text{Cefepima}$); - Carbapenêmicos ($10\mu\text{g}/\text{Iminpinem}$, $10\mu\text{g}/\text{Meropenem}$); -

Monobactâmicos (30µg/Aztreonam); - Fluoroquinolonas de segunda geração (5µg/Ciprofloxacino); - Fluoroquinolonas de terceira geração (5µg/Levofloxacino) (CLSI, 2019).

O índice de múltipla resistência a antimicrobianos (índice MAR) foi calculado a partir do número de antimicrobianos ao qual determinado isolado foi resistente sobre o número total testado. Índice MAR acima de 0,2 caracteriza multirresistência (Olofinsae, Adeleke, Ibeh, 2022).

2.5 Caracterização genotípica de *P. Aeruginosa*

2.5.1 Caracterização molecular dos fatores de virulência e dos genes que codificam metalo-β-lactamases em *P. aeruginosa*

As amostras foram cultivadas em caldo de BHI a 37°C por 24 horas. Após este procedimento, o ácido desoxirribonucleico (DNA) das amostras foram extraídos pelo método do fenol-clorofórmio (Sambrook and Russell 2001). O DNA foi quantificado e avaliado quanto a sua integridade e pureza por espectrofotometria 260/280nm e eletroforese em gel de agarose.

A Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) para caracterização molecular dos fatores de virulência foi realizada utilizando-se iniciadores específicos para os genes conforme determinado na Tabela 1.

Tabela 1. Iniciadores utilizados para a determinação dos fatores de virulência em *P. aeruginosa* segundo Lanotte *et al.* (2004) e Lomholt *et al.* (2001).

Gene	Sequência de Nucleotídeos (5'- 3')	Tamanho Amplificon (pb)	Função
<i>exoS</i>	F 5'- GAT GGC GCT TGG TCT CTA C -3' R 5'- CAC TAC CTG TTC AGC CTG TC -3'	148	Produção da exoenzima S
<i>exo</i>	F 5'- CTG CCG CCG AGA TCA AG -3' R 5'- CCT CTC CGC TGT CAA AGT C -3'	101	Produção da exoenzima T
<i>toxA</i>	F 5'- CTG CTG CGG GTC TAT GTG -3' R 5'- GAT CAG CCG TTC GAC CTC -3'	102	Produção de exotoxina
<i>akgO</i>	5'- TGA TCA ACC AGG GCA AGT C -3' 5'- CAG GTC GCC GTT CTT CTT -3'	170	Produção de alginate
<i>pclH</i>	5'- CTC CAG GAG CAG AAC AAC TAC -3' 5'- GCT GGC GTG GTC ATA GAA -3'	330	Produção de fosfolipase H
<i>plcN</i>	5'- GCC TAT CAC TGC TCG TTC C -3' 5'- GAG AAG TTG TCG GCC ATG T -3'	221	Produção de fosfolipase N
<i>aprA</i>	F5'-GTCCTATACCGTCGACCAGGC-3'), R (5'-GTCGCTACCCGAGCCGCCGAT-3'	928	Produção de protease alcalina
<i>lasA</i>	F 5'- CGCCATCCAACCTGATGCAAT-3'), R (5'-AGGCCGGGGTTGTACAACGGA-3	514	Produção de elastase A
<i>lasB</i>	F (5'- GGAATGAACGAAGCGTTCTC-3'), R (5'-GGTCCAGTAGTAGCGTTGG-3'),	300	Produção de elastase B

A detecção dos diferentes genes de resistência *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}* e *bla_{SPM}* relacionados com produção da metalo- β -lactamase também foi realizada em todos os isolados de *P. aeruginosa*. As sequências dos iniciadores estão demonstradas na Tabela 2.

Tabela 2. Iniciadores utilizados para a determinação dos genes que codificam metalo- β -lactamase segundo Dogonchi *et al.* (2018)

Gene	Sequência de Nucleotídeos (5'-3')	Tamanho Amplificon (pb)
<i>bla_{IMP}</i>	F: GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC R: GGTTTAAAYAAAACAACCACC	232
<i>bla_{VIM}</i>	F: GATGGTGTGTTGGTTCGCATA R: CGAATGCGCAGCACCAG	390
<i>bla_{SPM}</i>	F: AAAATCTGGGTACGCAAACG R: ACATTATCCGCTGGAACAGG	271

O volume total da reação de 10 μ L foi composto de 2 μ L de DNA (100ng/ μ l), 6 μ L da mistura de reação Taq Master Mix Red (Ampliqon) e 1 μ L de cada primer (reverse e forward) com concentração final de 0,10 μ M. O protocolo de amplificação consistiu em uma etapa inicial de 94°C por 30 segundos, seguida de 30 ciclos de repetições com desnaturação de 94°C por 30 segundos, anelamento (diferente para cada primer) por 30 segundos e extensão a 72 °C por 2 minutos.

A presença e ausência dos genes foram avaliadas por meio da visualização dos produtos da PCR. As amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1%, em seguida foram identificadas mediante incubação em solução de brometo de etídio e visualizados em transluminador de luz Ultravioleta (UV). Para registro, os géis foram fotografados em fotodocumentador. *P. aeruginosa* cepa P1088 produtora de SPM, *A. baumannii* cepa 17-4 produtora IMP-1 e *P. aeruginosa* produtora VIM foram usados como controles Melato- β -Lactamase (MBL) positivos. *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *Escherichia coli* ATCC 25922 foram utilizadas como controle positivo e negativo, respectivamente para avaliação dos genes de virulência.

2.6 Análises dos dados

Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados finais foram submetidos à análise estatística. Para análise estatística, utilizou-se o teste do qui-quadrado e o teste t respectivamente, para comparação dos resultados de variáveis qualitativas e quantitativas encontradas para os isolados de *P. aeruginosa* obtidos em pacientes infectados ou não com SARS-CoV-2. Os dados foram analisados com o software Prism, considerando um nível de significância de 0,05.

3 Resultados

Durante o período de coleta foi possível obter um total de 100 isolados de *P. aeruginosa*, sendo estas, 58 obtidas de paciente infectados com SARS-CoV-2 e 42 isoladas de pacientes não infectados ($p < 0,05$) (Figura 1).

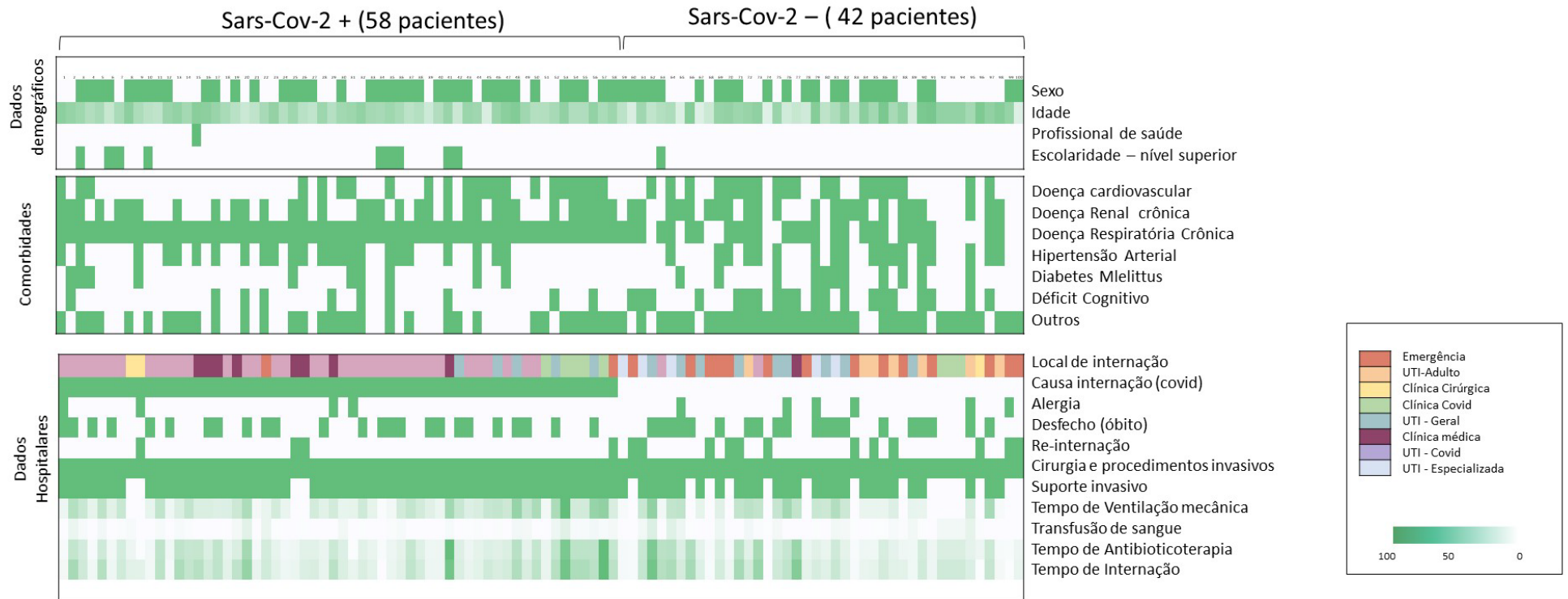


Figura 1. Visão geral das características do paciente, comorbidades, dados demográficos e hospitalares de pacientes Sars-Cov-2 + e Sars-Cov-2 -

A média de idade dos dois grupos de pacientes foi semelhante (55 anos). Entretanto, foi observada uma maior frequência de pacientes infectados com SARS-CoV-2 na faixa etária de 40-60 anos ($p < 0,05$) e uma distribuição mais homogênea para pacientes não infectados com SARS-CoV-2. No grupo infectado por SARS-CoV-2 foi observada uma maior população de homens ($p < 0,05$). O nível de escolaridade superior foi significativamente maior em pacientes contaminados com *P. aeruginosa* e SARS-CoV-2 ($p < 0,05$). Contudo, esse fato não está vinculado à profissões da área da saúde uma vez que os valores foram semelhantes tanto nos dois grupos de pacientes.

