

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

MELISE CHAVES SILVEIRA

Caracterização do ambiente genético dos genes de resistência a β -lactâmicos e aminoglicosídeos, *bla*_{SPM-1} e *rmtD*, em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* pertencentes ao clone ST277, epidêmico no Brasil.

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Biologia Celular e Molecular

Orientadora: Prof. Dra. Ana Paula D'Alincourt Carvalho Assef

RIO DE JANEIRO

2014

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

S587 Silveira, Melise Chaves

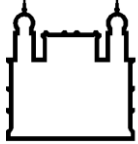
Caracterização do ambiente genético dos genes de resistência a β -lactâmicos e aminoglicosídeos, *blaSPM-1* e *rmtD*, em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* pertencentes ao clone ST277, epidêmico no Brasil / Melise Chaves Silveira. – Rio de Janeiro, 2014.

v, 99 f.: il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2014.
Bibliografia: f. 94-104

1. *Pseudomonas aeruginosa*. 2. Multirresistência. 3. Clone ST277. 4. Sequenciamento total do genoma. I. Título.

CDD 579.332



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: MELISE CHAVES SILVEIRA

Caracterização do ambiente genético dos genes de resistência a β -lactâmicos e aminoglicosídeos, *bla*_{SPM-1} e *rmtD*, em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* pertencentes ao clone ST277, epidêmico no Brasil.

ORIENTADORA: Prof. Dra. Ana Paula D'Alincourt Carvalho Assef

Aprovada em: 28/04/2014

EXAMINADORES:

Profa. Dra. Presidente Teca Calcagno Galvão

Prof. Dr. Rodolpho Mattos Albano

Prof. Dr. Robson de Souza Leão

Prof. Dr. Alberto Martín Rivera Dávila (Suplente)

Profs. Dra. Elizabeth de Andrade Marques (Suplente)

Rio de Janeiro, 28 de abril de 2014

Aos meus pais, por me apoiarem em minhas escolhas,
e pelo amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por permitir que eu tivesse mais essa oportunidade de crescer como pessoa e profissional, por colocar na minha vida pessoas que tornaram isso possível, por me guardar e proteger sempre e por me dar sabedoria para vencer os obstáculos.

Aos meus pais, que me apoiam em TODOS meus sonhos e objetivos, fazendo o possível e o que parece impossível para torna-los realidade, pelo amor incondicional e por me permitir “voar”. Tenham certeza que sempre voltarei para casa, pois vocês são minha segurança e única certeza na vida.

À minha irmã, de sangue e de alma, por me entender sem que seja preciso que eu fale, pelas palavras certas e por estar sempre presente, mesmo distante.

À minha orientadora, Dra. Ana Paula, que confiou a mim um projeto tão pessoal, por ter me ajudado a solucionar os problemas que encontramos no caminho, por todo conhecimento passado, pela disponibilidade, pelas grandes ideias e por ter me acompanhado durante esses quatro anos, obrigada.

À Lais, que foi uma irmã emprestada durante seis anos, por dividir momentos bons e ruins, pela serenidade que me passou, pelo que me ensinou, por me ouvir e pela grande amizade que construímos. Você fez toda diferença.

Às minhas grandes amigas, Havana e Stephanie, por estarem sempre comigo, me protegendo, ajudando. Por me conhecerem tão bem e mesmo assim aturarem.

À todos amigos, de perto ou de longe, que tornam a minha vida melhor e me proporcionam a segurança de sempre poder contar com alguém, na alegria ou na dificuldade.

À Dra. Marise Asensi, por ter aberto as portas do LAPIH para mim e permitido que eu fizesse parte desse laboratório.

Aos companheiros que participaram da minha passagem pelo LAPIH, vocês foram essenciais! Toda ajuda, todas as conversas e a boa convivência com vocês tornaram tudo mais prazeroso e mais fácil.

Ao Dr. Rodolpho Albano, por permitir usar a plataforma de sequenciamento da UERJ, pela ajuda na análise dos resultados, pela paciência em ensinar e tirar as dúvidas que surgiram durante esse projeto.

Ao Dr. Alberto Dávila, Dr. Rodrigo Jardim e Dr. Diego Tschoeke, por se mostrarem disponíveis e esforçados em me ajudar a tentar responder perguntas que surgiram nesse trabalho.

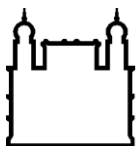
À Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz, pela excelente formação e apoio aos alunos, além da eficiência dos funcionários.

Aos hospitais e LACENs estudados, pelo envio das cepas.

Às agência de fomento CNPq, CAPES e FAPERJ, pelo apoio financeiro.

“Porque ele se apegou a mim, eu o libertarei; eu o protegerei,
pois conhece o meu nome”

Salmo 91



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

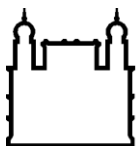
Caracterização do ambiente genético dos genes de resistência a β -lactâmicos e aminoglicosídeos, *bla*_{SPM-1} e *rmtD*, em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* pertencentes ao clone ST277, epidêmico no Brasil

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Melise Chaves Silveira

O surgimento de bactérias Gram-negativas resistentes à drogas tem sido progressivo e alarmante. Entre os patógenos de particular importância está *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes à drogas (MDR). Um clone epidêmico de *P. aeruginosa* MDR produtor da metalo- β -lactamase SPM-1, chamado clone SP (ST277), tem sido encontrado em diferentes estados brasileiros. O gene *bla*_{SPM-1} foi descrito em uma estrutura genética chamada ISCR4, responsável pela sua mobilização e expressão. Além do gene *bla*_{SPM-1}, tem sido descrito, neste clone, a presença de um integron de classe I carreando genes de resistência (*In163*) e um elemento genético ISCR14 carreando uma metilase de RNAr 16S (*rmtD*), que confere resistência a altas concentrações de aminoglicosídeos. Este tipo de associação resulta em um perfil de resistência extremamente preocupante. Assim, este estudo teve como objetivo investigar a contexto genético dos genes *bla*_{SPM-1} e *rmtD*, além de caracterizar mutações em genes cromossômicos associados a multirresistência a antimicrobianos em amostras de *P. aeruginosa* pertencentes ao clone ST277, através de *Southern blot* e sequenciamento de nova geração. A partir de 50 amostras de *P. aeruginosa* MDR isoladas entre 2007 e 2010, foram selecionadas 13 amostras pertencentes ao ST277 (através de MLST) que apresentaram positividade para *bla*_{SPM-1} e/ou *rmtD* e *In163* (através de PCR), sendo 12 do clone SP (A) e uma de um clone diferente, M, através de PFGE. Através de restrição do DNA com as enzimas de restrição *SpeI* e *XbaI*, e posterior hibridação com sondas dos genes alvos (*bla*_{SPM-1}, *rmtD* e *In163*) foi possível observar que os genes alvos encontravam-se em fragmentos distintos e que a amostra do clone M apresentou um perfil de hibridação diferentes das demais amostras demonstrando a ocorrência de vários rearranjos na mesma, indicando uma maior distância evolutiva. A partir destes resultados, selecionamos 6 amostras para sequenciamento total do genoma utilizando a plataforma de sequenciamento MiSeq da Illumina. Através de sucessivas análises - que incluíram os contigs gerados na montagem *de novo*, montagens por referência e alinhamentos par a par - chegamos a uma região de 239.648pb onde estavam contidos o *In163* e o ISCR14 carreando *rmtD*, inseridos em uma ilha genômica incorporada ao cromossomo bacteriano. O gene *bla*_{SPM-1} inserido no ISCR4 foi encontrado em uma região de 13.959pb, que incluía genes relacionados a plasmídios e transposons, contudo ainda não sabemos se esse elemento está incorporado ao cromossomo, ou livre em forma de plasmídio. Através da análise das mutações em genes cromossômicos associados a resistência à antimicrobianos, encontramos mutações nos genes *oprD*, *ampD*, *mexZ*, *mexS*, *mexT*, *gyrA* e *parC* que foram comuns às 6 amostras sequenciadas do ST277. Isso explicaria o fenótipo MDR nas amostras negativas para *rmtD* e/ou *bla*_{SPM-1}. Além disso, como estas amostras foram isoladas em estados e anos distintos, acreditamos que essas mutações sejam características do ST277, o que pode ser um dos fatores associados a distribuição epidêmica deste clone no Brasil.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Caracterização do ambiente genético dos genes de resistência a β -lactâmicos e aminoglicosídeos, *bla*_{SPM-1} e *rmtD*, em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* pertencentes ao clone ST277, epidêmico no Brasil

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Melise Chaves Silveira

The development of antimicrobial resistance among Gram-negative pathogens has been progressive and relentless. A pathogen of particular concern is multidrug-resistant (MDR) *Pseudomonas aeruginosa*. An epidemic clone of MDR *P. aeruginosa* producing the metallo- β -lactamase SPM-1, named SP clone (ST277), has been found in different Brazilian states. The *bla*_{SPM-1} gene has been described in a genetic structure called ISCR4, responsible for its mobilization and expression. Besides the *bla*_{SPM-1} gene, it has been described in this clone, a classe I integron (*In163*) carrying resistance genes and the genetic element ISCR14 carrying a 16S rRNA methylase (*rmtD*), that confers resistance to high concentrations of aminoglycosides. This kind of association results in an extremely worrisome profile of resistance. Thus, this work aimed to investigate the genetic background of *bla*_{SPM-1} and *rmtD* genes and to characterize mutations in chromosomal genes associated with multidrug resistance in *P. aeruginosa* isolates belonging to ST277 clone, using Southern blot and next-generation sequencing. From 50 MDR *P. aeruginosa* isolates recovered from 2007 to 2010, there were selected 13 *bla*_{SPM-1} and/or *rmtD*-positive isolates (by PCR) belonging to ST277 (by MLST), 12 from SP (A) clone and one from a different PFGE clone (M). By DNA digestion with *SpeI* and *XbaI* restriction enzymes, and subsequent hybridization with probes for target genes (*bla*_{SPM-1}, *rmtD* and *In163*), it was observed that the target genes were in separate fragments, and that the M clone isolate showed a different profile compared with the other isolates, indicating various rearrangements, suggesting a greater evolutionary distance. With these results, 6 isolates were selected for whole genome sequencing by Illumina MiSeq platform. Through successive analyzes – which included de novo assembly contigs, map to reference assemblies and pairwise alignments- we came up to a 239648pb region containing the *In163* and ISCR14 inserted into a genomic island incorporated into bacterial chromosome. The *bla*_{SPM-1} gene was inserted into ISCR4, found in a 13950pb region, which included genes related to plasmids and transposons, however we do not know whether this elements chromosomal or plasmidial. Through analysis of chromosomal genes mutations associated with multidrug resistance, we found mutations in *oprD*, *ampD*, *mexZ*, *mexS*, *mexT*, *gyrA* e *parC* genes, which were common to the 6 ST277 isolates sequenced. This would explain the MDR phenotype in *bla*_{SPM-1} and/or *rmtD* negative isolates. Furthermore, since these microorganisms were isolated in different years and states, we believe these mutations are ST277 characteristic, which may be one of the factors associated with the epidemic characteristics of this clone.

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Iniciadores e condições específicas das reações de PCR para <i>bla</i> _{SPM-1} , <i>rmtD</i> e <i>In163</i>	42
Tabela 3.2. Iniciadores e condições específicas das reações de PCR e sequenciamento do esquema de MLST para <i>P. aeruginosa</i> conforme descrito por Curran e colaboradores (2004).....	45
Tabela 4.1: Perfil das amostras selecionadas para construção do mapa genético.....	57
Tabela 4.2: Resultados da PCR e perfis de hibridação das amostras do ST277, obtidos após digestão com enzimas de restrição <i>SpeI</i> e <i>XbaI</i> e hibridação com sondas de <i>bla</i> _{SPM-1} , <i>rmtD</i> e <i>In163</i>	60
Tabela 4.3: Dados das amostras que entraram na etapa de sequenciamento total do genoma.....	61
Tabela 4.4: Dados referentes às corridas de 300 e 500 ciclos do Sequenciamento Total do Genoma de 6 amostras de <i>P. aeruginosa</i> do ST277 através do sistema Illumina MiSeq.....	62
Tabela 4.5: Anotação dos contigs que apresentaram identidade com o elemento genético <i>ISCR4</i> carreando o gene <i>bla</i> _{SPM-1} (Genebank AY341249.1) encontrados nas 6 amostras de <i>P. aeruginosa</i> pertencentes ao ST277.....	62
Tabela 4.6: Anotação dos contigs que apresentaram identidade com o integron <i>In163</i> e o elemento genético <i>ISCR14</i> carreando o gene <i>rmtD</i> (Genebank DQ914960) encontrados nas 6 amostras de <i>P. aeruginosa</i> pertencentes ao ST277.....	66
Tabela 4.7: Resultados de PFGE, PCR, Hibridação e Sequenciamento total do Genoma das 6 amostras selecionadas.....	74

Tabela 4.8: Alterações nas sequências de nucleotídeos e aminoácidos referentes aos genes *oprD*, *ampD* e *dacB* nas amostras de *P. aeruginosa* pertencentes ao ST277.....76

Tabela 4.9: Alterações nas sequências de nucleotídeos e aminoácidos referentes aos genes reguladores de bombas de efluxo nas amostras de *P. aeruginosa* pertencentes ao ST277.....78

Tabela 4.10: Alterações nas sequências de nucleotídeos e aminoácidos referentes aos genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* e *parE* nas amostras de *P. aeruginosa* pertencentes ao ST277.....79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1: Integron <i>In163</i> , classe 1. Setas em negrito indicam a região amplificada por PCR.....	41
Figura 3.2: Cálculo da média de cobertura dos contigs montados para cada amostra, segundo Normand & Yanai (2013) (80).....	51
Figura 3.3: Imagem ilustrativa do elemento genético móvel <i>ISCR4</i> , contendo a <i>orf495</i> e o gene <i>bla_{SPM-1}</i> , flaqueados por genes <i>groEL</i> conforme descrito por Poirel e colaboradores, 2004 (GenBank AY341249.1) (63).....	52
Figura 3.4: Figura retirada do artigo de Doi e colaboradores, 2008 (65). Imagem ilustrativa do integron de classe 1 <i>In163</i> seguido do elemento genético móvel <i>ISCR14</i> , onde está contido o gene <i>rmtD</i> (GenBank DQ914960).....	52
Figura 4.1: Perfis de fragmentação do DNA e dendrograma das 50 amostras de <i>P. aeruginosa</i> gerados pelo BioNumerics. Inclui-se também os resultados do MLST e das PCRs para <i>bla_{SPM-1}</i> , <i>rmtD</i> e <i>In16</i> ;, além dos dados clínicos das amostras. FO-Fragmento Ósseo; PC-Ponta de catéter; NI- Não Informado; LA-Líquido Ascítico; LP- Líquido de Preservação; SS-Swab de Secreção; AT- Aspirado Traqueal; LPL-Líquido Pleural.....	56
Figura 4.2: Gel com os perfis de fragmentação obtidos com a digestão pela enzima <i>I-CeuI</i> e membrana de nylon marcada com a sonda do <i>In163</i> das 13 amostras selecionadas.....	58
Figura 4.3: Representação dos resultados das hibridações com as sondas para <i>bla_{SPM-1}</i> , <i>rmtD</i> e <i>In163</i> após digestão com enzima de restrição <i>SpeI</i> das 13 amostras selecionadas. As regiões coloridas correspondem às bandas marcadas com as sondas: <i>bla_{SPM-1}</i> ; <i>rmtD</i> e <i>In163</i>	59
Figura 4.4: Representação dos resultados das hibridações com as sondas para <i>bla_{SPM-1}</i> , <i>rmtD</i> e <i>In163</i> após digestão com enzima de restrição <i>XbaI</i> das 13 amostras selecionadas. As regiões	

coloridas correspondem às bandas marcadas com as sondas: *bla*_{SPM-1}; *rmtD*;
In163.....59

Figura 4.5: Figura representativa do alinhamento par a par entre a parte inicial do contig 3462-SPM-1 e a parte final do contig 5698-SPM-1, gerado pelo programa Geneious. A barra *Identity* com a cor verde significa 100% de identidade entre as duas sequencias.....63