Tabela 3. Dados demográficos dos pacientes com cultura positiva para *P. aeruginosa* infectados ou não com SARS-CoV-2

Aspectos demográficos	Infectados com SARS-CoV-2 (n=58) (%)	Não infectados com SARS-CoV-2 (n=42) (%)	Valor de p
Média idade	55,4 ± 12,5	55,3 ± 20,53	0,886
0-20 anos	0 (0)	3 (7,1)	0,007*
20-40 anos	8 (13,79)	9 (21,42)	0,132
40-60 anos	27 (46,55)	9 (21,42)	0,001*
60-80 anos	23 (39,65)	17 (40,7)	0,772
80-100 anos	0 (0)	4 (9,5)	0,002*
Sexo (razão feminino:masculino)	20:38*	19:23	1,16 X 10 ⁻⁵
Escolaridade			
Nível superior completo	9 (15,5)	1 (1,7)	0,001*
Trabalho			
Profissional de saúde	1 (2,38)	0 (0)	0,155

*resultados estatisticamente diferentes com $p < 0,05$ pelo teste do qui-quadrado

Foi possível observar diferenças no período de isolamento de *P. aeruginosa*. Em pacientes infectados por SARS-CoV-2 foi observada um maior número de isolados no mês de maio e junho, enquanto que os pacientes não infectados apresentou maior número de isolamento em dezembro ($p < 0,05$) (Figura 2A).

Conforme apresentado na figura 2B, pacientes com culturas positivas para *P. aeruginosa* e infectados por SARS-CoV-2 apresentaram maior frequência de doenças respiratórias crônicas ($p < 0,05$) enquanto que nos pacientes negativados foi mais frequente o déficit cognitivo e outras comorbidades variadas como fratura óssea, úlcera de estresse, infecções de pele, entre outras ($p < 0,05$). Não foram observadas diferenças significativas em

relação ao desfecho dos pacientes, sendo observado cerca de 45% de óbito. O período de hospitalização também foi aproximado nos dois grupos com cerca de 40 dias em cada grupo.

A maior parcela de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes SARS-CoV-2 positivo foi obtida na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) Covid (66%) enquanto que, os pacientes SARS-CoV-2 negativo o microrganismo foi mais comumente isolado no setor Emergência (33%) ($p < 0,05$) (Figura 2C). Apenas os setores de clínica cirúrgica e clínica covid apresentaram valores semelhantes para o número de isolados de *P. aeruginosa*. A ventilação mecânica foi necessária em cerca de 93% dos pacientes infectados com SARS-CoV-2 e com cultura positivas para *P. aeruginosa*, enquanto, que pacientes não infectados por SARS-CoV-2 foi observado um valor de 64% ($p < 0,05$). O tempo de ventilação mecânica também foi significativamente maior nos pacientes infectados por SARS-CoV-2 ($p < 0,05$) (Figura 2D).

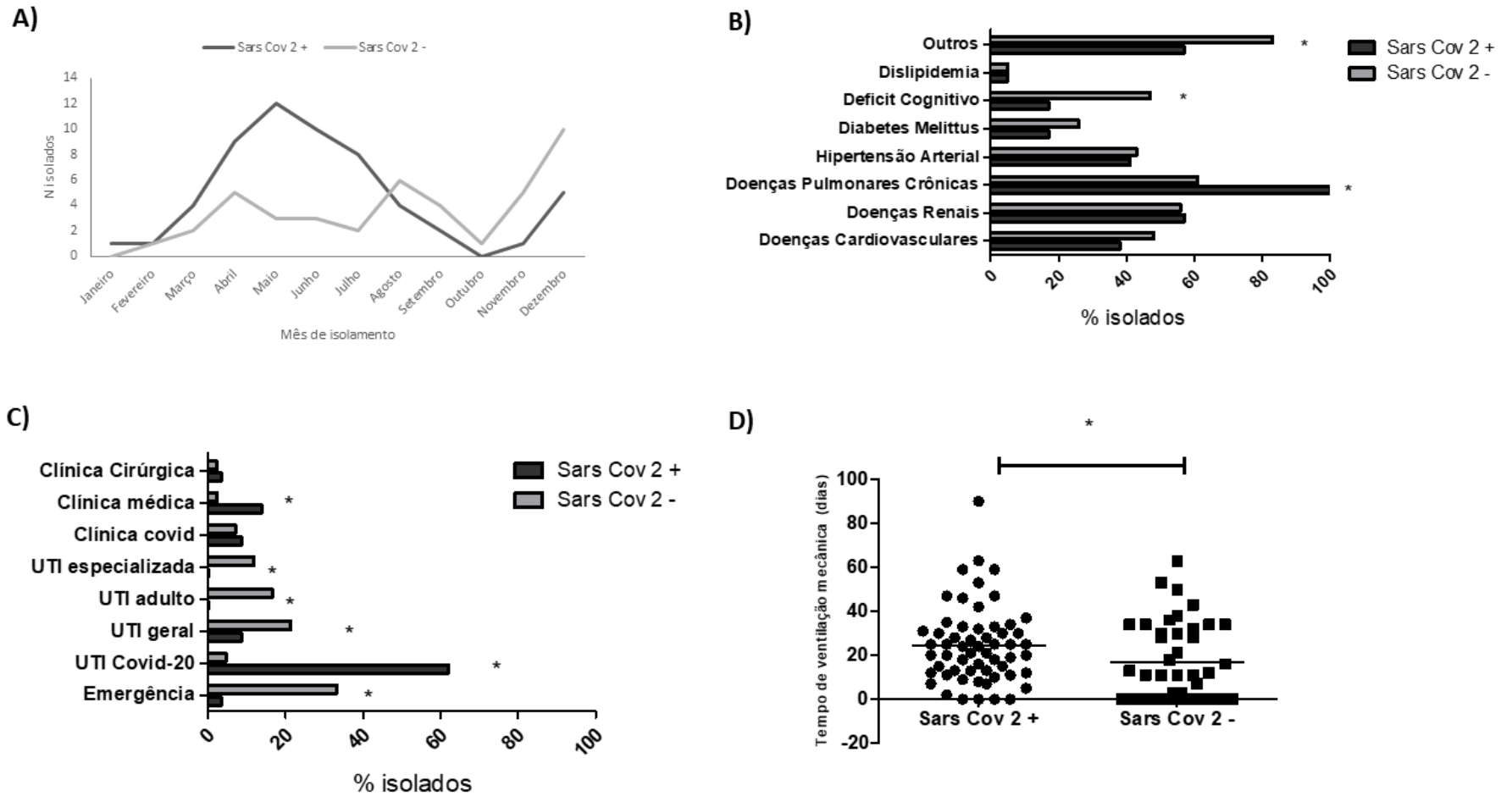


Figura 2. Dados hospitalares dos pacientes SARS-CoV-2 positivo e negativo com cultura positiva para *P. aeruginosa*: A) Distribuição anual do número de isolados B) Principais comorbidades dos pacientes C) Local de internação do paciente D) Tempo de ventilação mecânica do paciente *resultados estatisticamente diferentes com $p < 0,05$

Foi observada uma maior prevalência de *P. aeruginosa* em amostras de secreção traqueal para pacientes infectados por SARS-CoV-2 ($p < 0,05$). Amostras de urina positivas foi significativamente maior em pacientes sem SARS-CoV-2 ($p < 0,05$) (Figura 3A). A presença de infecções secundárias bacterianas por outras espécies além da *P. aeruginosa* foi observada em mais de 70% dos pacientes, com uma frequência semelhante nos dois grupos. Entretanto, foi notado uma maior presença de microrganismo do grupo *Staphylococcus* spp. em pacientes não infectados por SARS-CoV-2 ($p < 0,05$).

Dentre os 10 antibióticos avaliados, apenas aztreonam apresentou maior nível de resistência em isolados obtidos de pacientes com SARS-CoV-2 ($p < 0,05$) (Figura 3C). A multirresistência foi semelhante nos dois grupos e estava presente em cerca de 60% dos isolados, sendo observados três isolados resistentes a até todos os antibióticos.

Não foram notadas diferenças no tempo de antibioticoterapia (cerca de 30 dias) e número de doses administradas por paciente (cerca de 180 doses) entre os dois grupos. Entretanto, pacientes infectados com SARS-CoV-2 utilizaram uma diversidade maior de antibióticos ($p < 0,05$) (Figura 3D).

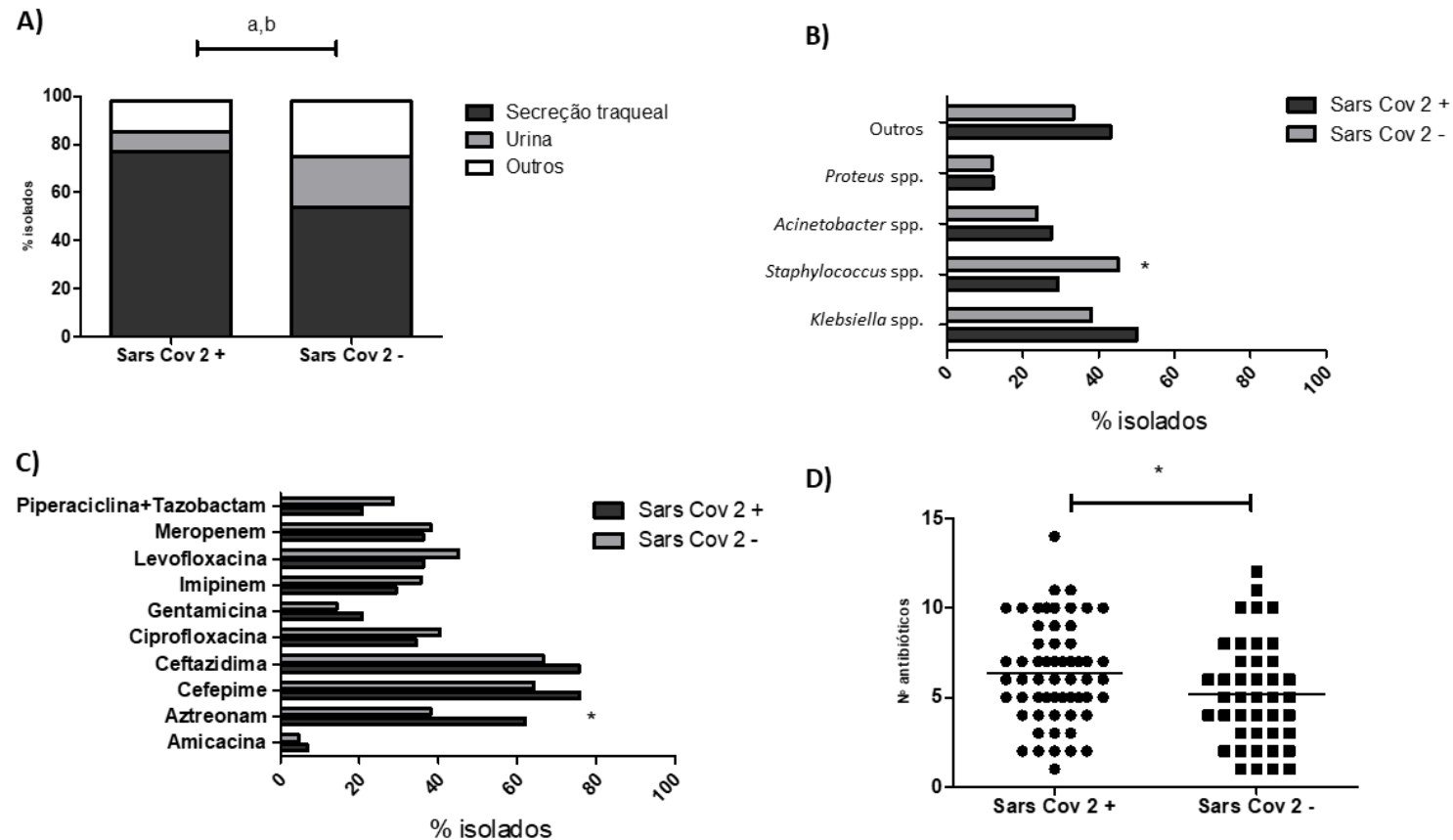


Figura 3. Dados hospitalares dos pacientes SARS-CoV-2 positivo e negativo com cultura positiva para *P. aeruginosa*: A) Tipo de amostras B) Espécies bacterianas em co-infecção com *P. aeruginosa* C) Nível de resistência a antimicrobiano D) N° antibióticos utilizados

*resultados estatisticamente diferentes ($p < 0,05$)

^a resultados estatisticamente diferentes em relação a secreção traqueal ($p < 0,05$)

^b resultados estatisticamente diferentes em relação a urina ($p < 0,05$)

O perfil fenotípico de *P. aeruginosa* demonstrou que a produção de piocianina (cerca de 8mg/L) e lipase (cerca de 65%) foram semelhantes nos dois grupos. Entretanto, a produção de fosfolipase C foi significativamente maior nos isolados obtidos de pacientes infectados com SARS-CoV-2, apresentando uma positividade em cerca de 57% das amostras ($p < 0,05$).

Fraca motilidade estava presente em maior proporção em *P. aeruginosa* obtidas dos pacientes não infectados com SARS-CoV-2, quando avaliadas pelo teste de motilidade tipo Swarming (SWA) ($p < 0,05$) (Figura 4A). Não foram observadas diferenças entre os dois grupos na avaliação da motilidade tipo Swimming (SWI) e Twitching (TWI).

No ensaio para formação de biofilmes pela técnica do cristal violeta foi observado uma maior porcentagem de isolados forte aderentes nos pacientes infectados com SARS-CoV-2 ($p < 0,05$) (Figura 4B).

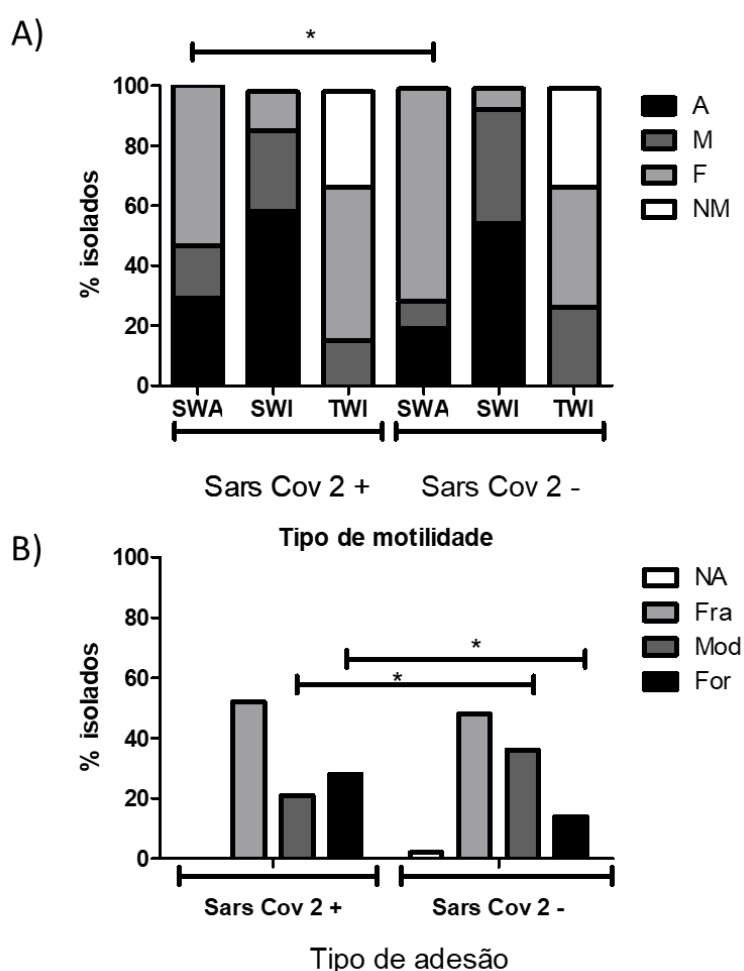


Figura 4. Dados laboratoriais do fenótipo de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes SARS-CoV-2 positivo e negativo: A) ensaios de motilidade tipos Swarming (SWA), Swimming (SWI) e Twitching (TWI) com a classificação: A - altamente móvel, M - moderadamente móvel, F - Fracamente móvel e NM - Não móvel B) Ensaio de formação de biofilme com classificação: For - forte, Mod - moderado, Fra - fraca e NA - não aderente.

*resultados estatisticamente diferentes ($p < 0,05$)

Conforme apresentado na tabela 4, foi realizada pesquisa de genes vinculados a fatores de virulência em *P. aeruginosa*. Todos os genes estavam presentes em pelo menos 70% dos isolados de ambos os grupos, sem diferenças significativas. Todos os isolados apresentaram pelo menos 1 genes de virulência e 58% dos isolados apresentaram todos os genes de fatores de virulência estudados.

Tabela 4. Resultados da amplificação dos genes de virulência e genes para a produção de metalo- β -lactamase de isolados de *P. aeruginosa* em relação a pacientes com cultura positiva para *P. aeruginosa* infectados ou não com SARS-CoV-2

Presença de Genes	Infectados com SARS-CoV-2 (n=58) (%)	Não infectados com SARS-CoV-2 (n=42) (%)	Valor de p
Fatores de virulência			
<i>exoS</i>	47 (81,0)	30 (71,4)	0,097
<i>Exo</i>	53 (91,4)	39 (92,8)	0,797
<i>toxA</i>	49 (84,4)	34 (80,9)	0,461
<i>akgO</i>	54 (93,1)	38 (90,5)	0,446
<i>pclH</i>	56 (96,5)	40 (95,2)	0,733
<i>plcN</i>	53 (91,4)	38 (90,5)	0,809
<i>aprA</i>	53 (91,4)	37 (88,1)	0,488
<i>lasA</i>	54 (93,1)	40 (95,3)	0,551
<i>lasB</i>	51 (87,9)	40 (95,3)	0,075
Produção de metalo β -lactamase			
<i>bla_{IMP}</i>	01 (1,72)	00 (00,0)	0,155
<i>bla_{VIM}</i>	01 (1,72)	01 (2,38)	0,650
<i>bla_{SPM}</i>	01 (1,72)	01 (2,38)	0,650

*resultados estatisticamente diferentes com $p < 0,05$

O resultado da amplificação de genes que codificam metalo- β -lactamase refere-se à capacidade de resistência dos isolados em relação a antimicrobianos beta-lactâmicos. Foi observado apenas três isolados obtidos de pacientes infectados com SARS-CoV-2 com presença de um gene cada (tabela 4).

4 Discussão

O estudo de microrganismos presentes no ambiente hospitalar é de extrema importância para a atividade clínica. O presente estudo foi realizado em 2021 quando houve um pico de isolamento de *P. aeruginosa* em pacientes SARS-CoV-2 em maio/junho. Esse fato vai de encontro com uma segunda onda de transmissão que se iniciou no verão, com rápido crescimento e predominância da variante Gama, atingindo seu ápice em abril de 2021, com valores muito altos de casos e óbitos de março a junho, alcançando picos de até 3 mil óbitos por dia (pela média móvel) (FIOCRUZ, 2022). A segunda onda da pandemia de COVID-19 foi mais agressiva no Brasil em comparação com outros países do mundo. Foi marcada pelo colapso do sistema de saúde e pela ocorrência de crises sanitárias localizadas, combinando deficiência de equipamentos, de insumos para UTI e esgotamento da força de trabalho da saúde (Fiocruz, 2022; Zeiser et al., 2022).

A internação devido a infecção por SARS-CoV-2, principalmente nas UTIs, predispõe a consequências indesejáveis, sendo uma das mais graves as Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) ou infecções secundárias (Khurana et al., 2022). Conforme demonstrado no presente estudo, *P. aeruginosa* tem se tornando um grande destaque neste aspecto, uma vez que foi observado número significativamente maior de isolados em pacientes infectados por SARS-CoV-2. Rhoades et al. (2021) relataram uma correlação positiva entre a carga de RNA do SARS-CoV-2 e o aumento da diversidade da microbioma nasal de pacientes com COVID-19 por espécies como *P. aeruginosa*. Esses dados sugerem que o ambiente inflamatório causado pela infecção por SARS-CoV-2 e a possível exposição ao ambiente hospitalar levam a uma expansão de patógenos bacterianos na cavidade nasal que podem contribuir para o aumento da incidência de infecções bacterianas secundárias.