Figura 4.6: Região de sobreposição entre os contigs 3462-SPM-1 e 4851 (10.722pb) após alinhamento par a par entre eles usando o programa Geneious. A barra *Identity* com a cor verde significa 100% de identidade entre as duas sequencias.....63

Figura 4.7: Anotação, gerada pelo programa RAST, do consenso de 13.959pb entre os contigs 3462-SPM-1 e 4851-10.722pb. Nesta figura estão representados as fases (-3 a +3) e o sentido (setas) da leitura de cada gene.64

Figura 4.8: Figuras representativas, geradas pelo programa Geneious, do mapeamento das *reads* das amostras positivas para *bla*_{SPM-1}, usando como referência o consenso 3462-SPM-1 /4851-10.722pb (13.959pb, Figura 4.7). O retângulo superior representa a sequencia consenso da amostra (*consensus*), onde as áreas cinzas indicam identidade e as pretas diferenças, em relação a sequencia de referência. Os picos azuis representam a cobertura, também representada metricamente na escala à esquerda do alinhamento (*Coverage*). Na figura D, as *reads* da amostra CCBH5698 também estão representadas, como pequenos retângulos pretos.....65

Figura 4.9: Figuras representativas do mapeamento das *reads* das amostras *bla*_{SPM-1} negativas usando como referência o consenso 3462-SPM-1 /4851-10.722pb (13.959pb). O retângulo superior representa a sequencia consenso da amostra (*Consensus*), onde as áreas cinzas indicam identidade e as pretas diferenças, em relação a sequencia referência. Os picos azuis representam a cobertura, também representada metricamente na escala à esquerda do alinhamento (*Coverage*).....66

Figura 4.10: Alinhamento par a par entre a região de 6.200 pb contig 5698-In+rmtD, que não apresenta *hits* confiáveis com o banco de dados, e a região do contig 4851-In+rmtD correspondente ao DNA da *H. arsenicoxydans*. A barra *Identity* com a cor verde significa identidade de 100%, já a cor amarela significa diferenças entre as duas sequencias.....68

Figura 4.11: Alinhamento par a par entre as regiões dos contigs 276-In e 4851-In+rmtD que correspondem ao DNA da *H. arsenicoxydans*. A barra *Identity* com a cor verde significa 100% de identidade entre as duas sequencias.....68

Figura 4.12: Alinhamento par a par entre os contigs 276-In e 3462-In. A barra *Identity* com a cor verde significa 100% de identidade entre as duas sequencias. Em laranja a região de identidade correspondente ao *In163* e a região sem hit no banco de dados.....69

Figura 4.13- Anotação feita através de análise no Blast dos contigs 276-In 3462-In e do consenso gerado entre os contigs 276-In e 3462-In. Em laranja a região de identidade correspondente ao *In163* mais a região sem hit no banco de dados.....69

Figura 4.14: Figuras representativas geradas pelo programa Geneious do mapeamento das *reads* das amostras negativas para *rmtD*, usando como referência o consenso entre os contig 276-In e 3462-In (37.094 pb), obtido através de alinhamento par a par. O retângulo superior representa a sequencia consenso da amostra (*Consesnsus*), onde as áreas cinzas indicam identidade e as pretas diferenças, em relação a sequencia referência. Os picos azuis representam a cobertura, também representada metricamente na escala à esquerda do alinhamento. A figura (A) representa o alinhamento das *reads* da amostra CCBH276 mapeadas contra a parte do *Tn5564* anterior ao *In163*. A figura (B) representa o alinhamento das *reads* da amostra CCBH3462 com a região do DNA de *H. arsenicoxydans*.....70

Figura 4.15: Figuras representativas, obtidas pelo Geneious, dos alinhamentos par a par sucessivos entre os contigs 3462-In, 4851-In+rmtD e os dois contigs da amostra CCBH5939. A barra *Identity* com a cor verde significa 100% de identidade entre as duas sequencias. Em (A) está representado o alinhamento entre o consenso 3462-In e 4851-In+rmtD e o contig de

179.418pb da amostra CCBH5939. Em (B) está representado o alinhamento entre o consenso obtido em (A) e o contig de 40.365pb da amostra CCBH5939.71

Figura 4.16: Identities do consenso de 239.648pb (gerado entre os contigs 3462-In, 4851-In+rmtD e os dois contigs da amostra CCBH5939) obtido através da plataforma Blast.....71

Figura 4.17: Mapeamento das *reads* das amostras *rmtD* negativas usando o contig de 239.648pb como referência. O retângulo superior representa a sequencia consenso da amostra (*Consensus*), onde as áreas cinzas indicam identidade e as pretas diferenças, em relação a sequencia referência. Os picos azuis representam a cobertura, também representada metricamente na escala à esquerda do alinhamento (*Coverage*).....72

Figura 4.18: Mapeamento das *reads* das amostras *rmtD* positivas usando o contig de 239.648pb como referência. O retângulo superior representa a sequencia consenso da amostra (*Consensus*), onde as áreas cinzas indicam identidade e as pretas diferenças, em relação a sequencia referência. Os picos azuis representam a cobertura, também representada metricamente na escala à esquerda do alinhamento (*Coverage*).....73

Figura 4.19: Alinhamento das sequencias de aminoácidos da proteína OprD entre seis amostras de *P. aeruginosa* pertencentes ao ST277 e a amostra referência PAO1. A figura gerada pelo programa Geneious representa parte do alinhamento mostrando a mudança no quadro de leitura (*frameshift*) a partir do aminoácido 126 da sequencia da proteína OprD (total de 444 aminoácidos).75

Figura 4.20: Alinhamento das sequencias de nucleotídeos do gene *mexT* entre seis amostras de *P. aeruginosa* pertencentes ao ST277 e a amostra referência PAO1. A figura gerada pelo programa Geneious representa parte do alinhamento mostrando deleção de 8 nucleotídeos da sequencia de *mexT* (total de 1.044 nucleotídeos).....77

Figura 4.21: Alinhamento das sequencias de aminoácidos da proteína MexZ entre seis amostras de *P. aeruginosa* pertencentes ao ST277 e a amostra referência PAO1. A figura gerada pelo programa Geneious representa parte do alinhamento mostrando a mudança no

quadro de leitura (*frameshift*) a partir do aminoácido 147 da sequência da proteína MexZ
(total de 211 aminoácidos).77

LISTA DE ABREVIATURA

ABC- *ATP Binding Cassete* (cassete ligador de ATP)
AK- Amicacina
AmpC- Ampicilinase
ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATM- Aztreonam
ATP- *Adenosine Triphosphate* (Trifosfato de Adenosina)
BGN- Bacilo Gram-negativo
BGNNF- Bacilo Gram-negativo não-fermentador
bla - Gene β -lactamase
BLAST- *Basic Local Alignment Search Tool* (Ferramenta de pesquisa de alinhamento local básico)
CAZ- Ceftazidima
CC- Complexo Clonal
CCD- *Charge Couple Device* (Dispositivo Acoplado a Carga)
CIP- Ciprofloxacina
CLED- Agar Cystein Lactose Eletrolite Deficient
CR- *Conserved Region* (Região Conservada)
DNA- Ácido Desoxirribonucléico
EDTA- Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
ESBL- β -lactamases de Espectro Estendido
et al- e colaboradores
FEP- Cefepime
FIOCRUZ- Fundação Oswaldo Cruz
GEN- Gentamicina
GO- Goiás
HIV- Vírus da Imunodeficiência Humana
IMP- Imipenemase
In- Integron
IOC- Instituto Oswaldo Cruz
IPM- Imipenem
IS- *Insertion Sequence* (Sequencia de Inserção)
ISCR- *Conserved Region Insertion Sequence* (Sequencia de Inserção com Região Conservada)
LACEN- Laboratório Central
LAPIH- Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar
LED- *Light Emitting Diode* (Luz Emitindo Diiodo)
MATE- *Multidrug And Toxic compound Extrusion* (Extrusão de Múltiplas Drogas e Compostos Tóxicos)
MBL- Metallo- β -lactamase

MDR- *Multi Drug Resistance* (Resistência à Múltiplas Drogas)
MEM- Meropenem
MF- *Major Facilitator* (Facilitador Principal)
MLST- *Multilocus Sequence Typing* (Tipagem por Sequenciamento de Múltiplos Lócus)
MPA- Ácido 2-mercaptopropiônico
NCBI- *National Center for Biotechnology Information* (Centro Nacional para Informação Biotecnológica)
NDM- *New Delhi* Metallo- β -lactamase
ORF- *Open Read Frame* (Quadro de Leitura Aberto)
OXA- Oxacilinases
PB- Polimixina B
PBP- *Penicilin Bind Protein* (Proteína Ligadora de Penicilina)
PCR- *Polymerase Chain Reaction* (Reação em Cadeia da Polimerase)
PFGE- *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (Eletroforese em Gel em Campo Pulsado)
QS- Quorum-Sensing
RAST- *Rapid Annotation using Subsystem Technology* (Anotação Rápida usando Tecnologia de Subistema)
RND- *Resistance Nodulation Division* (Divisão de Nodulação de Resistência)
RNA- Ácido Ribonucléico
RNAr- Ácido Ribonucléico Ribossômico
RJ- Rio de Janeiro
SBS- *Sequencing By Synthesis* (Sequenciamento por síntese)
SENTRY- Estudo Epidemiológico: *Antimicrobial Surveillance Program*
SMR- *Small Multidrug Resistance* (Pequena Resistência à Múltiplas Drogas)
SPM- São Paulo Metallo- β -lactamases
ST- *Sequence Type* (Tipo de Sequência)
STG- Sequenciamento Total do Genoma
TBE- Tampão Tris + Ácido Borônico + EDTA
TE- Tris-EDTA-água
TSB- *Trypticase Soy Broth* (Caldo com Trypticase de Soja)
UTI- Unidade de Terapia Intensiva
VIM- Verona Imipenemase% - Porcentagem
°C- Graus centígrados
 μ g- Microgramas
 μ L- Microlitro
 β - Beta
g- Grama
HCl-Ácido Clorídrico
Kb- Kilobase
L- Litro
M- Molar

mg- Miligramas

mL- Mililitros

Nº- Número

NaCl- Cloreto de Sódio

NaOH- Hidróxido de Sódio

pb- Pares de base

pH- Potencial Hidrogeniônico

rpm- Rotação por minuto

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	21
1.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , características gerais	21
1.2. Importância Clínica	22
1.3. Tratamento e Resistência aos Antimicrobianos	23
1.4. Mecanismos de Resistência	25
1.4.1. Mecanismos de resistência associados à processos mutacionais	25
1.4.2- Mecanismos de resistência relacionados à aquisição de elementos genéticos móveis.....	31
1.4.3. São Paulo Metallo- β -lactamase (SPM-1)	33
1.4.4. Metilase de RNAr 16S RmtD	34
1.5. Clone SP / ST277	35
1.6. Sequenciamento de alto desempenho	37
2. OBJETIVOS	39
2.1 Objetivo geral.....	39
2.2 Objetivos específicos/metas.....	39
3. MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1. Seleção das amostras bacterianas.....	40
3.2 Detecção de genes <i>bla</i> _{SPM-1} , <i>rmtD</i> e <i>In163</i> por técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR).....	40
3.2.1 Extração do DNA bacteriano	40
3.2.2 Reação de amplificação dos genes de resistência	41
3.2.3 Eletroforese em gel de agarose	42
3.3. Análise da diversidade genética através da técnica de análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico após eletroforese em campo pulsado (PFGE)	43
3.4 Análise da diversidade genética através da técnica <i>Multi Locus Sequence Typing</i> (MLST).....	44
3.5 Investigação da localização dos genes <i>bla</i> _{SPM-1} , <i>rmtD</i> e <i>In163</i> através de restrição do DNA total e hibridação.....	46

3.5.1 PFGE	47
3.5.2 Transferência dos fragmentos de DNA para membrana de nylon	47
3.5.3 Hibridação.....	48
3.5.4 Detecção do DNA	48
3.6. Sequenciamento de nova geração	49
3.6.1 Preparo das amostras para o sequenciamento	49
3.6.2 Sequenciamento pelo Miseq	50
3.6.3 Montagem dos contigs.....	51
3.6.4 Identificação e anotação dos contigs contendo os genes de <i>bla</i> _{SPM-1} , <i>rmtD</i> e <i>In163</i>	51
3.6.5 Análise de mutações e deleções/inserções em genes intrínsecos de resistência	52
3.7 Fluxograma.....	54
4. RESULTADOS	55
4.1 Seleção das amostras.....	55
4.1.1 PFGE e MLST.....	55
4.1.2 PCR para detecção de <i>bla</i> _{SPM-1} , <i>rmtD</i> e <i>In163</i>	55
4.2 <i>Southern Blot</i>	57
4.2.1 Análise da restrição com a enzima I- <i>CeuI</i>	57
4.2.2. Restrição com <i>SpeI</i> e <i>XbaI</i>	58
4.3. Seleção das amostras para sequenciamento total do genoma.....	60
4.4 Resultados do sequenciamento do genoma total	61
4.4.1. Análise dos contigs contendo o gene <i>bla</i> _{SPM-1}	62
4.4.2 Análise dos contigs contendo <i>In163</i> e o gene <i>rmtD</i>	66
4.5. Correlação dos resultados de PFGE, Hibridação e Sequenciamento	73
4.6 Análise de mutações e deleções/inserções em genes intrínsecos que levam à resistência	75
4.6.1 Análise de mutações no gene <i>OprD</i> e reguladores de <i>AmpC</i>	75
4.6.2 Análise de mutações nos genes reguladores de bombas de efluxo	76

4.6.3 Análise de mutações nos genes responsáveis pela resistência às quinolonas	79
5. DISCUSSÃO	80
6. CONCLUSÃO.....	93
7. REFERÊNCIAS.....	94

1. INTRODUÇÃO

A multirresistência bacteriana é um importante problema de saúde pública, primeiro porque prejudica o regime de tratamento empírico, atrasando a administração da antibioticoterapia adequada, e segundo porque reduz as opções terapêuticas apropriadas. Esses fatores, em conjunto, aumentam os níveis de mortalidade, fazendo com que medidas que limitem a disseminação de amostras multirresistentes (MDR) sejam consideradas prioridades no controle de infecções hospitalares (1).

Bactérias MDR funcionam como reservatórios de múltiplos elementos genéticos – como genes, transposons, plasmídios e integrons - que conferem a elas o fenótipo de resistência. Uma cepa bacteriana “bem sucedida” é um veículo extremamente eficaz para disseminação desses elementos, pois eles podem ser transmitidos tanto verticalmente entre seus descendentes, quanto horizontalmente para outras amostras, espécies ou até gêneros (1).

O desenvolvimento de resistência entre patógenos Gram-negativos tem sido progressivo e preocupante. Patógenos de particular importância incluem *Enterobacteriaceae* produtoras de β -lactamases de amplo espectro, *Enterobacteriaceae* resistentes aos carbapenemas e *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes à drogas (2).

1.1. *Pseudomonas aeruginosa*, características gerais

P. aeruginosa é um bastonete Gram-negativo (0,5 a 1,0 x 1,5 a 5 μ m), móvel através de flagelo polar monotríquio, reto ou levemente curvo. É um não fermentador de glicose, que utiliza carboidratos para seu metabolismo respiratório, com o oxigênio como acceptor final de elétrons. Embora seja definido como aeróbio obrigatório, pode crescer em condições de anaerobiose utilizando nitrato ou a arginina como acceptor alternativo de elétrons (3).

São organismos amplamente distribuídos no solo, na matéria orgânica em decomposição, na vegetação e na água, mas também são encontrados no ambiente hospitalar, distribuídos em vários reservatórios, como soluções, alimentos, equipamentos de respiração artificial e de diálise. A tentativa de eliminar esses microrganismos do ambiente hospitalar é ineficiente, pois se encontram amplamente presentes em suprimentos hídricos, no mundo todo (3).

P. aeruginosa possui uma necessidade nutricional mínima, sendo capaz de utilizar muitos compostos orgânicos como fonte de carbono e nitrogênio; consegue tolerar uma ampla variedade de temperatura (4°C a 42°C); e é resistente a maioria dos desinfetantes. Estes fatores auxiliam na sua característica ubíqua na natureza (3).