É notado que condições como terapia com glicocorticoides, estado imunocomprometido, história de uso prolongado de antibióticos, diabetes, comorbidades cardiovasculares, atendimento em UTI, tratamento de ventilação, tempo prolongado de hospitalização e exacerbação dos sintomas podem estar associados a casos de co-infecção de SARS-CoV-2 com outros patógenos (Mussuza et al., 2021; He et al., 2022). No presente estudo foi observado uma maior porcentagem de *P. aeruginosa* em pacientes infectados por SARS-CoV-2 do sexo masculino. Dados epidemiológicos em diferentes partes do mundo indicaram uma maior morbidade e mortalidade por SARS-CoV-2 em pacientes do sexo masculino, além destes pacientes apresentarem uma demanda três vezes maior de internações em UTI (Peckham et al., 2020; Bwire et al., 2020; Pflugeisen; Mou et al., 2021).

A vulnerabilidade dos homens a esta doença pode ser explicada por diferenças nas características genéticas, imunológicas e comportamentais entre homens e mulheres. Fatores como: maior expressão da enzima conversora de angiotensina-2 (ACE2; receptores para coronavírus), diferenças impulsionadas por hormônio sexual e pelo cromossomo X. Além

disso, diferenças no estilo de vida, ou seja, maiores níveis de tabagismo e bebida são cruciais na evolução do paciente de acordo com o gênero (Bwire et al., 2020).

Langford et al., (2020) relataram que a co-infecção bacteriana e a infecção bacteriana secundária representam 3,5% e 14,3% dos pacientes com COVID-19, respectivamente. No presente estudo, mais de 70% dos pacientes avaliados apresentaram infecção secundária por outra espécie bacteriana além da *P. aeruginosa* como por exemplo, espécies do gênero *Proteus*, *Acinetobacter*, *Klebsiella* e *Staphylococcus*. Fato esse confirmado por He et al. (2022), o qual ressaltou que os patógenos bacterianos geralmente isolados de pacientes SARS-CoV-2 abrangem espécies como *M. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *H. influenzae*, *K. pneumoniae* e *S. Pneumoniae*. Apesar dos índices de infecções secundárias terem sido relativamente alto no presente estudo, não houveram diferenças significativas entre os dois grupos.

Foi observado também que a secreção traqueal foi o principal tipo de amostra com a presença de *P. aeruginosa* em pacientes infectados por SARS-CoV-2. Este tipo de amostra é comumente coletada e avaliada em pacientes com ventilador mecânico para investigar possíveis pneumonias, principalmente quando paciente apresenta sinais e sintomas como instabilidade hemodinâmica e/ou hipertermia (Rossi et al., 2021). Entretanto, o aumento da presença de *Staphylococcus* spp em pacientes não infectados por SARS-CoV-2 provavelmente, se deve ao tipo de amostras coletadas nesses pacientes, que em grande maioria foram urina. Espécies deste gênero pertencem a microbiota normal da pele, e principalmente região periuretral e genitais feminino e masculino. Desta forma, qualquer desequilíbrio da microbiota dessas regiões se torna suficiente para se multiplicarem rapidamente (Paudel et al., 2021).

Durante os estágios iniciais da pandemia de COVID-19, várias medidas de distanciamento social, juntamente com o aumento da adesão pública aos protocolos em Saúde Pública, redução de viagens e aumento da higiene das mãos podem ter contribuído para uma diminuição na propagação de microrganismos multirresistente (Kariyawasam et al., 2022). Entretanto, a incidência de multirresistência a antimicrobianos aumentou devido ao uso indiscriminado de antibióticos, tratamentos com corticosteroides e maior número de internações em UTIs por pacientes que necessitavam de ventilação mecânica invasiva (Gómez et al., 2022; Kariyawasam et al., 2022).

Tomczyk et al. (2021) relatou que cerca de 95% dos pacientes com COVID-19 receberam antimicrobianos prescritos antes ou durante a admissão no hospital. Especialmente no Brasil, durante a pandemia do vírus SARS-CoV-2 tratamentos precoce, e também os chamados de “kit covid” foram amplamente utilizados. Mesmo sem evidências científicas, diversas combinações de medicamentos como hidroxicloroquina associada a azitromicina e ivermectina foram prescritas de forma *off label* para tratamento e prevenção da

doença (Rasoul et al., 2020). Esse fato pode estar associado não apenas a alteração do perfil da microbiota dos pacientes, quanto também ao aumento da multirresistência e das infecções secundárias, conforme apresentados nos resultados.

No presente estudo, os isolados de pacientes infectados com SARS-CoV-2 apresentaram maior índice de resistência ao antimicrobiano aztreonam. Aztreonam, um antigo antibiótico β -lactâmico, não é hidrolisado por MBLs, é um agente terapêutico de primeira linha para o manejo da pneumonia grave (Mauri et al., 2021). Stefanini et al. (2021) avaliou o perfil de isolados bacterianos de pacientes COVID positivo e também observaram maior resistência à aztreonam (monobactam). Esse dado é bastante impactante na Saúde Pública visto que o Aztreonam é o único monobactam disponível com atividade intermediária contra *P. aeruginosa* e pode ser uma alternativa de associação útil aos aminoglicosídeos ou cefalosporina de terceira geração em pacientes com infecções graves por Gram-negativos (Kabic et al., 2023)

Os carbapenêmicos foram considerados os agentes β -lactâmicos mais eficazes e serviram como opção de tratamento de último recurso contra muitas infecções graves. No entanto, devido à existência de várias MBLs, como VIM, IMP e SPM a prevalência de organismos resistentes a carbapenêmicos aumentou, limitando assim as opções de tratamento. A maioria dos genes MBL está localizada em plasmídeos, o que facilita a transferência dos genes entre os microrganismos (Paul et al., 2020). No presente estudo foi obtido uma baixa porcentagem de genes associados a produção de MBLs em ambos os grupos de isolados avaliados. Possivelmente, as várias medidas de distanciamento social, higiene em vigor e o isolamento em tempos de pandemia, provavelmente tenham desfavorecido a transferência desses genes (Kariyawasam et al., 2022).

Não há relatos na literatura sobre o perfil de genes de virulência de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes infectados com SARS-CoV-2. Apesar das altas porcentagens de genes de virulência obtidas no presente estudo, assim como também observadas por Mapipa et al. (2021), Bogiel et al. (2023), não foi notado diferença entre os pacientes infectados ou não. Qu et al. (2022) analisaram a adaptação de dois isolados de *P. aeruginosa* obtidos de pacientes críticos com COVID-19. Naquele estudo foi observado uma formação excessiva de biofilme e redução de virulência. Entretanto, mais estudos são necessários para avaliar a relação dos genes de virulência de *P. aeruginosa* em pacientes infectados com SARS-CoV-2.

No presente estudo, mais de 90% das amostras com *P. aeruginosa* isoladas de pacientes SARS-CoV-2 necessitou de suporte ventilatório em UTI, apresentando também maior período de utilização. Por se tratar de um vírus que acomete o sistema respiratório, em casos graves a utilização de ventilação mecânica se torna fundamental (Peckham et al., 2020; Bwire et al., 2020; Pflugeisen; Mou et al., 2021). O uso de ventilação mecânica é considerado um dos principais suportes na UTI, entretanto, pode favorecer a infecção por microrganismos

oportunistas, conforme observado também no presente estudo (Bouglé et al., 2022).

Desta maneira, *P. aeruginosa* pode facilmente se alojar nos ventiladores mecânicos durante o período de sua utilização e isso favorece as infecções secundárias, além da sua persistência no ambiente (Dabbousi et al., 2022). No presente estudo a utilização da ventilação mecânica associada a um tempo prolongado e um mal prognóstico do paciente pode estar relacionado também ao fato de que houve uma maior porcentagem dos isolados de pacientes infectados com SARS-CoV-2 considerados fortes formadores de biofilmes.

A maior formação de biofilmes por *P. aeruginosa* nesses pacientes pode estar associado à alterações de alguns mecanismos envolvidos na formação de biofilme, como o sistema quorum sensing (QS) (genes *las* e *rhl*), e a superexpressão de c-di-GMP, molécula sinalizadora de nucleotídeo, conforme relatado por De Souza et al. (2021.) Além disso, os biofilmes possivelmente abrigam SARS-CoV-2. A proteção dos biofilmes pode impedir a ação de fármacos antivirais e ação do sistema imunológico do hospedeiro, e desta forma pode favorecer a permanência do vírus na forma latente no corpo, então, levar a lesões pulmonares cavitárias e testes positivos de PCR por longo prazo além de resultar em danos pulmonares crônicos, possivelmente associados a complicações pulmonares mais graves (He et al., 2022).

Associada a formação dos biofilmes, a produção de fosfolipase também parece ser um diferencial em *P. aeruginosa* isoladas de pacientes infectados com SARS-CoV-2. A fosfolipase C hidrolisam a fosfatidilcolina (o principal componente das membranas celulares) e o surfactante pulmonar, bem como outros fosfolipídios encontrados nas membranas eucarióticas. Desta forma, essas substâncias hidrolisadas fornece nutrientes para *P. aeruginosa* e ativa a formação de biofilmes; favorecendo sua permanência no paciente (Constantino-Teles et al., 2022; Monturiol-Gross et al., 2021).

5 Conclusão

Os dados do presente trabalho demonstraram que a pandemia de COVID-19 é um cenário favorável para o aumento de infecção secundária por *P. aeruginosa* devido ao aumento de pacientes internados em UTIs, necessidade de ventilação mecânica invasiva, uso de corticosteroides e expansão do tratamento empírico com a administração de diversos antibióticos de amplo espectro. As características observada aqui como forte formação de biofilmes, motilidade, multirresistência e produção de fosfolipase C favoreceram as altas taxas de infecções secundárias por *P. aeruginosa* em pacientes SARS-CoV-2. Estratégias baseadas em estudos epidemiológicos como esse, se tornam relevantes para que metas possam ser traçadas afim de reduzir taxas de infecções secundárias por *Pseudomonas aeruginosa* que resulta em internações mais longas na UTI e mortalidade intra-hospitalar.