Esta bactéria é pouco frequente como constituinte da microbiota de indivíduos saudáveis, podendo ser encontrada nas axilas, períneo, trato respiratório, faringe e fezes. Em pacientes hospitalizados, o aumento da frequência de colonização tem relação direta com o tempo de hospitalização e o uso de quimioterapia ou antibioticoterapia com antimicrobianos de amplo espectro (4).

Normalmente, a identificação laboratorial de *P. aeruginosa* é fácil. Crescem sem dificuldade em meios comuns de isolamento, como Agar sangue e MacConkey (3). As colônias, geralmente, são grandes, planas, com borda em difusão, e frequentemente, têm aparência de “pele de crocodilo” exibindo brilho metálico; possuem odor de uvas característico e produzem pigmentos hidrossolúveis, tais como, pioverdina (pigmento fluorescente também produzido por outras espécies de *Pseudomonas* pertencentes ao Grupo Fluorescente) e um pigmento azul característico, a piocianina. A combinação destes dois pigmentos é responsável pela cor verde brilhante, característica patognomônica das colônias de *P. aeruginosa* (5).

O genoma da *P. aeruginosa* (de 5 a 7Mb) está entre um dos maiores entre os procariotos do mundo todo, sendo que 0,3% desses genes codificam proteínas envolvidas na resistência a antibióticos (6). Uma das razões para o grande tamanho do genoma de *P. aeruginosa* é que, diferente dos patógenos humanos e animais, que são intracelulares obrigatórios e dependem das células do hospedeiro para prover muitas de suas exigências nutricionais, *P. aeruginosa* é uma bactéria de vida livre e um patógeno oportunista que deve ser nutricionalmente independente (7).

O grande tamanho e complexidade do seu genoma é provavelmente a base para a capacidade da bactéria não só prosperar em ambientes diversos e de infectar grande variedade de locais do corpo, mas também para resistir a um grande número de agentes antimicrobianos.

1.2. Importância Clínica

Dentre os bacilos Gram-negativos não-fermentadores, a *P. aeruginosa* é a espécie isolada com maior frequência em infecções humanas. Essa bactéria é um patógeno versátil, com a habilidade de causar diversos tipos de doenças clínicas. Dentre elas, podemos citar infecções do trato respiratório inferior, infecções primárias e secundárias da pele, infecções do trato urinário, infecções oculares, bacteremia, endocardite, entre outras infecções (8, 9, 10, 11).

Estudos epidemiológicos sobre a participação de *P. aeruginosa* em uma série de infecções humanas são feitos por alguns sistemas de vigilância associados a programas

internacionais. O acesso a esses dados no Brasil ainda é muito limitado, devido à escassez de trabalhos científicos nacionais. Assim, muitas vezes nos baseamos nos sistemas internacionais para inferirmos dados relativos a amostras isoladas no Brasil (9).

Um estudo feito pelo SENTRY *Antimicrobial Surveillance Program*, no período de 2008 a 2010, com o objetivo de estimar as taxas de resistência em bacilos Gram-negativos na América Latina, mostrou que *P. aeruginosa* era o principal patógeno causador de pneumonia (31,2%) e o terceiro em infecções de pele e tecidos moles (13,8%), entre pacientes hospitalizados (9).

Considerando estudos feitos em hospitais no Brasil, entre os anos de 2003 e 2008, a *P. aeruginosa* foi a causa mais frequente de infecções do trato respiratório, a segunda causa mais frequente de infecções urinárias e infecções de ferida cirúrgica, e o quinto patógeno mais comum em infecções de corrente sanguínea (12)

Esse microrganismo é o principal patógeno, tanto em importância quanto em prevalência, encontrado no pulmão dos pacientes com fibrose cística. Em geral, as crianças com infecção por *P. aeruginosa* apresentam uma redução da expectativa de vida de cerca de 10 anos, quando comparados àquelas sem infecção pela bactéria (13).

Uma extensa coleção de fatores de virulência está relacionada à grande diversidade de infecções que podem ser causadas por *P. aeruginosa*, e a gravidade das mesmas. A secreção de fatores de virulência através, principalmente, do sistema de secreção do tipo III, aumenta a gravidade dessas infecções (14). A regulação da secreção de alguns fatores de virulência como exotoxina A, elastase, pioverdina, rhamnolipídios e moléculas formadores do biofilme, ocorre por meio do sistema de sinalização bacteriana chamado quorum-sensing (QS) (15).

A habilidade de formar biofilme confere a essa bactéria maior resistência aos antimicrobianos quando comparada com aquelas não produtoras, adicionado ao fato do biofilme parecer ser capaz de inibir a fagocitose pelas células do sistema imune, conferindo assim uma vantagem na proteção bacteriana (16).

1.3. Tratamento e Resistência aos Antimicrobianos

As infecções por *P. aeruginosa* são de difícil tratamento devido à existência de limitadas escolhas terapêuticas. Essa espécie é intrinsecamente resistente a várias classes de antibióticos, além de ser capaz de se tornar resistente devido à aquisição de novos mecanismos (14).

As opções terapêuticas para o tratamento das infecções por *P. aeruginosa* incluem três grandes grupos baseado em seus mecanismos de ação: aminoglicosídeos (interferem na

síntese de proteínas) como gentamicina e amicacina; β -lactâmicos (inibidores da síntese da parede celular) como piperacilina, ticarcilina, cefalosporinas de terceira e quarta geração (ceftazidima e cefepime) e carbapenemas (imipenem e meropenem); ou fluoroquinolonas (interferem na replicação), como a ciprofloxacina (17).

Devido às altas taxas de resistência em *P. aeruginosa*, uma estratégia utilizada é a terapia combinada, sendo mais utilizada a combinação de um β -lactâmico e um aminoglicosídeo. O uso da terapia combinada é sustentado pela ampla cobertura empírica oferecida pelo uso de dois agentes com diferentes espectros de ação, no entanto, a eficiência desse método em relação à monoterapia tem sido questionada (2,18).

Bactérias Gram-negativas MDR são uma ameaça à pacientes hospitalizados, sendo associadas a taxas de mortalidade que variam de 30 a 70%. O uso inapropriado de antimicrobianos de amplo espectro contribui para emergência de microrganismos com esse perfil de resistência, uma vez que eles alteram o nicho ecológico do paciente, promovendo uma vantagem de crescimento seletiva para organismos MDR (18, 19).

Nas últimas décadas, tem sido observado um aumento dos surtos hospitalares causados por clones de *P. aeruginosa* MDR (19), um perfil diferente do observado por Bonten e colaboradores em 1999, quando essa bactéria foi associada a infecções oportunistas, endêmicas e policlonais (20). *P. aeruginosa* MDR estão entre os patógenos que demandam maiores preocupações no cenário mundial atual de resistência (2).

Nos Estados Unidos, enquanto a proporção global de infecções por *P. aeruginosa* manteve-se estável de 1986 a 2003, a proporção de amostras resistente à cefalosporinas de terceira geração, imipenem e quinolonas chegaram, em 2003, a taxas maiores que as observadas no período de 1998 a 2002 (21). Nesse mesmo país, um estudo feito entre 2000 e 2009, revelou que a prevalência de multirresistência em *P. aeruginosa* foi 15 vezes maior do que em *Enterobacteriaceae*, tanto em pneumonias hospitalares quanto em infecções da corrente sanguínea (22).

Segundo dados do SENTRY de 2012 sobre bacilos Gram-negativos da América Latina, *P. aeruginosa* e *Acinetobacter spp.* mostraram as maiores taxas de resistência à todos os compostos testados, com exceção da colistina (9).

Dados sobre as taxas de amostras MDR no Brasil são escassos, devido a falta de sistemas nacionais de vigilância, como já foi mencionado anteriormente. Contudo, dados da Rede de Monitoramento e Controle da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde da ANVISA obtidos no período de julho de 2006 a Junho de 2008, em que foram monitoradas as infecções primárias da corrente sanguínea em pacientes internados em UTIs de cerca de 70

hospitais sentinelas, mostraram que a *P. aeruginosa* apresentou taxas de resistência a ceftazidima, imipenem, ciprofloxacina, gentamicina e amicacina em torno de 50% (23).

A multirresistência limita o número de antimicrobianos disponíveis para combater essas amostras de *P. aeruginosa*. Os antimicrobianos mais utilizados para o tratamento das infecções por BGN com fenótipo MDR são os carbapenemas (2). No entanto, índices crescentes de resistência a essa droga tem sido observados. Um estudo realizado pelo SENTRY constatou que a taxa de resistência ao imipenem em amostras de *P. aeruginosa* brasileiras se mantiveram altas no período de 1997 a 2010, entre 34 e 42% (9). Por isso, a polimixina, um agente antimicrobiano com alta toxicidade usado até aproximadamente 1980, se tornou novamente uma opção para tratar infecções causadas por cepas de *P. aeruginosa* (24, 3).

1.4. Mecanismos de Resistência

Dentre os mecanismos responsáveis pela resistência intrínseca de *P. aeruginosa* aos antimicrobianos podemos destacar a baixa permeabilidade da membrana externa, sistemas de efluxo e a produção de enzimas, tais como as β -lactamases e as enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (25, 26).

Entretanto, esta bactéria também pode adquirir novos mecanismos de resistência, através da aquisição de genes de resistência em elementos genéticos móveis (ex. plasmídios) ou por mutações que alteram a expressão e/ou funcionamento de mecanismos codificados pelo cromossomo. As duas estratégias podem limitar severamente as opções terapêuticas das doenças infecciosas causadas por *P. aeruginosa* (27).

Uma ampla gama de mecanismos de resistência tem sido encontrada em *P. aeruginosa*. Como exemplo, podemos citar mecanismos que envolvem mutações gênicas que levam a alterações ou proteções de sítios alvo e superexpressão de β -lactamases intrínsecas (ex. AmpC) e sistemas de efluxo. Além desses, a aquisição de β -lactamases de espectro estendido (ESBLs), carbapenemases, enzimas modificadoras de aminoglicosídeos entre outras, comumente carregadas em diferentes elementos genéticos móveis, representam um risco epidemiológico já que esses elementos podem disseminar os genes horizontalmente entre diferentes amostras (28).

1.4.1. Mecanismos de resistência associados à processos mutacionais

Apesar da importância dos mecanismos de resistência presentes nos elementos genéticos móveis ser um consenso, a maior dificuldade enfrentada em relação às infecções causadas por *P. aeruginosa* é a sua habilidade de desenvolver resistência rapidamente durante

o curso do tratamento, o que geralmente é ocasionado por mutações em genes cromossomais (27).

Mutações que levam à resistência a diferentes antimicrobianos são frequentes em amostras de *P. aeruginosa*, superando a presença de mecanismos como as β -lactamases em alguns casos (29).

Entre os mecanismos de resistência mediados por mutações, aqueles particularmente mais notáveis são os que levam à repressão ou inativação da porina OprD, a hiperprodução da cefalosporinase AmpC, ou a superexpressão de uma das várias bombas de efluxo codificadas pelo genoma de *P. aeruginosa* (29). O acúmulo de muitas dessas mutações pode levar a emergência de amostras MDR, às vezes até pan-resistentes (30, 29).

Impermeabilidade celular através de porinas

A penetração de um antibiótico no interior da bactéria se faz primariamente através de porinas, proteínas localizadas na membrana externa da célula bacteriana que formam poros permitindo a difusão de substratos hidrofílicos através da membrana. Contudo, alterações na estrutura ou na expressão de determinada porina, de modo a restringir o fluxo para o interior da bactéria, pode acarretar simultaneamente resistência a várias classes de antibióticos (3). Dessa forma, antimicrobianos hidrofílicos, como β -lactâmicos, atravessariam a membrana externa lentamente, reduzindo o acesso aos seus alvos, as proteínas ligantes de penicilinas (PBPs) (17).

Alterações na porina OprD de *P. aeruginosa* são importantes na resistência aos carbapenemas. A sua perda pode reduzir significativamente a susceptibilidade a esses β -lactâmicos, levando à resistência ao imipenem e a redução da susceptibilidade ao meropenem, sendo nesse último caso necessário um mecanismo adicional, como superexpressão de bombas de efluxo, para tornar a bactéria resistente (31).

Trabalhos publicados mostram que mutações inativadoras no gene *oprD* são quase uma assinatura universal de resistência ao imipenem (29, 32). Alterações na expressão dessa proteína foram observadas em 87,1% das amostras de *P. aeruginosa* não sensíveis ao imipenem no Brasil (30). Índice semelhante (94%) foi encontrado em amostras resistentes aos carbapenemas isoladas na Coreia do Norte (33).

A resistência mediada pela OprD pode ocorrer tanto por mecanismos que diminuem o nível transcricional da proteína e/ou mutações que impedem a produção de uma proteína funcional. O primeiro caso inclui (i) interrupção do promotor de *oprD*, (ii) término prematuro da transcrição de *oprD*, (iii) correção com mecanismos de resistência à metais pesados,

(iv) redução mediada por salicilato e (v) co-regulação com a bomba de efluxo codificada por *mexEF-oprN*. Já no segundo caso, podem ocorrer (i) mutações, deleções e/ou inserções criando *frameshifts* e códons de parada prematuros, ou ainda (ii) a interrupção da estrutura do gene *oprD* pela inserção de um grande elemento IS (sequências de inserção) (27).

Estudos sobre possíveis regiões promotoras do gene *oprD*, baseados na amplificação da região 5', revelaram que aparentemente a *P. aeruginosa* utiliza múltiplos sítios de iniciação da transcrição e mecanismos para regular a expressão de *oprD*, dependendo da concentração de diferentes aminoácidos no meio de crescimento. Aminoácidos básicos, por exemplo, podem regular positivamente a produção da proteína OprD, agindo em sítios reguladores. Por outro lado, metais pesados como o zinco e sistemas de efluxo como MexEF-OprN e seu regulador MexT, exercem um papel de regulação negativa importante sobre o produção de OprD (27, 33).

Superexpressão de bombas de efluxo

Depois da primeira descrição de bombas de efluxo como um mecanismo de resistência em *Escherichia coli* (34), este mecanismo tem sido considerado importante determinante de resistência entre diferentes organismos, sendo codificado em plasmídios ou cromossomo (35). As bombas de efluxo podem ser específicas para um determinado agente ou classe de antimicrobiano, ou ainda podem causar resistência a múltiplas classes de drogas (35).

Os sistemas de efluxo bacteriano podem ser divididos em cinco famílias: a superfamília MF (*Major Facilitator*), família ABC [ATP (adenosine triphosphate) *Binding Cassete*], família RND (*Resistance Nodulation Division*), família SMR (*Small Multidrug Resistance*) e a família MATE (*Multidrug And Toxic compound Extrusion*). A família RND, mais comumente encontrada em bactérias Gram-negativas, é capaz de transportar uma variedade de antimicrobianos quimicamente distintos, e como a grande maioria dos sistemas de efluxo de múltiplas drogas, são codificados por genes cromossômicos (35).

Cada bomba de efluxo com múltiplos componentes contém: i) um transportador localizado na membrana, ii) um canal de membrana externa, e iii) uma proteína periplasmática de ligação, que conecta os outros dois componentes. Essa organização permite a extrusão de substratos diretamente para o meio externo, através do periplasma e da membrana externa (36).

O sequenciamento do genoma de *P. aeruginosa* revelou a presença de vários sistemas de efluxo RND. Esses sistemas podem ser divididos em três categorias, onde a bomba é: i) expressa constitutivamente, contribuindo para o fenótipo intrínseco de resistência, como MexAB-OprM; ii) induzida na presença de antibiótico adequado, como MexXY-OprM e; iii)

expressa como consequência de mutações no seu regulador, como MexEF-OprN. Quando superexpressos, esses sistemas conferem sensibilidade reduzida à diferentes classes de agentes antimicrobianos (37, 30).

Em *P. aeruginosa*, a superexpressão do sistema MexAB-OprM, está associada a resistência à meropenem, fluoroquinolonas e tetraciclinas. A superexpressão desta bomba de efluxo pode ser ocasionada por mutações em genes reguladores. Mutantes chamados de *nalB*, sofrem uma superregulação do operon *mexAB*, resultado de alterações no repressor adjacente, o gene *mexR*. Já os mutantes *nalC*, são aqueles que possuem *mexR* intacto, porém são descritos como portadores de alterações no gene *PA3721* (38).

O sistema MexXY-OprM é um dos poucos capazes de transportar aminoglicosídeos. Essa bomba de efluxo também contribui para resistência ao cefepime, tetraciclinas e macrolídeos (38, 35). As proteínas do operon *mexXY* podem ser superproduzidas como resultado de mutações que ocorrem dentro ou fora de seu gene repressor, chamado *mexZ* (antigo *amrR*) (38).

Algumas vezes, uma correlação clara entre o tipo de mutação, nível de expressão e resistência aos antibióticos ejetados não pode ser percebida para MexAB-OprM e MexXY-OprM. Existem amostras cujos reguladores negativos dessas bombas estão intactos, mas apresentam superprodução da bomba de efluxo. Assim, a existência de regulares adicionais para essas bombas de efluxo não são descartadas (38, 39, 32).

A prevalência da superexpressão de MexAB e MexXY sobre os outros sistemas de efluxo em *P. aeruginosa* pode ser percebido em vários trabalhos (30, 29, 33, 32).

Outro sistema de efluxo importante em *P. aeruginosa* é o MexEF-OprN. Amostras selvagens dessa espécie não possuem nenhuma atividade detectável desta bomba de efluxo, por possuírem o gene *mexT* (regulador positivo de *mexEFoprN*) não funcional. Em mutantes do tipo *nfxC*, a presença do regulador transcricional MexT ativo leva a expressão de MexEF-OprN, e conseqüentemente resistência à antibióticos como clorofenicol e fluoroquinolonas. Além disso, nesses mutantes, a proteína OprD está inibida pela regulação negativa de MexT, mediando resistência ao imipenem, assim como está inibida também a bomba de efluxo MexAB-OprM, mediando hipersusceptibilidade aos β -lactâmicos (37, 40).

É sugerido que a bomba MexEF-OprN esteja envolvida no efluxo de moléculas sinalizadoras do sistema QS, o que poderia contribuir para virulência da bactéria (37, 40).

Masseda e colaboradores, em um trabalho publicado em 2000, propuseram a existência de um gene regulador indireto de MexEF-OprN (*mexS*), que funcionaria como um regulador

negativo de *mexT*. Assim, os mutantes com fenótipo *nfxC* teriam *mexT* ativo e alguma mutação inativadora em *mexS* (41).

Sobel e colaboradores confirmaram a potencial função de *mexS* (*PA2491*), identificando uma alta expressão da bomba MexEF-OprN e diminuição da produção de OprD em amostras cujo o gene *PA2491* era interrompido por uma inserção (42).

O efluxo de drogas é usualmente considerado causador de um nível de resistência que vai de leve a moderado, mas desempenha um papel clínico importante devido a diminuição das opções terapêuticas, por causar resistência a mais de uma classe de drogas, e a cooperação desses sistemas com outros mecanismos, aumentando os níveis de resistência (7).

A superexpressão dos sistemas de efluxo frequentemente está associada a outros mecanismos de resistência em *P. aeruginosa*, como mostra o estudo feito por Xavier e colaboradores em 2010 (30), onde os sistemas de efluxo foram encontrados associados a distintos mecanismos, como diminuição da expressão de porinas e superexpressão de AmpC e β -lactamases secundárias, desempenhando um importante papel no fenótipo MDR de amostras clínicas *P. aeruginosa*.

Mutações na DNA girase e topoisomerase IV

Fluoroquinolonas são membros da família das quinolonas, antimicrobianos que agem como agentes bactericidas pela inibição da DNA girase e topoisomerase IV (envolvidas na regulação da topologia do DNA durante a replicação), o que impede a transcrição e replicação do DNA (39, 43).

A resistência às fluoroquinolonas, principalmente os altos níveis, é mediada predominantemente por mutações sítio-específicas nos genes da DNA girase (*gyrA* e *gyrB*) e da topoisomerase IV (*parC* e *parE*) (39, 43). Em *P. aeruginosa*, alterações dos aminoácidos das proteínas GyrA e ParC tem papel principal na resistência à essa classe de drogas, embora sistemas de efluxo tenham uma importância significativa, frequentemente ocorrendo em combinação com essas alterações (43, 44).

AmpC

P. aeruginosa possui uma β -lactamase induzível do tipo AmpC. Tipos selvagens dessa espécie produzem apenas níveis basais dessa enzima e são suscetíveis às penicilinas (piperacilina), combinações de penicilinas com inibidores (piperacilina-tazobactam), cefalosporinas e carbapenemas. No entanto, quando a produção de AmpC aumenta significativamente, *P. aeruginosa* desenvolve resistência à todos os β -lactâmicos, com

exceção das carbapenemases, embora o nível de resistência dependa do grau de desrepressão (45, 27).

Em relação à resistência aos carbapenemas, não existe um consenso sobre o papel da AmpC. De maneira geral, sugere-se que embora a superprodução dessa enzima não exerça uma função discernível, suficiente ou necessária para a resistência aos carbapenemas, quando combinada com outros mecanismos pode contribuir para a resistência a essa classe de antimicrobianos (27).

Sobre a importância clínica da superprodução de AmpC, estudos mostram que esse mecanismo é um dos mais prevalentes, e ganha ainda mais importância quando combinado à outros mecanismos de resistência (29, 33). Mesmo em pacientes tratados com o β -lactâmico apropriado, baseado nos dados de susceptibilidade, podem ocorrer falhas terapêuticas devido apenas a emergência de resistência mediada por AmpC (27).

É necessário entender os mecanismos que regulam a expressão do gene *ampC*, para futuramente identificar novas estratégias que combatam esse tipo de resistência. A superexpressão de AmpC cromossômica em *P. aeruginosa* pode ocorrer tanto por indução do gene como por um processo de desrepressão, que levam ao aumento da expressão constitutiva. O primeiro processo ocorre devido à exposição a β -lactâmicos ou inibidores de β -lactâmicos específicos, mas é reversível com a retirada do agente indutor. Já a desrepressão ocorre quando proteínas envolvidas na via de indução são comprometidas através de mutações cromossômicas, processo não reversível (27).

Para que ocorra a indução do gene *ampC* é necessário que haja uma mudança conformacional de AmpR (regulador transcricional do tipo LysR). A exposição a certos β -lactâmicos, como imipenem e cefoxitina, gera metabólitos a partir da parede celular que funcionam como cofator, interagindo com AmpR e determinando esta mudança conformacional, que altera sua interação com o DNA e converte a proteína de um repressor para um ativador transcricional da expressão de *ampC* (27, 46).

Um efeito similar ao citado acima, é obtido através de mutações inativadoras de várias enzimas envolvidas na reciclagem de peptídeoglicanos, como AmpD e DacB (PBP4). Essas enzimas modificadas participam de um processo de desrepressão de *ampC*, que será então altamente expressa, constitutivamente (46, 27).

Existem mecanismos ligados ao aumento da expressão de *ampC* que não estão relacionados com mutações em *ampR*, *ampD*, região intergênica *ampR-ampC*, nem com mudanças na expressão de *ampD*. Este fato sugere a existência de mecanismos ou vias de

regulação, que contribuam para indução de *ampC* ou para o fenótipo de desrepressão, ainda não compreendidos (27).

1.4.2- Mecanismos de resistência relacionados à aquisição de elementos genéticos móveis

Bactérias são conhecidas pela sua notável capacidade de se adaptarem em diferentes ambientes, através de um impressionante conjunto de ferramentas que permitem o ajuste do genoma da célula, alterando, adicionando ou perdendo informações genéticas. A resposta das bactérias à pressão exercida pelos antibióticos é um exemplo perfeito, pois embora as mutações exerçam um papel importante, a aquisição de genes de resistência é o fator predominante para o desenvolvimento de resistência (47).

A transferência horizontal de genes permite que bactérias adquiram rapidamente novas características complexas, desempenhando um papel chave na evolução das mesmas. Essa transferência pode ocorrer por conjugação, transdução ou transformação, mediada por elementos genéticos móveis - como plasmídios, sequencias de inserção (IS) e transposons (48, 49).

O surgimento de multirresistência associado a elementos genéticos móveis é menos previsível que a resistência mutacional, porque depende da fuga aleatória de genes do DNA celular. No entanto, uma vez que tal resistência emerge, tanto a cepa hospedeira pode se espalhar entre os pacientes quanto o gene pode se disseminar entre cepas diferentes (26).

Elementos genéticos móveis são responsáveis, virtualmente, pela mobilização e disseminação de genes de resistência a todas as classes de antimicrobianos, inclusive genes que codificam para β -lactamases (47).

Aquisição de genes codificadores de β -lactamases

β -lactamases são a causa mais comum de resistência bacteriana aos antimicrobianos β -lactâmicos. Algumas β -lactamases utilizam o zinco para quebrar o anel β -lactâmico, mas a maioria opera via mecanismo de éster de serina. A classificação dessas enzimas baseada na sequencia de aminoácidos reconhece quatro classes, designadas com as letras de A a D (50). As classes A, C e D compreendem a família das serino β -lactamases que descenderam de um ancestral comum, e a classe B contém enzimas do tipo zinco, as metalo- β -lactamases (MBLs) (51).

Em Gram-negativos, a ocorrência de β -lactamases mediando resistência é expressa tanto por meio de cromossomo quanto por plasmídios, associados ou não à elementos

genéticos móveis, como integrons, transposons e sequências de inserção. A localização desses genes nesses elementos com mobilidade facilita sua disseminação e torna mais difícil o controle das infecções (52)

As β -lactamases de maior importância mundial são as β -lactamases de espectro ampliado (ESBLs) e as carbapenemases, devido a sua capacidade de hidrolisar diferentes tipos de β -lactâmicos (53).

ESBLs são consideradas um dos maiores grupos de β -lactamases, com atividade contra antibióticos como penicilinas e cefalosporinas, deixando os carbapenemas como a última escolha para tratamento de infecções, o que resulta em uma maior pressão sobre essa classe de drogas. Com essa pressão, logo surgiram bactérias resistentes aos carbapenemas, inclusive *P. aeruginosa* (52). Um dos mecanismos de resistência mais disseminados é a produção de carbapenemases.

Carbapenemases são β -lactamases com uma versátil capacidade hidrolítica. Elas possuem a habilidade de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenemas. Essas enzimas estão incluídas nas classes A (serina- β -lactamases), B (metalo- β -lactamases) e D (oxacilinas de espectro ampliado), podendo estar em cromossomos ou plasmídios (54, 52).

As MBLs são capazes de hidrolisar todos os β -lactâmicos, exceto o aztreonam. Estas carbapenemases necessitam de cátions divalentes como cofatores enzimáticos, sendo inibidas pela ação de agentes quelantes e por componentes derivados de tióis, como o ácido tiolático ou ácido 2-mercaptopropiônico (2-MPA) (56, 55).

Infecções causadas por *P. aeruginosa* produtora de alguma MBL, possuem níveis de mortalidade maiores, provavelmente relacionados à severidade dessas infecções e demora na introdução de uma terapia antimicrobiana adequada. (57).

As MBLs emergiram no contexto mundial na década de 90, especialmente na Ásia, Europa e América do Sul (58). Atualmente são descritas centenas de MBLs sendo, IMP e VIM, as mais prevalentes no mundo. Os genes *bla_{IMP}* e *bla_{VIM}* são carregados em cassetes gênicos móveis, inseridos em integrons de classe 1 (54).

Integrons de classe 1 são os meios mais comuns onde cassetes gênicos são capazes de se movimentar de uma bactéria para outra, envolvendo sítios de recombinação conhecidos como elementos de 59 pb (56).

O microrganismo mais associado à MBLs é a *P. aeruginosa* (55). No Brasil, trabalhos demonstram a alta prevalência de enzimas MBLs em amostras de *P. aeruginosa* resistentes ao

imipenem (20 a 70%), sendo SPM-1 a mais prevalente, com taxas de prevalência de 20 a 62,8% (59, 60, 61).

1.4.3. São Paulo Metallo- β -lactamase (SPM-1)

A primeira amostra produtora da MBL SPM-1, isolada no Brasil durante o final dos anos 90, foi identificada em *P. aeruginosa* isolada de uma paciente internada no Instituto de Oncologia Pediátrica de São Paulo, Brasil (56).

Esta enzima parece estar restrita ao território brasileiro, tendo sido detectada em amostras de *P. aeruginosa* isoladas em diferentes estados (62, 63, 59).

Fora do Brasil, no entanto, esse gene já foi relatado em uma amostra de *P. aeruginosa* isolada na Suíça no ano de 2010, contudo o paciente infectado havia sido transferido do Brasil para este país (64).

Um estudo afirma que o gene *bla*_{SPM-1} estaria presente em um grande plasmídio com base em testes de hibridação (63). No entanto, a hipótese de que esse gene possa estar localizado no cromossomo não está descartada (64).

Ao contrário das outras MBLs descritas, o gene *bla*_{SPM-1} não é carregado por integrons de classe 1. Este gene tem sido descrito em uma estrutura transponível chamada de elemento ISCR4 (*insertion sequence conserved region 4*) (63).

Elementos ISCR compreendem uma única ORF (quadro de leitura aberta), cujo produto, de 500 pb em média, se assemelha muito entre os diferentes elementos ISCR e codifica uma transposase. O final 3' da ORF, e também da ISCR, compreende uma pequena seção de uma sequência conservada (47). Acredita-se que estes elementos sejam capazes de se transpor pelo mecanismo de transposição *rolling-circle*, que permite a transposição para moléculas de DNA adjacentes, por meio de uma única cópia do elemento. Nos elementos CR (*conserved region*), assim como acontece nas IS, a transposição é um sistema progressivo, onde um final do elemento, *oriIS*, serve como início da replicação, enquanto o outro, *terIS*, é o final do processo (47).

P. aeruginosa produtoras de SPM-1 geralmente exibem altos níveis de resistência aos carbapenemas, cefalosporinas de amplo espectro, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos (62). Esse acúmulo de resistência impõe uma imensa limitação para as opções terapêuticas disponíveis no tratamento de tais infecções.

Tem sido descrito em amostras positivas para *bla*_{SPM-1}, a presença de um integron de classe 1 (*In163*), com região variável de aproximadamente 4kb, contendo cassetes gênicos que conferem resistência a β -lactâmicos e aminoglicosídeos, *aacA4*, *bla*_{OXA-56} e *aadA7*, e uma sequência de inserção ISPa21 (59, 65).

Além do integron *In163*, também tem sido relatada a produção de uma metilase de RNAr 16S, RmtD, em amostras positivas para *bla*_{SPM-1}, conferindo resistência a altas concentrações de quase todos os tipos aminoglicosídeos, o que contribui para o fenótipo multirresistente dessas amostras (66, 67).

1.4.4. Metilase de RNAr 16S RmtD

Aminoglicosídeos são amplamente utilizados no cenário clínico, muitas vezes combinados com β -lactâmicos, para tratar infecções graves causadas por bactérias patogênicas Gram-negativas. O mecanismo de ação dessa classe de antibióticos envolve sua ligação ao sítio A, altamente conservado, do RNAr 16S da subunidade ribossomal bacteriana 30S, o que interfere na síntese proteica e culmina na morte do microrganismo. No entanto, a bactéria pode adquirir diferentes mecanismos de resistência a essa classe de drogas, como por exemplo, diminuição da permeabilidade da membrana, ação de sistemas de efluxo, substituição de aminoácidos em proteínas ribossomais e modificações enzimáticas da droga (68, 69).

Desde 2003, metilases de RNAr 16S tem surgido como um novo mecanismo de resistência a altas concentrações de quase todos tipos aminoglicosídeos, em amostras clínicas de bacilos Gram-negativos. Existem sete tipos dessa enzima: RmtA, RmtB, RmtC, RmtD, RmtE, ArmA e NpmA; e dessas, apenas RmtA e RmtD já foram descritas em *P. aeruginosa*, sendo que a RmtD parece estar restrita a América Latina (65, 69). Esses genes são conhecidamente mediados por plasmídios (69) e associados à transposons ou elementos semelhantes à transposons (70). Seu transporte nesses elementos genéticos móveis é provavelmente responsável pela disseminação desses genes em todo mundo (6).