Referências

- Abdouchakour, F., Aujoulat, F., Licznar-Fajardo, P., Marchandin, H., Toubiana, M., Parer, S., Lotthe, A. and Jumas-Bilak, E. (2018). Intracloal variations of resistance and phenotype in *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clone ST308: A key to success within a hospital?. *International Journal of Medical Microbiology*, **308**:279-289.
- Balbi, M., Conti, C., Imeri, G., Caroli, A., Surace, A., Corsi, A., Mercanzin, E., Arrigoni, A., Villa, G., Di Marco, F., Bonaffini, P.A. and Sironi, S. (2021). Post-discharge chest CT findings and pulmonary function tests in severe COVID-19 patients. *Eur J Radiol*. 2021 May; **138**:109676. doi: 10.1016/j.ejrad.2021.109676.
- Bogiel, T., Depka, D., Kruszewski, S., Rutkowska, A., Kanarek, P., Rzepka, M., Leitão, J.H., Deptuła, A., and Gospodarek-Komkowska, E. (2023). Comparison of Virulence-Factor-Encoding Genes and Genotype Distribution amongst Clinical *Pseudomonas aeruginosa* Strains. *Int J Mol Sci*. **24**(2):1269. doi: 10.3390/ijms24021269.
- Bouglé, A, Tuffet, S, Federici, L., Leone, M., Monsel, A., Dessalle, T., Amour, J., Dahyot-Fizelier, C., Barbier, F., Luyt, C. E., Langeron, O., Cholley, B., Pottecher, J., Hissem, T., Lefrant, J. Y., Veber, B., Legrand, M., Demoule, A., Kalfon, P., and Constantin, J. M., ... iDIAPASON Trial Investigators (2022). Comparison of 8 versus 15 days of antibiotic therapy for *Pseudomonas aeruginosa* ventilator-associated pneumonia in adults: a randomized, controlled, open-label trial. *Intensive Care Med*. **48**(7), 841–849. <https://doi.org/10.1007/s00134-022-06690-5>.
- Bwire, G.M. (2020). Coronavirus: Why Men are More Vulnerable to Covid-19 Than Women? *SN Compr Clin Med*. **2**(7):874-876. doi: 10.1007/s42399-020-00341-w.
- Cai, Y.M., Hutchin, A., Craddock, J., Walsh, M.A., Webb, J.S., and Tews, I. (2020). Differential impact on motility and biofilm dispersal of closely related phosphodiesterases in *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci Rep*. **10**(1):6232. doi: 10.1038/s41598-020-63008-5.
- Camus, L., Briaud, P., Vandenesch, F., Doléans-Jordheim, A., and Moreau, K. (2022). Mixed Populations and Co-Infection: *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *AdvExp Med Biol*. **1386**:397-424. doi: 10.1007/978-3-031-08491-1_15.
- CLSI. Clinical And Laboratory Standards Institute (2019). *Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing Supplement M100S*.
- CLSI. Clinical And Laboratory Standards Institute (2020). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, 30th ed.; CLSI supplement M100; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA.
- Coleman, S.R., Pletzer, D., and Hancock, R.E.W. (2021). Contribution of Swarming Motility to Dissemination in a *Pseudomonas aeruginosa* Murine Skin Abscess Infection Model. *J Infect Dis*. **224**(4):726-733. doi: 10.1093/infdis/jiaa778.
- Constantino-Teles, P., Jouault, A., Touqui, L., and Saliba, A.M. (2022). Role of Host and Bacterial Lipids in *Pseudomonas aeruginosa* Respiratory Infections. *Front Immunol*. **13**:931027. doi: 10.3389/fimmu.2022.931027.
- Dabbousi, A.A., Dabboussi, F., Hamze, M., Osman, M., and Kassem, I.I. (2022). The Emergence and Dissemination of Multidrug Resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Lebanon: Current Status and Challenges during the Economic Crisis. *Antibiotics (Basel)*. **11**(5):687. doi: 10.3390/antibiotics11050687.
- de Sousa, T., Hébraud, M., Dapkevicius, M.L.N.E., Maltez, L., Pereira, J.E., Capita, R.,

- Alonso-Calleja, C., Igrejas, G., and Poeta, P. (2021). Genomic and Metabolic Characteristics of the Pathogenicity in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Mol Sci.* **22**(23):12892. doi: 10.3390/ijms222312892.
- Dogonchi, A.A., Ghaemi, E.A., Ardebili, A., Yazdansetad, S., and Pournajaf, A. (2018). Metallo β -lactamase-mediated resistance among clinical carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in northern Iran: A potential threat to clinical therapeutics. *Tzu Chi Med J* **30**:90-96.
- Fiocruz (2022). *Boletim Observatório Covid-19*. Boletim Especial. Balanço de dois anos de pandemia Covid-19. Janeiro de 2020 a Janeiro de 2022. Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz.
https://portal.fiocruz.br/sites/portal.fiocruz.br/files/documentos_2/boletim_covid_2022-balanco_2_anos_pandemia-redb.pdf
- Gomez, S., Berger, E., Nicholl, M., Blanchard, P.K. and Hosseinzadeh, G. (2022). Luminous Suoernovae: Unveiling a Population between Superluminous and Normal Core-collapse Supernovae. *The Astrophysical Journal.* **941**(2). doi: 10.3847/1538-4357/ac9842.
- Hadadi-Fishani, M., Khaledi, A. and Fatemi-Nasab, Z.S. (2020). Correlation bet ween biofilm formation and antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: a meta-analysis. *Infez Med.***28**(1):47-54. PMID: 32172260.
- He, D., Fu, C., Ning, M., Hu, X., Li, S. and Chen, Y. (2022). Biofilms possibly harbor occult SARS-CoV-2 may explain lung cavity, re-positive and long-term positive results. *Front Cell Infect Microbiol.* **28**;12:971933. doi: 10.3389/fcimb.2022.971933.
- Jara, M.C., Frediani, A.V., Zehetmeyer, F.K., Bruhn, F.R.P., Müller, M.R., Miller, R.G. and Nascente, P.D.S. (2020). Multidrug-Resistant Hospital Bacteria: Epidemiological Factors and Susceptibility Profile. *Microb Drug Resist.* **27**(3):433-440. doi: 10.1089/mdr.2019.0209..
- Jernigan, J.A., Hatfield, K.M., Wolford, H., Nelson, R.E., Olubajo, B., Reddy, S.C., McCarthy, N., Paul, P., McDonald, L.C., Kallen, A., Fiore, A., Craig, M. and Baggs, J. (2020). Infecções bacterianas multirresistentes em pacientes hospitalizados nos EUA, 2012 - 2017. *N Engl J Med.* **382**(14):1309-1319. doi: 10.1056/NEJMoa1914433.
- Jurado-Martín, I., Sainz-Mejías, M., and McClean, S. (2021). *Pseudomonas aeruginosa*: AnAudaciousPathogenwithanAdaptable Arsenal ofVirulenceFactors. *Int J Mol Sci.* **22**(6):3128. doi: 10.3390/ijms22063128.
- Kabic, J., Fortunato, G., Vaz-Moreira, I., Kekic, D., Jovicevic, M., Pesovic, J., Ranin, L., Opavski, N., Manaia, CM., and Gajic, I. (2023). Dissemination of Metallo- β -Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa* in Serbian Hospital Settings: Expansion of ST235 and ST654 Clones. *Int J Mol Sci.* **24**(2):1519. doi: 10.3390/ijms24021519.
- Kariyawasam, R.M., Julien, D.A., Jelinski, D.C., Larose, S. L., Rennert-May, E., Conly, J. M., Dingle, T. C., Chen, J. Z., Tyrrell, G. J., Ronksley, P. E., and Barkema, H. W. (2022). Antimicrobial resistance (AMR) in COVID-19 patients: a systematic review and meta-analysis (November 2019–June 2021). *Antimicrob Resist Infect Control* **11**(1), 45. <https://doi.org/10.1186/s13756-022-01085-z>
- Katharios-Lanwermeyer, S., Whitfield, G.B., Howell, P.L., andO'Toole, G.A. (2021). *Pseudomonas aeruginosa* Uses c-di-GMP Phospho diesterases RmcA and MorATo Regulate Biofilm Maintenance. *mBio.* **12**(1):e03384-20. doi: 10.1128/mBio.03384-20.
- Khurana, S., Singh, P., Sharad, N., Kiro, V.V., Rastogi, N., Lathwal, A., Malhotra, R., Trikha, A., and Mathur, P. (2021). Profile of co-infections & secondary infections in COVID-19 patients at a dedicated COVID-19 facility of a tertiary care Indian hospital: Implication