O primeiro relato descritivo da enzima RmtD foi feito no Brasil, em um amostra de *P. aeruginosa* que já era carreadora do gene *bla*_{SPM-1}, em 2005 (70). A enzima conferia altos níveis de resistência a amicacina, tobramicina e gentamicina; e compartilhava 40% de identidade com RmtA. Este também foi o primeiro relato da coprodução de uma MBL e uma metilase do RNAr 16S, uma combinação que deve comprometer seriamente as opções terapêuticas para pacientes infectados uma vez que o amostra se torna MDR, a exemplo do

primeiro isolado descrito, que era resistente aos carbapenemas e a múltiplos aminoglicosídeos, sendo sensível apenas ao aztreonam e à colistina (70).

Doi e colaboradores (2008) descreveram o contexto genético do gene *rmtD* em uma amostra de *P. aeruginosa* produtora de SPM-1. Foi observado que o gene *rmtD* encontrava-se inserido no elemento ISCR14, estrutura capaz de exercer um papel vital na mobilização do gene. Esta estrutura foi observada em uma região adjacente ao *In163*, formando um integron complexo (65).

Durante a mobilização do elemento ISCR ele pode se unir a um integron de classe 1 adjacente, dando origem a um integron complexo. Acredita-se que a região terminal *terIS* da ISCR pode ser eliminada em consequência de um evento de transposição; com isso, o restante da ISCR (transposase e *oriIS*) se fundiria ao final 3'CS do integron, fornecendo à ele a base para mobilização genética, uma vez que *oriIS* e a transposase estariam intactas (47).

A partir de 2006 no Brasil, a alta prevalência de *P. aeruginosa* resistente ao imipenem que produziam RmtD começou a ser retratada, sugerindo que esse mecanismo tenha se espalhado entre os amostras de *P. aeruginosa* deste país (66).

A ocorrência de amostras coprodutoras de SPM-1 e RmtD também vem sendo mostrada, embora em níveis que variam de acordo com a origem genética, área geográfica e ano do estudo, podendo chegar a 50% em amostras do clone SP (66, 67).

Uma amostra pan-resistente coprodutora de SPM-1 e RmtD já foi isolada inclusive do ambiente, em um rio da cidade de São Paulo. Além disso, os genes *bla_{OXA-56}*, *aadA7*, *aacA4* e *sul1* também foram encontrados nessa amostra, fortes indícios da presença do *In163* (71).

1.5. Clone SP / ST277

Devido à grande disseminação de *P. aeruginosa* produtoras de SPM-1 no Brasil, estudos epidemiológicos que estabeleceram o grau de similaridade entre as amostras foram fundamentais, pois evidenciaram uma importante disseminação clonal em nosso país (62).

Através de técnicas de tipagem molecular como PFGE (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*), foi observado que amostras positivas para o gene *bla_{SPM-1}*, pertenciam, em grande maioria, a um clone chamado de clone SP. Este clone SP foi considerado epidêmico no Brasil, sendo encontrado em diversos estados brasileiros (62, 63, 72, 59).

Posteriormente, através de MLST (*Multi Locus Sequence Typing*), técnica que se baseia no sequenciamento de 7 genes de manutenção da espécie, foi observado que as amostras do clone SP pertenciam ao *Sequence Type* ST277 (73, 74).

Poucos estudos mostram a presença de SPM-1 em clones diferentes do clone SP / ST277 (67, 74).

De acordo com o banco de dados de MLST para *P. aeruginosa* (76) o ST277 já foi detectado em uma amostra isolada na Áustria, em setembro 2006. Segundo essa mesma fonte, este ST também foi encontrado na China, Austrália e mais recentemente na África Central.

Além disso, este ST possui grande proximidade filogenética com outros quatro STs descritos, apresentando apenas um alelo diferente em relação ao ST364 isolado na Áustria e os ST659 e ST758 encontrados na China, e diferença em dois alelos em relação ao ST206 (Canadá) (76). Contudo, não existem dados sobre a presença de *bla*_{SPM-1} nas amostras do ST277 isoladas nestes outros países, nem nos outros ST próximos filogeneticamente.

Dado o alto nível de interesse internacional em amostras produtoras de MBLs, e a inclusão da investigação do gene *bla*_{SPM-1} em diferentes estudos de vigilância epidemiológica (77, 78), parece improvável que *P. aeruginosa* produtora de SPM-1 esteja espalhada mundialmente.

A disseminação de um clone entre hospitais próximos poderia ser explicada pela transferência de pacientes infectados e/ou compartilhamento do mesmo profissional de saúde. Porém, a mesma justificativa não pode ser aplicada para a disseminação do clone SP no Brasil. Além disso, o fato de a maior parte dos trabalhos relatarem a presença de *bla*_{SPM-1} somente em amostras do clone SP, chama a atenção para a possibilidade de que esse gene não seja tão mobilizável quanto os outros de MBLs.

Amostras de *P. aeruginosa* produtoras de variantes alélicas da MBL VIM têm sido associadas a complexos clonais com disseminação internacional, como CC111 (ST111 e ST229) e CC235 (ST235 e ST230) em amostras da Noruega e da Suécia. Já na Espanha, MBLs do tipo VIM têm sido identificadas nos STs 155, 179 e 811. As amostras de *P. aeruginosa* que possuem MBLs do tipo IMP, pertencem a diversos STs espalhados pelo mundo (1). Portanto, a presença de um clone multirresistente produtor de SPM-1 apenas no Brasil, um país de dimensões continentais, é bastante intrigante.

Além disso, pouco se sabe sobre a localização genética do gene *bla*_{SPM-1}. Diferentes ferramentas moleculares podem ser utilizadas para a investigação da localização genética de um determinado gene. Como por exemplo, a restrição do DNA genômico e posterior hibridação com sondas específicas (7).

Recentemente, uma nova tecnologia vem transformando a investigação genética através do bom custo e efetividade para descobrir variações em grandes genomas. O sequenciamento

total do genoma (STG) tem se tornado uma chave poderosa e altamente atrativa para investigações epidemiológicas (79).

A reprodução *in silico* de técnicas como PFGE exige muito trabalho, e ainda não é vantajosa. No entanto, o custo cada vez menor do STG, tem aumentado o interesse em substituir o PCR/Sequenciamento de Sanger, utilizado para o MLST, por exemplo, por tecnologias de sequenciamento de alto desempenho. Devido a grande quantidade de informações genéticas que existem além dos sete genes analisados por MLST, métodos de alta resolução que sequenciem todo genoma são urgentemente necessários (79).

1.6. Sequenciamento de alto desempenho

Tecnologias de sequenciamento total do DNA podem ser utilizadas em uma ampla gama de objetivos, como para encontrar genes patogênicos e em estudos comparativos e evolucionários. Essas tecnologias foram idealizadas para serem rápidas, acuradas, fáceis de operar e baratas. Diferente do método de sequenciamento criada por Sanger, o sequenciamento de alto desempenho utiliza análises massivamente paralelas, com alto rendimento e de baixo custo (79, 80).

Para obter a sequência de nucleotídeos completa de um genoma, múltiplas pequenas sequências (*reads*) devem ser montadas com base na sobreposição de suas regiões (montagem *de novo*), ou através de comparações à uma sequência genômica prévia de referência (resequenciamento ou mapeamento por referência) (79, 80)

O grupo de *reads* sobrepostas é mesclado em uma sequência consenso, chamada contig. Entre os contigs, geralmente existem *gaps* que são causados principalmente por repetições dispersas ou arrançadas em sequência, não permitindo que os contigs sejam montados (79, 80).

Para tentar contornar esse e outros obstáculos encontrados na montagem do genoma, o sequenciamento pode ser realizado de maneira que o usuário escolha o tamanho do inserto (fragmento que será sequenciado) e que esse seja sequenciado pelos dois finais, gerando assim sequências maiores, pelo procedimento denominado *paired-end* (79, 81).

Os grandes desafios do sequenciamento de alto desempenho são as análises dos dados e as explicações biológicas. Além disso, as *reads* geradas são geralmente muito pequenas, o que pode tornar a montagem *de novo* do genoma um empreendimento desafiador (79, 80).

Existem diferentes empresas que oferecem diferentes tecnologias para sequenciamento de alto desempenho. A Illumina adotou a tecnologia de “sequenciamento através de síntese” (SBS), um exemplo de sequenciamento de segunda geração. A biblioteca genômica é

preparada através da fragmentação do DNA, seleção desses fragmentos por tamanho e finalmente fixação desses fragmentos à adaptadores. A biblioteca preparada é então desnaturada em fitas simples e ligada a uma superfície densamente coberta por oligos complementares aos adaptadores (*flow cell*). Em seguida, ocorre a “amplificação do DNA em pontes”, para formar grupos que contém fragmentos de DNA clonados. Antes do sequenciamento, a fita reversa é clivada e descartada, e em seguida, os iniciadores para sequenciamento são ligados aos DNA moldes. Quatro tipos de nucleotídeos (ddATP, ddGTP, ddCTP e ddTTP), que contém diferentes corantes fluorescentes cliváveis e um bloqueador removível, complementam o molde de DNA, base por base, e o sinal pode ser capturado por um “dispositivo acoplado a carga” (CCD) (79, 80, 81).

Com a incorporação da multiplexação, ou seja, uso de índices para diferenciar amostras em uma mesma biblioteca, a tecnologia de SBS permite lidar com várias amostras simultaneamente (79, 81).

O MiSeq, sequenciador de bancada lançado pela companhia em 2011, é especialmente conveniente para sequenciamento de *amplicons* e amostras bacterianas. Esse aparelho possui a flexibilidade de gerar desde uma única *read* de 36pb até *paired-end reads* de 2x300 pb (80, 81).

Com o auxílio dessa nova ferramenta para análises moleculares, será possível ampliar nosso conhecimento sobre o contexto genético dos genes *bla_{SPM-1}*, *rmtD* e do *In163* presentes no ST277, e sobre como esses elementos são mobilizados. Além disso, com os dados gerados, análises de mutações em genes intrínsecos envolvidos na resistência bacteriana à antibióticos podem ser realizadas. Essas informações contribuirão para entender o motivo que levou o clone ST277 se tornar o clone de *P. aeruginosa* mais disseminado no Brasil.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este estudo tem como objetivo investigar a contexto genético dos genes *bla*_{SPM-1} e *rmtD* e caracterizar mutações em genes cromossomais associados a multirresistência a antimicrobianos em amostras de *P. aeruginosa* pertencentes ao clone ST277.

2.2 Objetivos específicos/metapas

1) Determinar o grupo clonal e o ST, através das técnicas de tipagem molecular PFGE e MLST, de 50 amostras de *P. aeruginosa* multirresistentes, pertencentes à Coleção de Culturas de Bactérias de interesse Hospitalar / IOC (CCBH) a fim de selecionar amostras do ST277.

2) Investigar a presença dos genes *bla*_{SPM-1}, *rmtD* e Integron *In163* através de PCR e sequenciamento;

3) Avaliar a localização genética de *bla*_{SPM-1}, *rmtD* e *In163* através da restrição do DNA genômico e hibridação;

4) Realizar o sequenciamento de nova geração do DNA genômico para análise da região de interesse nas amostras selecionadas e de mutações em genes cromossômicos associados a resistência a antimicrobianos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Seleção das amostras bacterianas

Para a seleção das amostras incluídas neste estudo, foram realizadas duas técnicas de tipagem molecular (PFGE e MLST) e a detecção dos genes *bla*_{SPM-1}, *rmtD* e *In163* através de PCR, para 50 amostras de *P. aeruginosa* multirresistentes (resistentes a ceftazidima e/ou cefepime, amicacina e/ou gentamicina e ciprofloxacina), pertencentes à Coleção de Culturas de Bactérias de interesse Hospitalar / IOC (CCBH) do Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar/ LAPIH. As amostras foram recebidas no período de agosto de 2007 a novembro de 2010, oriundas de diferentes espécimes clínicos.

Para avaliação da pureza das amostras, estas foram retiradas do estoque em Agar BHI com glicerol (-20° C) e semeadas em meio seletivo indicador Agar Cystein Lactose Eletrolite Deficiente (CLED - Difco) e incubadas a 37° C por 18 a 24 horas.

A identificação das amostras de *P. aeruginosa* foi confirmada através de testes fisiológicos convencionais, tais como a caracterização morfo-tintorial após coloração pelo método de Gram, avaliação do metabolismo oxidativo da glicose utilizando-se o meio OF acrescido de glicose, avaliação da mobilidade utilizando-se o meio Motility B Medium com tetrazólio (Remel, Lenexa, KS), observação da capacidade de utilização do citrato como única fonte de carbono utilizando-se o meio de Citrato de Simmons (Difco); a capacidade de utilização de aminoácidos como a descarboxilação da Lisina, Ornitina, Arginina; produção da enzima citocromo oxidase e a capacidade de crescimento em caldo nutriente à 42°C (5, 3).

3.2 Detecção de genes *bla*_{SPM-1 -1}, *rmtD* e *In163* por técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR)

3.2.1 Extração do DNA bacteriano

O DNA total de todas as amostras do estudo foi extraído pelo método do tiocinato de guanidina com base nos critérios descritos por Caetano-Anolles & Gresshoff (1997) (83), e mantido em freezer (\pm -20°C), para a realização dos testes moleculares.

Células bacterianas contidas em uma alça, a partir de cultura recente, foram suspensas em 3mL de caldo TSB (Tryptic Soy Broth-) e submetidas a agitação “overnight” a 37°C em banho-maria. O crescimento bacteriano foi centrifugado por 10 minutos (10⁴ rpm) e o sedimento lavado 2 vezes em 1ml de solução salina fisiológica e ressuspensão em 100µL de

tampão TE (Tris 1,0M pH8,0 / EDTA 0,5M pH8,0), agitando em vórtex. Foram adicionados 500µL da solução da guanidina (1,5g/mL guanidina tiocianato/ EDTA 0,5M pH 8,0/ Água Mili Q estéril), homogeneizando por inversão e incubados por 5 minutos em freezer (\pm -20°C). Depois foram adicionados 250µL de acetato de potássio 7,5M (estocado a -20°C), homogeneizando por inversão e incubando novamente em freezer durante 5 minutos. Posteriormente foram adicionados 500µL da solução clorofórmio-álcool-isoamílico (24:1), homogeneizados até ficar uma solução de cor leitosa, que foi centrifugada por 10 minutos (10^4 rpm), obtendo uma solução de duas fases. Aproximadamente 750 µL da fase superior foram retirados e transferidos para outro microtubo contendo 380µL de isopropanol. A mistura foi levada ao freezer (-20°C) “overnight”, e no dia seguinte, foi centrifugada por 10 minutos (10^4 rpm). O sobrenadante foi desprezado, e o DNA foi então mantido no fundo como um pequeno sedimento. À este sedimento foi adicionado 150 µL de álcool 70%, e centrifugado por 10 minutos (10^4 rpm). Este procedimento foi realizado duas vezes. O sobrenadante foi desprezado, o sedimento foi secado em temperatura ambiente. Posteriormente, o sedimento foi ressuspensão em 100 µL de tampão TE, incubado por 3h horas em estufa ou banho-maria à 37°C, e estocado a -20°C.

3.2.2 Reação de amplificação dos genes de resistência

Foram realizadas reações de PCR para a detecção do gene codificador da carbapenemase SPM-1 (*bla_{SPM-1}*) e gene codificador da RNA metilase RmtD (*rmtD*) para as 50 amostras. Os iniciadores foram determinados a partir de sequencias disponíveis em trabalhos científicos publicados (Tabela 3.1) .

A fim de nos certificarmos que as amostras carregavam o integron de classe I de interesse (*In163*), realizamos PCR utilizando iniciadores que flanqueiam uma região de 1.927pb, dentro da região variável desse integron (Figura 3.1).

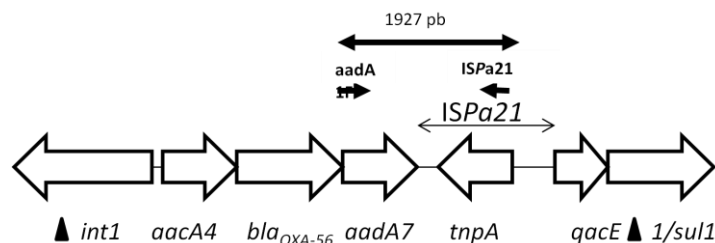


Figura 3.1: Integron *In163*, classe 1. Setas em negrito indicam a região amplificada por PCR.

A mistura da reação de PCR para detecção dos genes *rmtD* e *bla_{SPM-1}*, foi preparada em um volume final de 25 µl contendo 1 µl de DNA cromossômico (25 µg/ µl), 14,25 µl de água Milli-Q, 5 µl do tampão PCR 5X, 1,25 µl de cada iniciador (25pmoles/ µl), 0,5 µl da mistura de deoxinucleotídeos (10mM), 1,5 µl de solução MgCl₂ (25mM) e 0,25 µl de *Taq* DNA polymerase (5 u/ µl) (Go-taq Promega, Madison, WI, USA).

A mistura da PCR para detecção da região interna específica do *In163* foi preparada em um volume final de 25 µl contendo 2 µl de DNA cromossômico, 8 µl de água Milli-Q, 12,5 µl do “JumpStart REDTaq ReadyMix Reaction Mix”(Sigma) e 1,25 µl (25pmoles) de cada iniciador.

Tabela 3.1: Iniciadores e condições específicas das reações de PCR para *bla_{SPM-1}*, *rmtD* e *In163*

Genes	Referência	Iniciadores (5'-3'')	Produto (pb)	Condições da Reação de PCR
<i>bla_{SPM-1}</i>	Gales et. al., 2003 (62)	CCTACAATCTAACGGCGACC TCGCCGTGTCCAGGTATAAC	649	Desnaturação inicial: 94°C / 5 min 30 ciclos: desnaturação (94°C / 1min), anelamento (56°C / 1 min) e extensão (72°C / 1 min), Extensão final (72°C / 5 min)
<i>rmtD</i>	Castanheira et. al., 2008 (67)	GAGCGAACTGAAGGAAAAAC CAGCACGTAAAACAGCTC	729	Desnaturação inicial: 94°C / 5 min 30 ciclos: desnaturação (94°C / 1min), anelamento (50°C / 1min) e extensão (72°C / 1 min), Extensão final (72°C / 5 min)
<i>In163</i>	Carvalho et. al., 2006 (59)	<i>aadA</i> -TCGATGACGCCAACTAC <i>I_{Spa21}</i> - TGGCGTTATGTACAGGAGCA	1927	Desnaturação inicial: 94°C / 5 min 30 ciclos: desnaturação (94°C / 45 seg), anelamento (55°C / 45 seg) e extensão (72°C / 1 min), Extensão final (72°C / 5 min)

3.2.3 Eletroforese em gel de agarose

O produto de PCR obtido foi visualizado através de eletroforese em gel de agarose 1,5% diluído em TBE 0,4X (TBE Buffer 10x Promega, 4%). A eletroforese foi realizada com

tampão de corrida TBE 0,4X sob uma corrente de 100 Volts. Após a corrida eletroforética, o gel foi corado com brometo de etídio e fotografado no Transiluminador L.PIX (Loccus Biotecnologia, Cotia, São Paulo).

3.3. Análise da diversidade genética através da técnica de análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico após eletroforese em campo pulsado (PFGE)

A análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico das amostras 50 amostras de *P. aeruginosa* multirresistentes foi realizada segundo Ribot e colaboradores (2006) (84).

As amostras foram semeadas em tubos com ágar nutriente e incubadas a $\pm 35^{\circ}\text{C}$ por 24 horas para crescimento bacteriano. Após a incubação, foi preparada uma suspensão bacteriana, adicionando 1 mL de BSC (EDTA 0,5M pH 8,0, TRIS-HCl 1M pH 8) até alcançar o padrão de turvação 3 da escala de Mac Farland. Em seguida, 200 μL da suspensão foram transferidos para um microtubo tipo eppendorf contendo 5 μL de proteinase K (50 mg/ μL -Sigma) e homogeneizados por inversão. Foram adicionados à suspensão de células, 200 μL de agarose 1% contendo SDS (0,1 g de agarose low melting, 0,5 mL de SDS 1%, 9,4 mL de TE [TRIS-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 0,1 MM pH 8,0]). A mistura foi homogeneizada e distribuída em moldes. Após a solidificação dos blocos de agarose contendo DNA bacteriano (plugs), os mesmos foram transferidos para tubos contendo 2 mL de Solução de Lise [Trisma base 0,05M pH 8,0/ EDTA 0,05M pH 8,0/ N-Lauril sarcosil 1%/ Água Milli Q (q.s.p)] mais 5 μL de proteinase K (50 mg/ μL), e incubados a 50°C por 2 horas. Após a incubação, os blocos foram lavados 3 vezes com 10 mL de água MilliQ a $\pm 50^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos e uma vez com 7mL de Tampão TE a $\pm 50^{\circ}\text{C}$ por 15 minutos. Após as lavagens, os blocos foram armazenados em 2mL de TE na geladeira.

Um terço de um plug foi transferido para um microtubo tipo eppendorf contendo solução tampão da enzima de restrição *SpeI* Fastdigest (Fermentas por Thermo Scientific, Waltham, MA) (90 μL de água esterilizada e 10 μL de solução tampão da enzima) e incubadas em geladeira por 30 minutos. Posteriormente, os plugs foram tratados com o mix contendo a enzima de restrição *SpeI* Fastdigest (20 U/ μL) (5 μL de solução tampão da enzima, 0,5 μL da enzima e 44,5 μL de água MilliQ) por 3 horas a 37°C . Os fragmentos de restrição foram separados em gel de agarose 1,1%, preparado em TBE 0,4X, através de eletroforese de campo pulsado, utilizando o sistema CHEF-DRIII (Bio-Rad, Richmond,

EUA). Foram utilizadas as seguintes condições para a corrida eletroforética: pulso crescente de 5 a 35 segundos, por 13,5 horas a 6V/cm, na temperatura de 13°C. Foram utilizados padrões de peso molecular Lambda Leader PFG Marker (50 ug/mL - New England BioLabs, Ipswich, MA) nas corridas (59).

Após as corridas eletroforéticas, os géis foram corados com brometo de etídio, visualizados sob luz UV e fotografados, utilizando-se ferramenta de fotodocumentação Transiluminador L.PIX (Loccus Biotecnologia). As análises dos géis e a confecção dos dendrogramas foram realizadas com auxílio do software BioNumerics (versão 6.6, Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Os agrupamentos foram realizados utilizando o coeficiente de *Dice*, e os valores de otimização e tolerância de 1,5%. O percentual de similaridade usado foi acima de 80% para que as amostras pertencessem ao mesmo grupo clonal.

3.4 Análise da diversidade genética através da técnica *Multi Locus Sequence Typing* (MLST)

Foram selecionadas para tipagem por MLST uma amostra representativa de cada grupo clonal encontrado através da técnica de PFGE, além de uma amostra representativa de cada subgrupo (similaridade $\geq 90\%$) do grupo clonal mais prevalente.

Sete genes conservados (*acsA*, *aroE*, *guaA*, *mutL*, *nuoD*, *ppsA* e *trpE*) foram amplificados separadamente, em uma reação de PCR com volume final de 25 μ l contendo 1 μ l de DNA cromossômico (25 μ g/ μ l) (Item 3.2.1), 10 μ l de água Milli-Q, 12,5 μ l do “JumpStart REDTaq ReadyMix Reaction Mix” (Sigma) e 0,75 μ l (25pmoles) de cada iniciador. As condições de amplificação foram as mesmas para todos os genes investigados, conforme descrito no site (76): 1 minuto de desnaturação à 96°C e 30 ciclos de 1 minuto de desnaturação à 96°C, 1 minuto de anelamento de iniciadores à 55°C e 1 minuto de extensão à 72°C, com uma extensão final de 10 minutos à 72°C (Tabela 3.2).

Tabela 3.2. Iniciadores e condições específicas das reações de PCR e sequenciamento do esquema de MLST para *P. aeruginosa* conforme descrito por Curran e colaboradores (2004)

	Gene	Iniciadores (5' para 3')		Tamanho do amplicon (pb)
		<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>	
<i>acsA</i>	Amplificação	ACCTGGTGTACGCCTCGCTGAC	GACATAGATGCCCTGCCCTTGAT	842
	Sequenciamento	GCCACACCTACATCGTCTAT	AGGTTGCCGAGGTTGTCCAC	390
<i>aroE</i>	Amplificação	TGGGGCTATGACTGGAAACC	TAACCCGGTTTTGTGATTCCTACA	825
	Sequenciamento	ATGTCACCGTGCCGTTCAAG	TGAAGGCAGTCGGTTCCTTG	495
<i>guaA</i>	Amplificação	CGGCCTCGACGTGTGGATGA	GAACGCCTGGCTGGTCTTGTGGTA	940
	Sequenciamento	AGGTCGGTTCCTCCAAGGTC	GACGTTGTGGTGC GACTTGA	372
<i>mutL</i>	Amplificação	CCAGATCGCCGCCGGTGAGGTG	CAGGGTGCCATAGAGGAAGTC	940
	Sequenciamento	AGAAGACCGAGTTCGACCAT	GGTGCCATAGAGGAAGTCAT	441
<i>nuoD</i>	Amplificação	ACCGCCACCCGTA CTG	TCTCGCCCATCTTGACCA	1.044
	Sequenciamento	ACGGCGAGAACGAGGACTAC	TGGCGGTCCGGTGAAGGTGAA	366
<i>ppsA</i>	Amplificação	GGTCGCTCGGTCAAGGTAGTGG	GGGTTCTCTTCTTCCGGCTCGTAG	989
	Sequenciamento	GGTGACGACGGCAAGCTGTA	GTATCGCCTTCGGCACAGGA	369
<i>trpE</i>	Amplificação	GCGGCCAGGGTCGTGAG	CCCGGCGCTTGTTGATGGTT	811
	Sequenciamento	TTCAACTTCGGCGACTTCCA	GGTGTCCATGTTGCCGTTCC	441

Os produtos amplificados foram corridos em gel de agarose 1,5%, e após confirmada a amplificação, através da observação da banda do tamanho esperado no gel corado, os mesmos foram purificados através de kit GFX PCR DNA Purification Kit” (GE Healthcare Life Science, Reino Unido).

Os amplicons purificados foram sequenciados, usando os iniciadores mostrados na Tabela 3.2, com o sequenciador 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems, Carlsbad, California), da Plataforma de Sequenciamento de DNA- PDTIS do Laboratório de Sequenciamento e Bioinformática do IOC- FIOCRUZ.

A análise da qualidade das sequências obtidas foi realizada com auxílio do software Phred (versão 19.0), onde somente as sequências que obtiveram escore ≥ 20 foram individualmente analisadas. As sequências *forward* e *reverse* de cada gene foram analisadas no programa BioEdit Sequence Alignment Editor versão 7.2.5 (Hall, 1999).

Foi realizado alinhamento múltiplo entre as sequências correspondentes a determinado gene em cada amostra, usando como referência a sequência do alelo correspondente no ST277, que estava disponível no site *P. aeruginosa* MLST database (76). Os alelos diferentes ao correspondente no ST277 foram então identificados através de ferramentas disponíveis no mesmo site. Qualquer alelo que não apresentasse *match* com aqueles existentes no banco de dados foram considerados “novos”. Para cada amostra então, foram dados 7 números que representam os alelos de cada um dos 7 genes sequenciados, e o conjunto desses sete números recebeu um novo número de identificação, correspondendo ao seu tipo (ST: *Sequence type*). Qualquer amostra que não possuísse *match* com tipos depositados no banco de dados foram consideradas “novos STs”.

3.5 Investigação da localização dos genes *bla*SPM-1 , *rmtD* e *In163* através de restrição do DNA total e hibridação.

De acordo com os resultados obtidos no item 3.4, foram selecionadas amostras representativas do ST277, que carregavam *bla*_{SPM-1} e/ou *rmtD*, para a investigação da localização genética destes genes e do *In163*, através de PFGE com as enzimas de restrição *Xba*I , *Spe*I e *I-Ceu* I, seguido de hibridação com sondas específicas.

3.5.1 PFGE

A extração do DNA para a realização do PFGE foi realizada conforme descrito no item 3.3. As condições para a digestão com a enzima *SpeI* Fast Digest (Fermentas) também já foram especificadas anteriormente (item 3.3).

Para a digestão com *XbaI* (Promega), os plugs foram colocados em solução tampão da enzima (90 µL de água MilliQ e 10 µL de solução tampão da enzima) e incubados em geladeira por 30 minutos. Posteriormente, foram tratados com o mix contendo a enzima de restrição *XbaI* (5 µL de solução tampão da enzima, 3 µL da enzima (40U/µL), 0,5 µL de BSA e 41,5µL de água MilliQ) por 3 horas a 37°C. Foram utilizadas as seguintes condições para a eletroforese: pulso crescente de 0,5 a 30 segundos, por 14 horas a 6V/cm, na temperatura de 13°C.

Os procedimentos para a enzima *I-CeuI* Cut Smart (New England BioLabs) se seguiu de maneira semelhante às demais. Os plugs foram colocados em solução tampão da enzima (90 µL de água MilliQ e 10 µL de solução tampão da enzima) e incubados em geladeira por 30 minutos. Posteriormente, foram tratados com o mix contendo a enzima de restrição *I-CeuI* (5 µL de solução tampão da enzima, 0,8 µL da enzima (5 U/µL) e 44,2 µL de água MilliQ) por 1 hora a 37°C. Foram utilizadas as seguintes condições para a eletroforese: pulso crescente de 20 a 100 segundos, por 20 horas a 6V/cm, na temperatura de 13°C.

O padrão de peso molecular utilizado foi Lambda Leader PFG Marker (50 ug/mL - New England BioLabs) em todas as corridas.

Os fragmentos de restrição obtidos após a digestão foram separados em gel de agarose 1%, preparado em TBE 0,4X (TBE Buffer 10x Promega 4%), através de eletroforese de campo pulsado, utilizando o sistema CHEF-DRIII (Bio-Rad). Os géis foram corados com brometo de etídeo e fotografados ao lado de uma régua milimetrada, utilizando a ferramenta de fotodocumentação Image Master VDS (Pharmacia Biotech).

3.5.2 Transferência dos fragmentos de DNA para membrana de nylon

Após a realização da técnica de PFGE, os fragmentos obtidos foram transferidos para membrana de nylon (Amersham Hybond -N Blotting Membranes, GE Healthcare Life Sciences) por vácuo, seguindo protocolo adaptado ao descrito por Sambrook & Russell (2001) (85).

Uma membrana de nylon com as dimensões do gel de PFGE foi umedecida em água destilada e solução de SSC 20x (3M NaCl, 0,3M Na₃.citrato) e colocada no equipamento VacuGene™ XL Vacuum Blotting System (GE Healthcare) sob um buraco na máscara de

plástico, e sobre esse buraco foi colocado o gel de PFGE, de modo a formar um ambiente com pressão de 50cm.H₂O de vácuo entre gel e membrana, com o auxílio de uma bomba vácuo.

Foi colocado sobre o gel aproximadamente 300mL, das soluções de depurinação (HCl 0,25M), solução de desnaturação (1,5M NaCl / 0,5M NaOH) e solução de neutralização (1,5M NaCl / 0,5M Tris-base / 1mM Na₂.EDTA.2H₂O, pH ajustado para 7.5 com HCl), consecutivamente, por 15 minutos cada solução. Retirada a solução de neutralização, esta foi substituída pela solução de SSC 20x, por 2,5 horas. Removida a solução de SSC 20x, os poços do gel foram marcados à lápis na membrana, e em seguida a mesma foi exposta a luz UV por 5 minutos para que o DNA fosse fixado.

Para confirmar a efetividade da transferência, o gel foi recorado com brometo de etídeo por 15 minutos e visualizado no equipamento Transiluminador L.PIX, a fim de observarmos a ausência de bandas.

3.5.3 Hibridação

As sondas usadas foram produzidas a partir de produtos de PCR dos genes *bla*_{SPM-1}, *rmtD* e *In163*. As sondas foram marcadas com digoxigenina usando o kit digoxigenin PCR DIG probe synthesis (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). A sonda produzida (50µL) foi então submetida a desnaturação através de aquecimento a 100°C por 10 minutos, e imediatamente depois foi colocada em gelo. A membrana foi colocada em solução de pré-hibridação (SSC 5x, 0,1% N-laurilsarcosil, 0,02% SDS, 2% Agente Bloqueador - marca) por 1 hora à 62°C sob agitação, no forno de hibridação (Techne hybridiser HB-1D, Techne, Cambridge, U.K.). Após a retirada desta solução, a membrana ficou “overnight” em solução de hibridação contendo a sonda desnaturada, à temperatura calculada de acordo com o conteúdo GC do alvo da sonda (*bla*_{SPM-1}: 50°C, *In163* e *rmtD*: 62°C).