- on antimicrobial resistance. *Indian J Med Microbiol.* **39**(2):147-153. doi: 10.1016/j.ijmmb.2020.10.014.
- Kwok, W.C., Ho, J.C.M., Tam, T.C.C., Ip, M.S.M., and Lam, D.C.L. (2021). Risk factors for *Pseudomonas aeruginosa* colonization in non-cystic fibrosis bronchiectasis and clinical implications. *Respir Res.* **22**(1):132. doi: 10.1186/s12931-021-01729-5.
- Langford, B. J., So, M., Raybardhan, S., Leung, V., Westwood, D., Macfadden, D. R., Soucy, J. R., and Daneman, N. (2020). Bacterial co-infection and secondary infection in patients with COVID-19: a living rapid review and meta-analysis. *Clin. Microbiol. Infect.* **26**, 1622–1629. doi: 10.1016/j.cmi.2020.07.016.
- Lanotte, P., Watt, S., Mereghetti, L., Dartiguelongue, N., Rastegarhari, A., Goudeau, A., and Quentin, R. (2004). Genetic features *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients compared with those of isolates from other origins. *J Med Microbiol.* **53**:73-81.
- Lomholt, J.Á., Poulsen, K., and Kilian, M. (2001). Epidemic population structure of *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for a clone that is pathogenic to the eye and that has a distinct combination of virulence factors. *Infect Immun.* **69**:6284- 6295
- Mapipa, Q., Digban, T.O., Nnolim, N.E. and Nwodo, U.U. (2021). Antibigram profile and virulence signatures of *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from selected agrestic hospital effluents. *Sci Rep* **11**, 11800. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91280-6>.
- Mauri, C., Maraolo, A.E., Di Bella, S., Luzzaro, F., and Principe, L. (2021). The Revival of Aztreonam in Combination with Avibactam against Metallo- β -Lactamase-Producing Gram-Negatives: A Systematic Review of In Vitro Studies and Clinical Cases. *Antibiotics (Basel)*. **10**(8):1012. doi: 10.3390/antibiotics10081012.
- Mohamed, H.M.A., Alnasser, S.M., Abd-Elhafeez, H.H., Alotaibi, M., Batiha, G.E., and Younis, W. (2022). Detection of β -Lactamase Resistance and Biofilm Genes in *Pseudomonas* Species Isolated from Chickens. *Microorganisms*. **10**(10):1975. doi: 10.3390/microorganisms10101975.
- Monturiol-Gross, L., Villalta-Romero, F., Flores-Díaz, M., and Alape-Girón, A. (2021). Bacterial phospholipases C with dual activity: phosphatidylcholinesterase and sphingomyelinase. *FEBS Open Bio.* **11**(12):3262-3275. doi: 10.1002/2211-5463.13320.
- Musuuz, J.S., Watson, L., Parmasad, V., Putman-Buehler, N., Christensen, L., and Safdar, N. (2021). Prevalência e resultados de coinfeção e superinfecção com SARS-CoV-2 e outros patógenos: uma revisão sistemática e meta-análise. *PLoS One.* **16**(5):e0251170. doi: 10.1371/journal.pone.0251170.
- Olofinsae, S.A., Adeleke, O.E., and Ibeh, B.O. (2022). Occurrence of *Pseudomonas lactis* and *Pseudomonas paralactis* Amongst Non-Lactose-Fermenting Bacterial Isolates in Chickens and Their Antimicrobial Resistance Patterns. *Microbiology Insights.* **15**. doi:10.1177/11786361221130313.
- Paudel, S., Bagale, K., Patel, S., Kooyers, N.J., and Kulkarni, R. (2021). Human Urine Alters Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Virulence and Transcriptome. *Appl Environ Microbiol.* **87**(16):e0074421. doi: 10.1128/AEM.00744-21.
- Paul, D., Chanda, D.D., Chakravarty, A., and Bhattacharjee, A. (2020). An insight into analysis and elimination of plasmids encoding metallo- β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Glob Antimicrob Resist.* **21**:3-7. doi: 10.1016/j.jgar.2019.09.002.
- Peckham, H., de Grujter, N.M., Raine, C., Radziszewska, A., Ciurtin, C., Wedderburn, L.R., Rosser, E.C., Webb, K., and Deakin, C.T. (2020) Male sex identified by global COVID-19 meta-analysis as a risk factor for death and ITU admission. *Nat. Commun.* **11**, 6317.

- doi:10.1038/s41467-020-19741-6.
- Persyn, E.; Sassi, M.; Aubry, M.; Broly, M.; Delanou S.; Asehnoune, K.; Caroff, N.; and Cremet, L. (2019). Rapid genetic and phenotypic changes in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains during ventilator-associated pneumonia. *Scientific reports*, **9**.
- Pflugeisen, B.M., and Mou, J. (2021). Gender Discrepancies in SARS-CoV-2 Pandemic Related Beliefs, Attitudes, and Practices. *Front Public Health*. 27;9:711460. doi: 10.3389/fpubh.2021.711460.
- Qu, J., Cai, Z., Duan, X., Zhang, H., Cheng, H., Han, S., Yu, K., Jiang, Z., Zhang, Y., Liu, Y., Bai, F., Liu, Y., Liu, L., and Yang, L. (2022). *Pseudomonas aeruginosa* modulates alginate biosynthesis and type VI secretion system in two critically ill COVID-19 patients. *Cell Biosci*. **12**(1):14. doi: 10.1186/s13578-022-00748-z.
- Rasoul, G. (2020). A framework for improving policy priorities in managing COVID-19 challenges in developing countries. *Front. Public Health*. **8**: 589681. doi: 10.3389/fpubh.2020.589681.
- Rhoades, N.S., Pinski, A., Monsibais, A.N., Jankeel, A., Doratt, B.M., Cinco, I.R., Ibraim, I., and Messaoudi, I. (2021). Acute SARS-CoV-2 infection is associated with an expansion of bacteria pathogens in the nose including *Pseudomonas aeruginosa*. *bioRxiv* [Preprint]. **20**:2021.05.20.445008. doi: 10.1101/2021.05.20.445008. Update in: *Cell Rep*. **36**(9):109637.
- Rossi, E., La Rosa, R., Bartell, J.A., Marvig, R. L., Haagensen, J. A. J., Sommer, L. M., Molin, S., and Johansen, H. K. (2021). *Pseudomonas aeruginosa* adaptation and evolution in patients with cystic fibrosis. *Nat Rev Microbiol* **19**:331–342. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00477-5>.
- Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001). *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 3rd ed., v. 1, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Stefanini, I., De Renzi, G., Foddai, E., Cordani, E., and Mognetti, B. (2021). Profile of Bacterial Infections in COVID-19 Patients: Antimicrobial Resistance in the Time of SARS-CoV-2. *Biology*. **10**(9):822. <https://doi.org/10.3390/biology10090822>.
- Sultan, M., Arya, R., and Kim, K.K. (2021). Roles of Two-Component Systems in *Pseudomonas aeruginosa* Virulence. *Int J Mol Sci*.**22**(22):12152. doi: 10.3390/ijms222212152.
- Tauffer, J., Konstantyner, T.C.R.O., de Almeida, M.C.S., Ferreira, D.B., Antonelli, T.S., Fram, D.S., Escudero, D.V., Ferreira, P.R.A., Bellei, N., Colombo, A.L., Yashiro, S.M., Machado, A.M.O., and Medeiros, E.A. (2021). Impact of In-Hospital Infection with SARS-CoV-2 among Inpatients at a university hospital. *Am J Infect Control*. **49**(12):1464-1468. doi: 10.1016/j.ajic.2021.09.015.
- Teo, J.Q., Lim, J.C., Tang, C.Y., Lee, S.J., Tan, S.H., Sim, J.H., Ong, R.T., and Kwa, A.L. (2021). Ceftolozane/Tazobactam Resistance and Mechanisms in Carbapenem-N on susceptible *Pseudomonas aeruginosa*. *mSphere*. **6**(1):e01026-20. doi: 10.1128/mSphere.01026-20.
- Tomczyk, S., Taylor, A., Brown, A., de Kraker, M.E.A., El-Saed, A., Alshamrani, M., Hendriksen, R.S., Jacob, M., Löfmark, S., Perovic, O., Shetty, N., Sievert, D., Smith, R., Stelling, J., Thakur, S., Vietor, A.C., and Eckmanns, T. (2021). WHO AMR Surveillance and Quality Assessment Collaborating Centres Network. Impact of the COVID-19 pandemic on the surveillance, prevention and control of antimicrobial resistance: a global survey. *J Antimicrob Chemother*.**76**(11):3045-3058. doi: 10.1093/jac/dkab300.
- Tuon, F.F., Dantas, L.R., Suss, P.H. and Tasca Ribeiro, V.S. (2022). Pathogenesis of the

- Pseudomonas aeruginosa* Biofilm: A Review. *Pathogens*. **11**(3):300. doi: 10.3390/pathogens11030300.
- WHO. World Health Organization (2023). *Who Coronavirus (COVID-19) Dashboard*. Available in: <https://covid19.who.int/>. Access in: 07 Jan 2023.
- Wolska, K., and Kot, B. (2013). Twitching motility activity, biofilm formation, and genetic typing for clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* by random amplified DNA PCR. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, **60**(3): 313–328. doi:10.1556/amicr.60.2013.3.7.
- Yamada, A. Y. (2020). *Concentrações subinibitórias de nanopartículas de prata sobre as motilidades de Pseudomonas aeruginosa isoladas de água de abastecimento público*. Secretaria de Estado da Saúde, Coordenadoria de Controle de Doenças, Instituto Adolfo Lutz.
- Zeiser, F.A., Donida, B., da Costa, C.A., Ramos, G.O., Scherer, J.N., Barcellos, N.T., Alegretti, A.P., Ikeda, M.L.R., Müller, A.P.W.C., Bohn, H.C., Santos, I., Boni, L., Antunes, R.S., Righi, R.D.R., and Rigo, S.J. (2022). First and second COVID-19 waves in Brazil: A cross-sectional study of patients' characteristics related to hospitalization and in-hospital mortality. *Lancet Reg Health Am*. **6**:100107. doi: 10.1016/j.lana.2021.100107.
- Zha, D.M., Wang, X.L., Xiao, X.H., Shi, H.Q., Yang, Y.W., Shi, X., and Kang, Y.B. (2021). Two polyurethanases PueA and PueB are major extracellular lipases partly secreted by the mediation of their cognate ABC exporter AprDEF in *Pseudomonas protegens* Pf-5. *Lett Appl Microbiol*. **73**(5):652-657. doi: 10.1111/lam.13548.

ANEXO

Normas de Submissão Journal of Applied Microbiology

Author Guidelines

Journal of Applied Microbiology publishes high quality research and review papers on novel aspects of applied microbiology, including environmental, food, agricultural, medical, pharmaceutical, veterinary, soil, systematics, water and biodeterioration. Papers reporting work on all microorganisms, including viruses, are welcomed providing they demonstrate new findings of significance to the field as a whole.

CONTACTS AND QUICK LINKS

[Author submission checklist](#)

[Contact the Editorial Office](#)

[Contact the Production Editor](#)

[Submit your manuscript now to *Journal of Applied Microbiology*](#)

[Guidelines for Electronic Graphics](#)

ARTICLE TYPES

Original Articles

Original Articles comprise most of the Journal and should have as their aim the development of concepts as well as the recording of facts. The manuscript should be prepared for a wide readership and as far as possible should present novel results of a substantial programme of research.