Retirada a solução de hibridação, a membrana foi lavada por 5 minutos à temperatura ambiente em solução de baixa estringência (SSC 2x, 0,1% SDS), seguida de 15 minutos à 62°C em solução de alta estringência (SSC 0,1x, 0,1% SDS), duas vezes para cada solução em agitação.

3.5.4 Detecção do DNA

Após as lavagens com as soluções de baixa e alta estringência, a membrana foi pré-lavada em Tampão 1 (100 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl) e tratada com 100mL de Tampão 2 (Tampão 1 + 1% Agente Bloqueador), por 30 minutos. Em seguida, para completa remoção do Tampão 2, a membrana novamente rinsada em Tampão 1, e posteriormente incubada em solução de anticorpo (25 mL tampão 1 e 5µL de anticorpo anti-DIG conjugado a

fosfatase alcalina – Roche) por 30 minutos. Passado o tempo necessário, a solução de anticorpo foi removida, e a membrana lavada duas vezes, por 10 minutos, em Tampão 1. Por fim, ela foi equilibrada em Tampão 3 (100mM Tris-base, 100mM NaCl, 50mM MgCl₂.6H₂O, pH 9.5 ajustado com HCl), por 2 minutos.

Para a etapa final, a membrana foi colocada em um saco plástico junto com a solução reveladora do tipo substrato alcalino fosfatado conjugado, seguindo as instruções do fabricante (Bio-Rad). Essa etapa foi realizada em ambiente com pouca luz, e a membrana foi armazenada em ambiente escuro de 2 a 24h.

Para mensurar a banda marcada com a sonda específica, foi medida a distância entre a banda e o poço do gel com auxílio de uma régua milimetrada. Através da inspeção visual, observamos na foto do respectivo gel de PFGE, tirada ao lado de uma régua milimetrada, à qual banda correspondia aquela determinada altura. O peso molecular da banda marcada foi determinado com o auxílio do software Bionumerics 6.6.

3.6. Sequenciamento de nova geração

O sequenciamento total do genoma foi realizado a fim de montar e analisar a região do DNA em torno dos genes *bla*_{SPM-1} e *rmtD*, e o *In163*, além de analisar mutações em genes intrínsecos associadas a resistência à antimicrobianos. Para isso, foram selecionadas amostras que variavam quanto a presença dos genes de interesse (*bla*_{SPM-1}, *rmtD* e *In163*), e que apresentaram diferentes perfis de hibridação. Todas as etapas do sequenciamento total foram realizadas em colaboração com o Dr. Rodolpho Mattos Albano, professor do Departamento de Bioquímica da UERJ.

A plataforma de sequenciamento MiSeq (Illumina Inc., San Diego, CA, Estados Unidos) foi utilizada para o sequenciamento genômico das amostras de *P. aeruginosa*.

3.6.1 Preparo das amostras para o sequenciamento

Inicialmente, o DNA total das amostras selecionadas foi extraído pelo método de Tiocianato de Guanidina, purificado com o Kit de Purificação de DNA PureLink (Invitrogen por Life Technologies, Carlsbad, Califórnia) e em seguida foi medida a quantidade de DNA em cada amostra.

As etapas de preparação da biblioteca genômica foram realizadas seguindo as recomendações do kit de preparação de amostra Nextera® XT DNA (Illumina). Os principais passos envolveram i) uma reação de tagmentação de 5 minutos usando transposons que

cortaram e inseriram ao DNA adaptadores para sequenciamento em suas extremidades e iii) uma reação simples de PCR para adicionar à esses adaptadores, iniciadores para o sequenciamento e índices específicos. Foram sequenciadas 8 amostras por corrida, por isso usamos 8 índices diferentes.

Depois da reação de PCR, o DNA foi purificado com o uso de esferas magnéticas, que fazem parte do kit de preparação de amostra Nextera® XT DNA (Illumina). Os fragmentos de DNA se ligam à superfície magnética, separando-os de outros componentes contaminantes. Para essa etapa, 50µL da reação de PCR foram adicionados à 30µL de solução com as esferas. A mistura foi homogeneizada 10x com pipetador, e deixada em repouso por 5 minutos. O tubo contendo a reação foi posto sobre uma placa imantada, para retirada do sobrenadante. As esferas foram então lavadas com 200µL de solução de etanol 80% por 30 segundos, duas vezes. Após essa etapa, os fragmentos de DNA ligados às esferas foram ressuspensos em 52,5µL de Tampão, à 37°C por 40 segundos.

Foi usado o controle interno de sequenciamento PhiX-174, preparado de acordo com as instruções da Illumina.

3.6.2 Sequenciamento pelo Miseq

O sequenciamento *paired-end* da biblioteca genômica foi realizado através de duas corridas, 2x150pb e 2x250pb (ciclo de 300 e 500), usando o aparelho MiSeq (Illumina).

Para cada corrida utilizamos um Kit de Reagentes para MiSeq novo, contendo uma *flow cell* e reagentes necessários para uma corrida. A *flow cell* consiste em uma base de vidro na qual são gerados os *clusters* e o sequenciamento é realizado. Durante a corrida de sequenciamento, a base de vidro é fotografada em pequenas áreas chamada de *tiles* (82).

Antes de iniciar o sequenciamento, a biblioteca genômica (item 3.6.1) foi aplicada em um dos poços do Cartucho de Sequenciamento MiSeq. O Cartucho de Sequenciamento MiSeq é de uso único por corrida, e consiste em reservatórios preenchidos de reagentes para *clusterização* e sequenciamento, suficientes para o sequenciamento de uma *flow cell* (82).

Usando o Software de Controle MiSeq, foram seguidas as instruções do fabricante para carregar a *flow cell* e os reagentes, e assim iniciar a corrida (82).

Para realizar a *clusterização*, moléculas de DNA de fita simples são ligadas à superfície da *flow cell* e em seguida, amplificadas por ponte para formar *clusters*. Após a *clusterização*, são geradas imagens dos *clusters* com o uso de combinações de filtro e LED específicas para cada um dos quatro didesoxinucleotídeos marcados de forma fluorescente.

Após a conclusão da geração da imagem de um bloco da *flow cell*, esta é removida de lugar para expor o próximo bloco. O processo é repetido para cada ciclo de sequenciamento. Após a análise das imagens, o programa realiza a análise primária, que inclui chamada de base, filtragem e pontuação de qualidade (82).

3.6.3 Montagem dos contigs

A análise da qualidade das *reads* obtidas foi realizada com auxílio do software Phred (versão 19.0), onde somente as sequencias que obtiveram ≥ 20 foram utilizadas. Para montagem *de novo* dos contigs, com as *reads* oriundas das corridas de 300 e 500 ciclos, utilizamos o programa Geneious versão 6.1.7 (Biomatters Ltd., Auckland, New Zealand).

A cobertura dos contigs foi avaliada segundo sugerido por Normand & Yanai (2013) (80). A média de cobertura para cada amostra sequenciada foi igual ao comprimento das *reads* de cada ciclo (150 para o ciclo de 300 e 250 para o ciclo de 500) multiplicado pelo número de *reads* geradas neste ciclo, e esse total foi dividido pelo tamanho do genoma estimado pelo servidor RAST (*Rapid Annotation using Subsystem Technology*, Aziz et. al. 2008) versão 4.0, após o depósito dos contigs correspondentes a cada amostra nesse sistema (Figura 3.2).

$$\text{Média de cobertura} = \frac{\text{Tamanho da read (150 ou 250)} \times \text{Número de reads}}{\text{Tamanho do genoma}}$$

Figura 3.2: Cálculo da média de cobertura dos contigs montados para cada amostra, segundo Normand & Yanai (2013) (80).

A média final de cobertura dos contigs de cada amostra foi igual a soma da média de cobertura para a corrida de 300 ciclos, mais a média da corrida de 500 ciclos. Geralmente, uma cobertura de 30x é o mínimo necessário para identificar variações genômicas (80).

3.6.4 Identificação e anotação dos contigs contendo os genes de *bla_{SPM-1}*, *rmtD* e *In163*

Todos os contigs gerados foram depositados no servidor RAST versão 4.0, disponível online (<http://rast.nmpdr.org/>). Utilizamos a ferramenta “blast search”, oferecida pelo *software*, para encontrar os contigs que continham os genes de interesse (*bla_{SPM-1}*, *rmtD* e

In163). Para isso, utilizamos as sequências de nucleotídeos depositadas no GenBank: ISCR4 contendo o gene *bla_{SPM-1}* (Genebank AY341249.1) (Figura 3.3), e uma sequência que compreende o *In163* e o ISCR14 contendo o *rmtD* (GenBank DQ914960) (Figura 3.4).

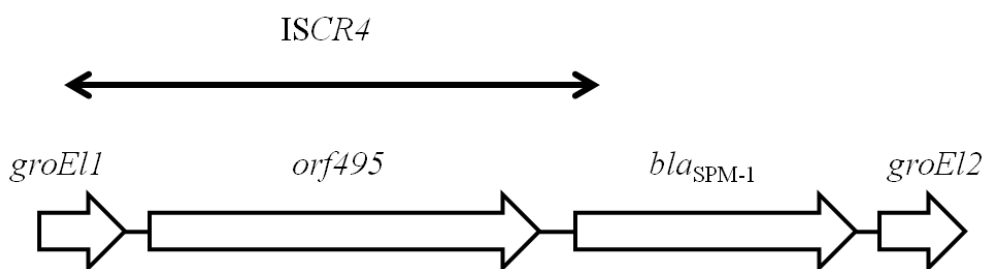


Figura 3.3: Imagem ilustrativa do elemento genético móvel ISCR4, contendo a *orf495* e o gene *bla_{SPM-1}*, flaqueados por genes *groEL* conforme descrito por Poirel e colaboradores, 2004. (GenBank AY341249.1) (63).

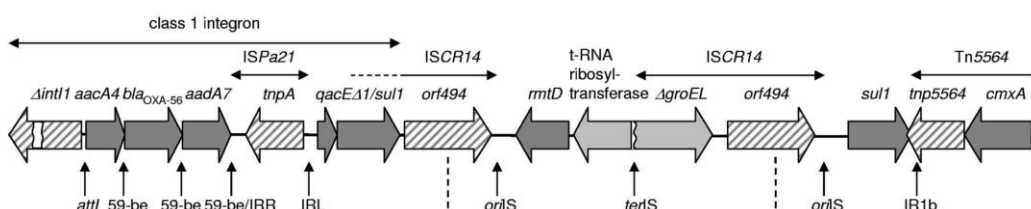


Figura 3.4: Figura retirada do artigo de Doi e colaboradores, 2008 (65). Imagem ilustrativa do integron de classe 1 *In163* seguido do elemento genético móvel ISCR14, onde está contido o gene *rmtD* (GenBank DQ914960)

Utilizando a plataforma BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) do NCBI (National Center for Biotechnology Information), realizamos o blastn dos contigs encontrados, para anotação manual dos mesmos.

Para a construção de consensos entre contigs complementares e montagens por referência e foi utilizado o software Geneious versão 6.1.7.

O consenso final obtido foi depositado na plataforma RAST, e foram utilizadas as predições de ORFs oferecidas por essa plataforma.

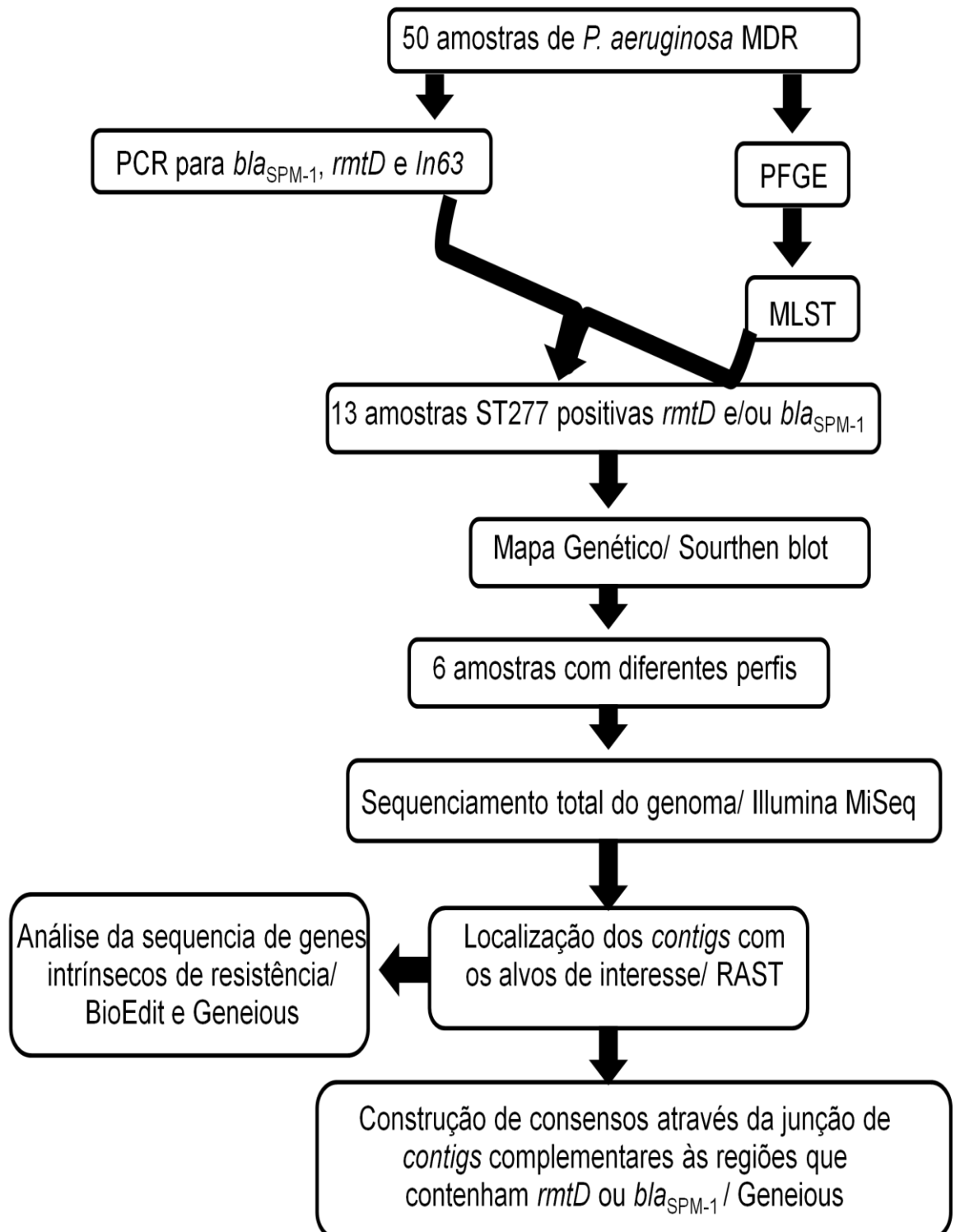
3.6.5 Análise de mutações e deleções/inserções em genes intrínsecos de resistência

Para a análise de resistência aos antimicrobianos associada a mutações em genes intrínsecos da bactéria, avaliamos os genes: *oprD*; reguladores da bomba de efluxo *mexAB-oprM* (*mexR* e *PA3721*); regulador da bomba de efluxo *mexXY-oprM* (*mexZ*); reguladores da bomba de efluxo *mexEF-oprN* (*mexT* e *mexS*); reguladores da expressão de *ampC* (*ampDe* *dacB*); além dos genes *parE*, *parC*, *gyrA* e *gyrB*.

As sequências nucleotídicas dos genes de interesse, obtidas de todas as amostras, foram comparadas com as sequências correspondentes na cepa selvagem PAO1-UW, disponível no banco de dados “*Pseudomonas Genome Database*” (86).