Review Articles

Review Articles will present a substantial survey with an adequate historical perspective of the literature on some facet of applied microbiology. We would prefer to see a distillation of early and present work within the field to show progress and explain the present interest and relevance. The manuscript should not be simply a review of past work or be concentrated largely on unpublished results.

EDITORIAL PROCESS

New manuscripts sent to the Journal will be handled first by the Editorial Office who checks compliance with the guidelines to authors. The manuscript is assigned to a handling Editor by the Chief Editor, and goes through a rapid screening process at which stage a decision to reject or to go to full review is made. This step ensures a rapid rejection of unsuitable manuscripts for the journal. Manuscripts that go to full review are assigned a minimum of two reviewers. Following the return of two reports, the handling Editor provides a report to the Chief Editor, who takes the decision to accept, revise or reject the manuscript. Revised manuscripts

are directly handled by the Chief Editor who decides whether or not the manuscript should go back to the handling Editor for additional comments from the reviewers. Following the return of a report from the handling Editor and reviewers, the Chief Editor makes the decision to accept, further revise or reject the manuscript.

Authors may be advised that short papers not exceeding four published pages would be better placed in *Letters in Applied Microbiology*. Sequential publication of numbered papers will not be permitted.

EDITORIAL POLICY

To ensure responsible publication practices, this Journal adheres to Wiley's **publication ethics policies**, which include guidelines on handling suspected publication misconduct and complaints about the Journal. This Journal is a member of, and subscribes to the principles of, the **Committee on Publication Ethics**.

Authorship

Qualification for authorship should comprise (1) substantial contribution to conception and design or the acquisition and analysis of data, (2) drafting or critically revising the manuscript, and (3) approval of the final submitted version. All authors must satisfy all three criteria, and all those who do satisfy this criteria must be included in the list of authors when the paper is submitted to the Journal. By submission of a manuscript to the Journal, all authors warrant that they have the authority to publish the material and that the paper, or one substantially the same, has neither been published previously, nor is being considered for publication elsewhere. Submissions may be subject to testing for textual similarity to other published works via the CrossCheck software employed by the Journal.

Conflict of interest disclosure

Journal of Applied Microbiology requires that all authors disclose any potential sources of conflict of interest. Any interest or relationship, financial or otherwise, that might be perceived as influencing an author's objectivity is considered a potential source of conflict of interest. These must be disclosed when directly relevant or indirectly related to the work that the authors describe in their manuscript. Potential sources of conflict of interest include but are not limited to patent or stock ownership, membership of a company board of directors, membership of an advisory board or committee for a company, and consultancy for or receipt of speaker's fees from a company. The existence of a conflict of interest does not preclude publication in this journal.

If the authors have no conflict of interest to declare, they must also state this at submission. It is the responsibility of the corresponding author to review this policy with all authors and to collectively list in the cover letter to the Chief Editor, in the manuscript (in the Conflict of Interest section), and in the online submission system ALL pertinent commercial and other relationships.

Ethics of experimentation

The Journal will only accept manuscripts in which there is evidence of the ethical use of animals or harmful substances. The care and use of experimental animals must comply with all relevant local animal welfare laws, guidelines and policies, and a statement of such compliance should be provided upon submission. Where possible, alternative procedures that replace the use of animals, either partially or completely, for example *in vitro* biological systems, should be used. Where this is not possible, the minimum number of animals should be used and pain and suffering reduced, consistent with attaining the scientific objectives of the study. All reasonable steps must be taken to ensure the humane treatment of animals, so as to minimize discomfort, distress and pain. Animals in pain or moribund should be painlessly killed according to local euthanasia regulations. The Journal encourages corresponding authors of manuscripts involving animal research to refer to the **ARRIVE guidelines** before submission of a manuscript.

Potential threat to security

The Journal expects that all authors will conform to the **National Science Advisory Board for Biosecurity (NSABB)** guidelines for Dual Use Life Sciences Research. Where a reviewer is concerned that an article might include information that could be a threat to security then the Editor will treat the article as possible DURC (dual use research of concern) and may consult a specialist reviewer. Their advice will be taken into account by the Editor in making any final decision on publication.

Biosecurity

The Journal asks authors of papers related to **Schedule 5 biological agents** to inform the Editor at the time of manuscript submission if their study has the potential for both benevolent and malevolent application. This is often referred to as “dual use research of concern”. The **National Science Advisory Board for Biosecurity (NSABB)** guidelines state that a “dual use research of concern” can arise in relation to “research that, based on current understanding, can be reasonably anticipated to provide knowledge, products, or technologies that could be directly misapplied by others to pose a threat to public health and safety, agricultural crops and other plants, animals, the environment, or material”.

Antibiotic antimicrobial testing and microbial resistance

A number of methods like disc diffusion, Etest, agar dilution, broth microdilution and broth macrodilution, are suitable for *in vitro* antimicrobial susceptibility testing. However, the test used must be performed in accordance with an internationally accepted procedure; for example tests published by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), the British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC), the Deutsches Institut für Normung e.V. (DIN) and the Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM). Further guidance and interpretation of MIC 50 and MIC 90 values as well as guidance for the

interpretation of multiresistance can be found in Schwarz *et al.* J. Antimicrobial Chemother 2010; 65: 601-604.

Data Sharing

This journal expects data sharing. Review [Wiley's Data Sharing policy](#) where you will be able to see and select the data availability statement that is right for your submission.

Data Availability

Data that is integral to the paper must be made available in such a way as to enable readers to replicate, verify and build upon the conclusions published in the paper. Any restriction on the availability of this data must be disclosed at the time of submission. Data may be included as part of the main article where practical. We recommend that data for which public repositories are widely used, and are accessible to all, should be deposited in such a repository prior to publication. The appropriate linking details and identifier(s) should then be included in the publication and where possible the repository, to facilitate linking between the journal article and the data. If such a repository does not exist, data should be included as supporting information to the published paper or authors should agree to make their data available upon reasonable request.

- Nucleotide sequence data should be deposited in the EMBL/GenBank/DDBJ Nucleotide Sequence Data Libraries and the accession number referenced in the manuscript text, e.g. "E. coli (GenBank accession no. EUXXXXXX.X)". Sequence data should only be included if they are new (unpublished), complete (no unidentified nucleotides included) and if the sequence information itself provides important new biological insights of direct relevance to the question addressed in the manuscript. Generally sequences should not be submitted if the same gene has been reported in another species unless a comparison with related sequences contributes important new information.
- Presentation of nucleotide sequences should include clear indications of nucleotide numbers and points of interest, e.g. promoter sequences, ribosome binding sites, mutations, insertions, probe sequences, etc. In the case of comparisons, nucleotides which differ between the sequences should be readily visible to the reader, e.g. by the use of bold face, shading, boxing or by the use of a dash to represent identical nucleotides. The font size used in the manuscript should facilitate appropriate reduction of the figure.

Copyright Transfer Agreement

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below: CTA Terms and Conditions http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp

OnlineOpen

For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

Referrals to the Open Access Journal *Microbiology Open* and *Food Science & Nutrition*

This journal works together with two of Wiley's open access journals, *MicrobiologyOpen* and *Food Science & Nutrition* to enable rapid publication of good quality research that is unable to be accepted for publication by our journal. Authors may be offered the option of having the paper, along with any related peer reviews, automatically transferred for consideration by one of these two journals. *MicrobiologyOpen* and *Food Science & Nutrition* are Wiley open access journals and article publication fees apply. For more information, please go to www.microbiologyopen.com/info and www.foodscience-nutrition.com/info.

SUBMISSION

Authors should submit their manuscripts online at <https://mc.manuscriptcentral.com/jamicro>. The main text of a manuscript must be submitted as a Word document (.doc) or Rich Text Format (.rtf) file. For review purposes submitted papers (both original and revised articles) must be formatted with continuous line

numbering and double spaced text throughout. All original files that you upload will be available for the Editorial Office to access.

Cover letter

The cover letter should contain answers to the following two questions, which will help the Editors in determining whether your manuscript should be sent for full peer review (~50 words per answer):

1. How does this work fit the Aims and Scope of the Journal?
2. In what way is this work novel?

The cover letter should also disclose any potential sources of conflict of interest that Editors may consider relevant to their manuscript.

Suggesting reviewers

Authors are invited to suggest at least two reviewers. It is not appropriate for reviewers to be members or former members of the authors' organization(s), or to have been associated with them. Conversely, authors may identify 'non-preferred' reviewers or institutions that they would rather were not approached. Authors should give justification for choosing non-preferred reviewers or institutions in their cover letter. Authors are advised that handling Editors reserve the right to select reviewers of their choice.

MANUSCRIPT PREPARATION AND PRESENTATION

Manuscripts should be drafted as concisely as possible. As space in the Journal is at a premium, the Editors always reserve the right to require authors to reduce the length of their manuscripts. Manuscripts will not be reviewed unless the English is of a publishable standard. It is strongly recommended that you use the **author submission checklist** to help you to prepare your submission to the Journal.

The main text of the manuscript should be prepared as a Word document (.doc) or Rich Text Format (.rtf) file. Text must be double-spaced, and the pages of the manuscript must be numbered consecutively.

The title page should show the title of the manuscript; the names of authors and place(s) where the work was done; an abbreviated running headline not exceeding 35 letters and spaces; and the complete contact details for the corresponding author.

Original Articles should not exceed 34 pages and should contain the following sections in this order:

- **ABSTRACT:** A brief summary of about 150-200 words, should give the major findings of the investigation under the following four headings: Aims; Methods and Results; Conclusions; Significance and Impact of Study. A list of between five and eight keywords should be added;
- **INTRODUCTION:** A balance must be struck between the pure and applied aspects of the subject;

- **MATERIALS AND METHODS:** Ensure that the work can be repeated according to the details provided. By submission of a manuscript, the authors consent that biological material, including plasmids, viruses and microbial strains, unobtainable from national collections will be made available to members of the scientific community for non-commercial purposes subject to national and international regulations governing the supply of biological material. In the case of a new diagnostic PCR, you should consider the need for an internal amplification control (JAM 2004 96(2):221; available [here](#)).
- **RESULTS:** Well-prepared tables and figures must be a cardinal feature of the 'Results' section because they convey the major observations to readers who scan a paper. Information provided in tables and figures should not be repeated in the text, but focus attention on the importance of the principal findings of the study. In general, journal papers will contain between one and seven figures and tables;
- **DISCUSSION:** This must not recapitulate the results and authors must avoid the temptation of preparing a combined 'Results and Discussion' section;
- **ACKNOWLEDGEMENTS:** Contributors who do not qualify as authors should be acknowledged and their particular contribution described. All sources of funding for the work reported, for all the authors, must be acknowledged. Both the research funder and the grant number (if applicable) should be given for each source of funds;
- **CONFLICT OF INTEREST:** If no conflict of interest exists, then 'no conflict of interest declared' should appear within this section. Otherwise, authors should list all pertinent commercial and other relationships that may be perceived as a potential source of conflict of interest.
- **REFERENCES;**
- **SUPPORTING INFORMATION (if applicable):** Supporting Information can be a useful way for an author to include important but ancillary information with the online version of an article. Examples of Supporting Information include additional tables, data sets, figures, movie files, audio clips, 3D structures, and other related nonessential multimedia files. Supporting Information should be cited within the article text. The availability of supporting information should be indicated in the main manuscript by a section headed 'Supporting Information', under which should be appropriate legends for the material. It is published as supplied by the author, and a proof is not made available prior to publication; for these reasons, authors should provide any Supporting Information in the desired final format. For further information on recommended file types and requirements for submission, please visit: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/suppinf.asp>

Review Article manuscripts must normally not exceed 32 pages (A4) including references, figures and tables. As references can make a heavy demand on the pages available to you, it

is suggested that you select key references only. The headings in Review Articles are of the author's choice, but the manuscript should begin with a short SUMMARY of 150-200 words. There is no requirement for review articles to have a 'significance and impact' section; this is at the discretion of the author.

Please check and confirm that your article is optimized for search engines. Keywords should appear in the title, abstract and throughout your article in order to increase your article's online visibility. For more information, please see [Writing for SEO](#).

References

The Harvard system should be used. Citation of references having three or more names should be cited in the text as Jones *et al.* (1992) at the first and subsequent times of quoting the reference. A series of references should be given in ascending date order (Green and Smith 1946; Jones *et al.* 1956). Names with the prefixes de, do van, von, etc. will be placed in alphabetical order of the first letter of the prefix, e.g. von Braun would appear under 'V'. Different publications having the same author(s) and year will be distinguished by, for example, 1992a, 1992b. Papers or other publications having no obvious author(s) should usually be cited as 'Anon.' with the year in the text and bibliography. Web sites should be quoted in the text with an access date. Abbreviate journal titles according to Index Medicus (http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/terms_cond.html). Personal communications should be cited in the text with initials and family name of all individuals.

The following is an example of order and style to be used in the manuscript:

Fricker, C.R. (1995) Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in water. In Protozoan Parasites in Water ed. Betts, W.B., Casemore, D., Fricker, C.R., Smith, H.V. and Watkins, J. pp.91-96. London: The Royal Society of Chemistry.

Garner, J.S. and Favero, M.S. (1985) *Guidelines for Handwashing and Hospital Environment Control*. US Public Health Service, Centers for Disease Control HHS No. 99-117. Washington DC: Government Printing Office.

Laverick, M.A., Wyn-Jones, A.P. and Carter, M.J. (2004) Quantitative RT-PCR for the enumeration of noroviruses (Norwalk-like viruses) in water and sewage. *Lett Appl Microbiol* **39**, 127-135.

Tables

Tables must be prepared in the same format as the manuscript text, and should ideally appear at the end of the main manuscript file. Tables must not include ruled vertical or horizontal lines with the exception of headers and a footer (see example). The use of explanatory footnotes is permissible and they should be marked by the following (shown in order of preference): *, †, ‡, §, ¶, **, †† etc. For an example of table style, [click here](#).

Figures

Figures should be uploaded to the online submission site as separate files. Authors are advised that poor quality figures may delay the publication of their paper. Symbols or keys representing data series in graphs and charts must not be shown on the figure itself but be included in the legend. For an example of figure style, [click here](#).

Photographs must be of good quality and high contrast. The magnification must be indicated by adding a bar representing a stated length. Composite photographs can reduce the numbers that require publication. The Journal will not accept figures illustrating SDS-PAGE and agarose gels with multiple lanes, where lane order has been rearranged using digital imaging software. The figure should also show sufficient of the gel to reveal reference markers (e.g. the sample origin and a tracker dye, or a lane of molecular mass markers).

- Save line art such as charts, graphs and illustrations in EPS or PDF format. Most programs have a 'Save as...' or 'Export...' feature to allow you to do this
- Save photographic images in TIFF format. These should be at a resolution of at least 300 dpi at final size
- Save figures containing a combination of photographic images and text (eg annotated photographic images with text labels) as EPS or PDF. Any photographic images embedded within these should be at least 300 dpi
- Perform a visual check of the quality of the generated image. You should be able to zoom in to about 300% without the image becoming noticeably blurred or pixelated. If the image does appear pixelated at this zoom, then try going back to the original image and checking that it complies with the recommended format and settings
- Detailed information on the submission of electronic artwork can be found at: http://media.wiley.com/assets/7323/92/electronic_artwork_guidelines.pdf

Colour figures

Colour in figures is free of charge, however it is essential that the figure legends apply equally well to both printed greyscale and online colour versions, and do not specifically refer to the colour.

English usage, abbreviations and units

Use 'z' spelling where possible, except analyse, dialyse, hydrolyse, etc.; sulfur, sulfate, etc. When using numbers in the text, one to nine should be written in full and 10 and above should be written as numerals. The Journal uses SI units: g l⁻¹ not g/l; d, h, min, s (time units) but week and year in full; mol l⁻¹ (not M or N); probability is P; centrifugation conditions relative to gravity (**g**). Please refer to the Biochemical Journal 'Instructions to Authors' www.biochemj.org/bj/bji2a.htm.

Please [click here](#) for some examples of common abbreviations used in the Journal.

Microbial nomenclature

The Latin binomial name of micro-organisms, plants and animals (other than farm animals) must be given at first mention in the text; thereafter the generic name will be abbreviated in such a way that confusion is avoided when dealing with several genera all beginning with the same letter, viz. *Pseudomonas*, *Proteus*, *Pediococcus*, etc. (see list of abbreviations below). Subspecies are italicized (*Corynebacterium diphtheriae* subsp. *mitis*); groups and types are printed in Roman and designated by capital letters or Arabic figures (e.g. *Staphylococcus aureus* group A). Common names will not have an initial capital letter nor will they be underlined in the manuscript, viz. pseudomonad, salmonellas. The specific name will be given in full in the captions to tables and figures. Major ranks are written in Roman with an initial capital (e.g. Enterobacteriaceae).

Please [click here](#) for a list of abbreviations currently in use for common generic names and for notes on referring to plant pathogenic bacteria.

Gnotobiotic animals

The terminology for describing the environmental status of animals in gnotobiotic experiments has established itself by usage. *Germ-free* implies freedom from any detectable microorganisms or viruses and it is limited by the tests used to detect contaminants. *Conventional animals* have a full complement of associated microbes. *Open conventional animals* are housed in a standard animal house. *Isolator conventional animals* are maintained in isolators and associated with full flora. *Ex-germ-free* animals are those with an associated flora which have become conventional.

Statistics

Tests must be presented clearly to allow a reader with access to the data to repeat them. Statistical tests used in the study should be clearly indicated in the Materials and Methods section. It is not necessary to describe every statistical test fully, as long as it is clear from the context what was done. In particular, null hypotheses should be clearly stated.

Authors are urged to give consideration to the assumptions underlying any statistical tests used and to assure the reader that the assumptions are at least plausible. Authors should be prepared to use nonparametric tests if the assumptions do not seem to hold.

Footnotes

Not permitted other than on the first page of a manuscript where they are used to show the author's change of address and the address for correspondence.

Experimental hazards

Chemical or microbiological hazards that may be involved in the experiments must be explained. Authors should provide a description of the relevant safety precautions adopted or cite an accepted 'Code of Practice'.

English-language editing service

Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscript professionally edited before submission to improve the English. A list of independent suppliers of editing services can be found [here](#). All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

AFTER ACCEPTANCE

Proofs

The corresponding author will receive an email alert containing a link to a web site. A working email address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF file from this site and corrections made following the instructions sent with the proofs. Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetter errors, may be charged separately.

Early View

Journal of Applied Microbiology is covered by Wiley Online Library's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Articles are therefore available as soon as they are ready, rather than having to wait for the next scheduled print issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article. More information about DOIs can be found at: <http://www.doi.org/faq.html>.

Offprints

A PDF offprint of the online published article will be provided free of charge to the corresponding author, and may be distributed subject to the Publisher's terms and conditions. Free access to the final PDF offprint or your article will be available via author services only. Please therefore sign up for author services if you would like to access your article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers. Paper offprints of the printed published article may be purchased if ordered via the method stipulated on the instructions that will accompany the proofs. Printed offprints are posted to the correspondence address given for the paper unless a different address is specified when ordered. Note that it is not uncommon for printed offprints to take up to eight weeks to arrive after publication of the Journal.

Note to NIH Grantees

Pursuant to NIH mandate, Wiley will post the accepted version of contributions authored by NIH grant-holders to PubMed Central upon acceptance. This accepted version will be made

publicly available 12 months after publication. For further information, see www.wiley.com/go/nihmandate.

Author material archive policy

Please note that unless specifically requested, Wiley will dispose of all hardcopy or electronic material submitted 2 months after publication. If you require the return of any material submitted, please inform the Managing Editor or Production Editor.

Disclaimer

Whilst every effort is made by the Publishers and Editorial Board to see that no inaccurate or misleading data, opinion or statement appears in this Journal, they wish to make it clear that the data and opinions appearing in the articles and advertisements herein are the sole responsibility of the contributor or advertiser concerned. Accordingly, the Publishers and Editors and their respective employees, officers and agents accept no responsibility or liability whatsoever for the consequences of any such inaccurate or misleading data, opinion or statement.