Os *contigs* que possuíam o gene de resistência alvo foram encontrados através da ferramenta “blast search” do servidor RAST. Através do pacote BioEdit Sequence Alignment Editor versão 7.2.5, realizamos alinhamento par a par (algoritmo ClustalW) entre o contig desejado e o gene referência correspondente. As regiões que não apresentaram identidade com o gene foram cortadas do contig. O gene de interesse foi assim obtido do genoma de cada amostra. Por conseguinte, através do pacote Geneious 6.1.7, foi feito o alinhamento múltiplo de nucleotídeos e depois de aminoácidos, utilizando os algoritmos ClustalW e MUSCLE respectivamente, utilizando os genes de todas as amostras mais a sequência referência.

3.7 Fluxograma



4. RESULTADOS

4.1 Seleção das amostras

4.1.1 PFGE e MLST

Entre as 50 amostras de *P. aeruginosa* MDR, foram verificados 13 grupos clonais diferentes que foram designados pelas letras A – M . O grupo clonal mais frequente foi o A, encontrado em 36% (n=18) das amostras. Este grupo clonal foi subdividido em 8 perfis eletroforéticos, designados A1 – A8, agrupados com percentual de similaridade maior ou igual a 90%.

A partir do dendograma obtido (Figura 4.1), foram selecionadas para realização de tipagem através do MLST, um total de 20 amostras, sendo uma amostra representativa de cada grupo clonal e um exemplar de cada subgrupo do grupo clonal A. Através do MLST foram obtidos 8 STs diferentes. Todas as amostras pertencentes ao grupo clonal A (n=8), apresentaram o mesmo ST (ST 277). A amostra CCBH5698 (grupo clonal M) também pertence ao ST277. No PFGE, este clone apresentou 75% de similaridade com o grupo clonal A (Figura 4.1).

4.1.2 PCR para detecção de *bla*_{SPM-1}, *rmtD* e *In163*

Foi realizada PCR para a detecção dos genes *bla*_{SPM-1} e *rmtD* e da região variável do *In163* (1.927pb) para as 50 amostras. Destas, 7 (14%) foram positivas para *bla*_{SPM-1}, todas pertencentes ao ST277, sendo 6 do grupo clonal A e uma do grupo clonal M (CCBH5698). Em relação ao *rmtD*, foram encontradas 27 (54%) amostras positivas, sendo que 55% (15/27) destas pertenciam ao ST277. A coprodução de *bla*_{SPM-1} e *rmtD* foi igual a 12% (6/50). A maioria das amostras do ST277 foi positiva para o *In163* (84%, 16/19). As demais amostras do estudo apresentaram resultado negativo nessa PCR (Figura 4.1)

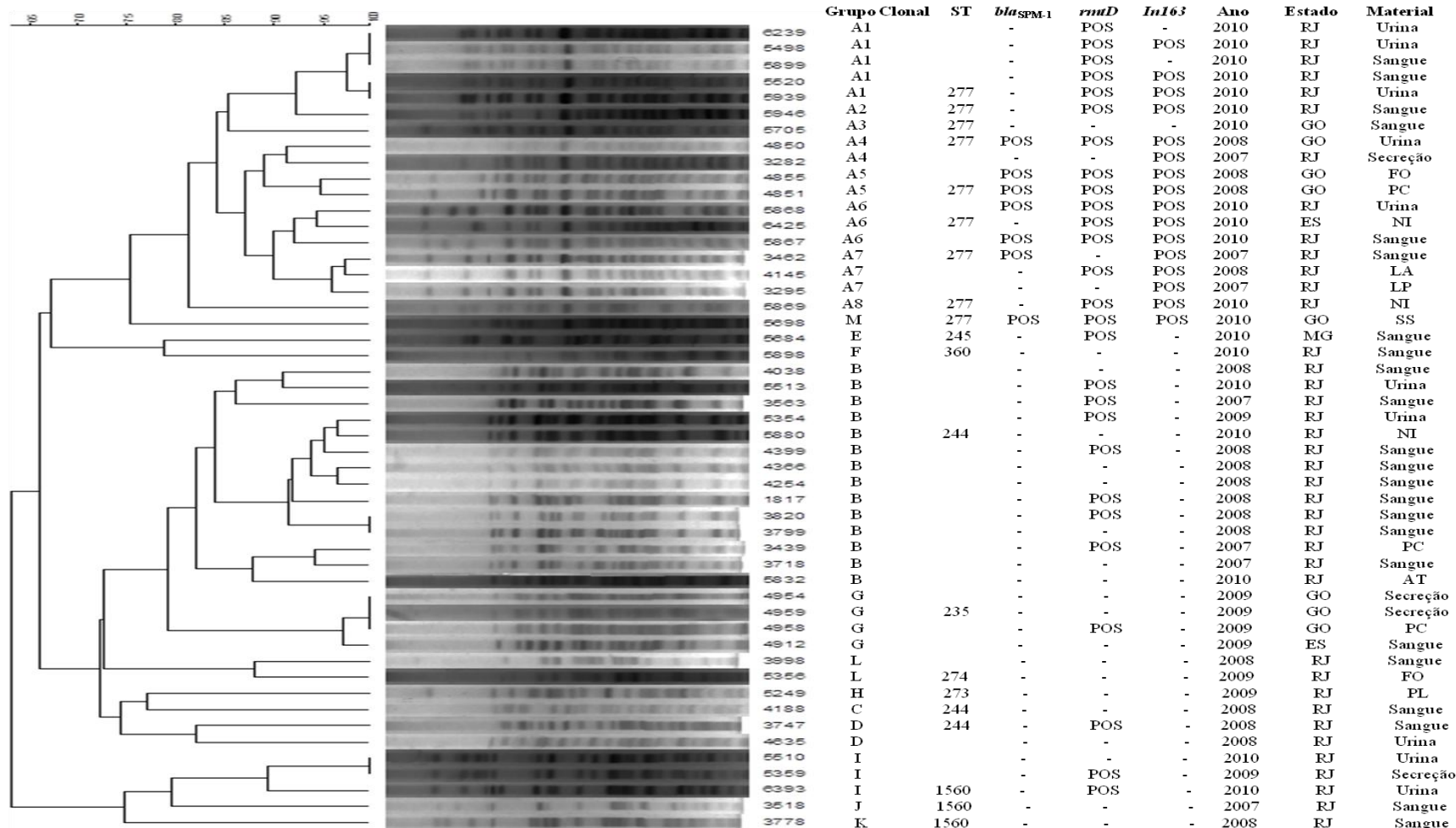


Figura 4.1: Perfis de fragmentação do DNA e dendrograma das 50 amostras de *P. aeruginosa* gerados pelo BioNumerics. Inclui-se também os resultados do MLST e das PCRs para *bla*_{SPM-1}, *rmtD* e *In163*; além dos dados clínicos das amostras. FO-Fragmento Ósseo; PC-Ponta de catéter; NI- Não Informado; LA-Líquido Ascítico; LP- Líquido de Preservação; SS-Swab de Secreção; AT- Aspirado Traqueal; LPL-Líquido Pleural

4.2 Southern Blot

Como o contexto genético amplo dos genes *bla*_{SPM-1} e *rmtD* e do *In163* ainda não é sabido, a primeira etapa foi a construção de um mapa de restrição referente à localização desses três alvos de interesse. As amostras foram submetidas à digestão com as enzimas já mencionadas na metodologia, e hibridadas com sondas específicas para os genes *bla*_{SPM-1}, *rmtD* e *In163*.

Para esta análise foram selecionadas 13 amostras do ST277 (Tabela 4.1). A amostra CCBH4855 não entrou nesta seleção, pois seu perfil de PFGE foi muito semelhante à CCBH4851, e os resultados da PCR para essas duas amostras foram idênticos. As amostras CCBH6239 e CCBH5899 também não entraram na análise por serem idênticas à CCBH5498 (Figura 4.1).

Tabela 4.1: Perfil das amostras selecionadas para construção do mapa genético

CCBH	Ano	Estado	<i>bla</i> _{SPM-1}	<i>rmtD</i>	<i>In163</i>	PFGE	ST
3462	2007	RJ	pos	neg	pos	A7	277
4850	2008	GO	pos	pos	pos	A4	277
4851	2008	GO	pos	pos	pos	A5	277
4145	2008	RJ	neg	pos	pos	A7	277
5698	2010	GO	pos	pos	pos	M	277
5867	2010	RJ	pos	pos	pos	A6	277
5868	2010	RJ	pos	pos	pos	A6	277
5498	2010	RJ	neg	pos	pos	A1	277
5520	2010	RJ	neg	pos	pos	A1	277
5869	2010	RJ	neg	pos	neg	A8	277
5939	2010	RJ	neg	pos	pos	A1	277
5946	2010	RJ	neg	pos	pos	A2	277
6425	2010	ES	neg	pos	pos	A6	277

4.2.1 Análise da restrição com a enzima *I-CeuI*

Para avaliar se os genes *bla*_{SPM-1} e *rmtD*, além do *In163*, possuem localização plasmidial ou cromossômica, utilizamos a enzima *I-CeuI*. O perfil de fragmentação obtido com essa enzima foi submetido à hibridação com as sondas para os alvos de interesse, no entanto encontramos apenas marcações no poço para as sondas *In163*, *rmtD* e *bla*_{SPM-1}. A Figura 4.2 representa o perfil de fragmentação obtido após a digestão com *I-CeuI* e a hibridação com a sonda para o *In163*.

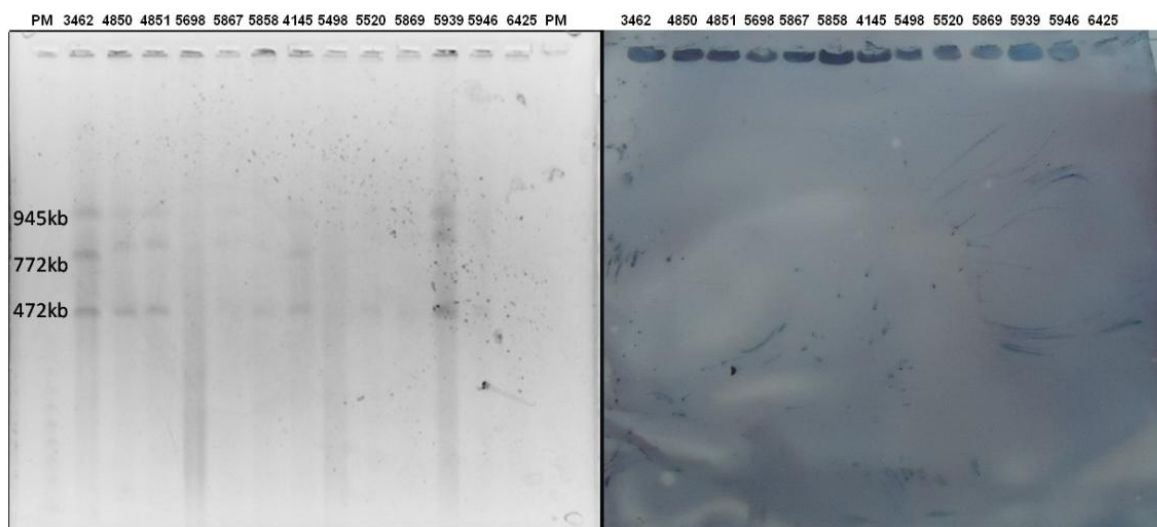


Figura 4.2: Gel com os perfis de fragmentação obtidos com a digestão pela enzima *I-CeuI* e membrana de nylon marcada com a sonda do *In163* das 13 amostras selecionadas.

4.2.2. Restrição com *SpeI* e *XbaI*

O perfil de hibridações com as sondas específica para *bla_{SPM-1}*, *rmtD* e *In163*, após digestão com as enzimas *SpeI* e *XbaI*, podem ser vistos nas Figuras 4.3 e 4.4 e na Tabela 4.2.

Após a digestão com a enzima *SpeI* e hibridação com sonda para *bla_{SPM-1}*, apenas para uma amostra positiva para *bla_{SPM-1}*, CCBH4850, não foi possível observar marcação de banda. Nas demais, observamos marcações correspondentes a uma banda de 8kb para as amostras CCBH3462 e CCBH4851; uma banda de 19kb, para CCBH5867 e CCBH5868; e para CCBH5698 (clone M) essa banda foi de 30kb. Com a sonda do gene *rmtD*, encontramos marcação nas bandas de 24kb para a maioria das amostras, com exceção de CCBH4851 (145,60kb) e CCBH5698 (508,05kb), além das CCBH5867 e CCBH5868 que não apresentaram marcação. Para o *In163*, encontramos marcações em poucas amostras: CCBH3462 (401kb), CCBH5698 (508kb), CCBH5868 (24kb) e CCBH5939 com duas marcações (401kb e 24Kb) (Figura 4.3).

Em relação a digestão com a enzima *XbaI*, obtivemos marcação com a sonda do *bla_{SPM-1}* em uma banda de 165kb para as amostras: CCBH3462, CCBH4850 e CCBH5867; uma banda de 178kb para CCBH4851 e uma banda com 191kb para CCBH5868. Já para CCBH5698 (clone M), a banda marcada possuía 59kb. Para *rmtD*, foi observada marcação em uma banda de 19kb para a maior parte das amostras, apesar das CCBH5698, CCBH6425 e CCBH4851 apresentarem marcação em bandas diferentes das demais (77kb, 106kb e 117kb, respectivamente). Em relação ao *In163*, todas as amostras marcaram em uma banda de 95kb, com a única exceção da CCBH5698, que mostrou marcação em uma banda de 61kb (Figura 4.4).

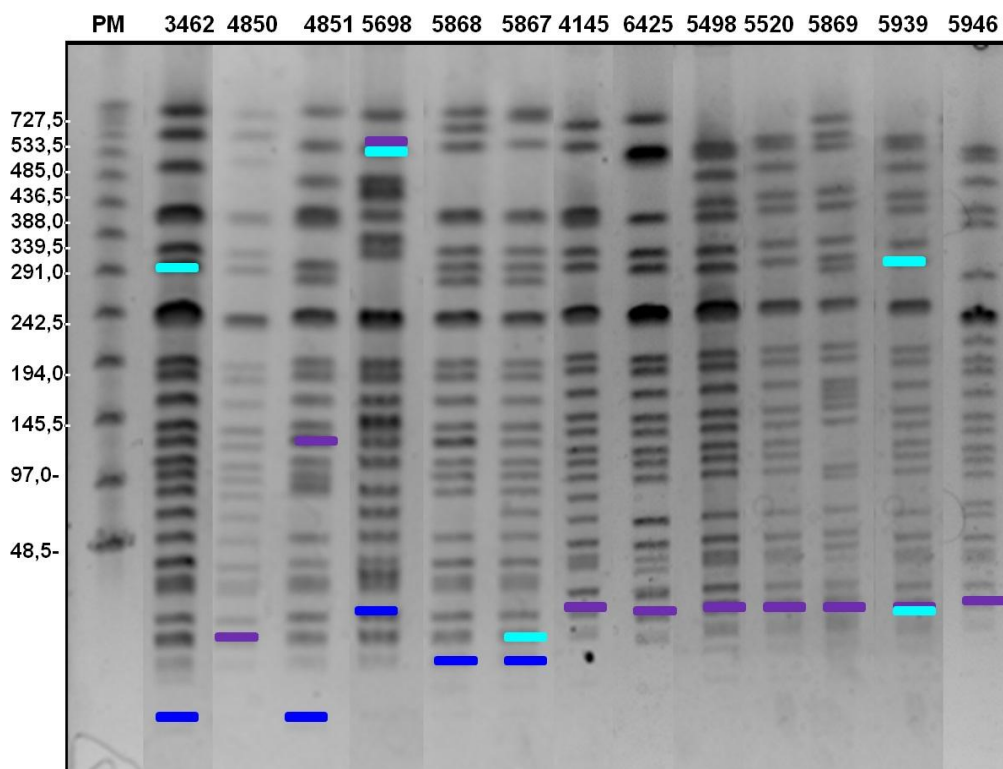


Figura 4.3: Representação dos resultados das hibridações com as sondas para *bla*_{SPM-1}, *rmtD* e *In163* após digestão com enzima de restrição *SpeI* das 13 amostras selecionadas. As regiões coloridas correspondem às bandas marcadas com as sondas: *bla*_{SPM-1}: ■; *rmtD*: ■; *In163*: ■

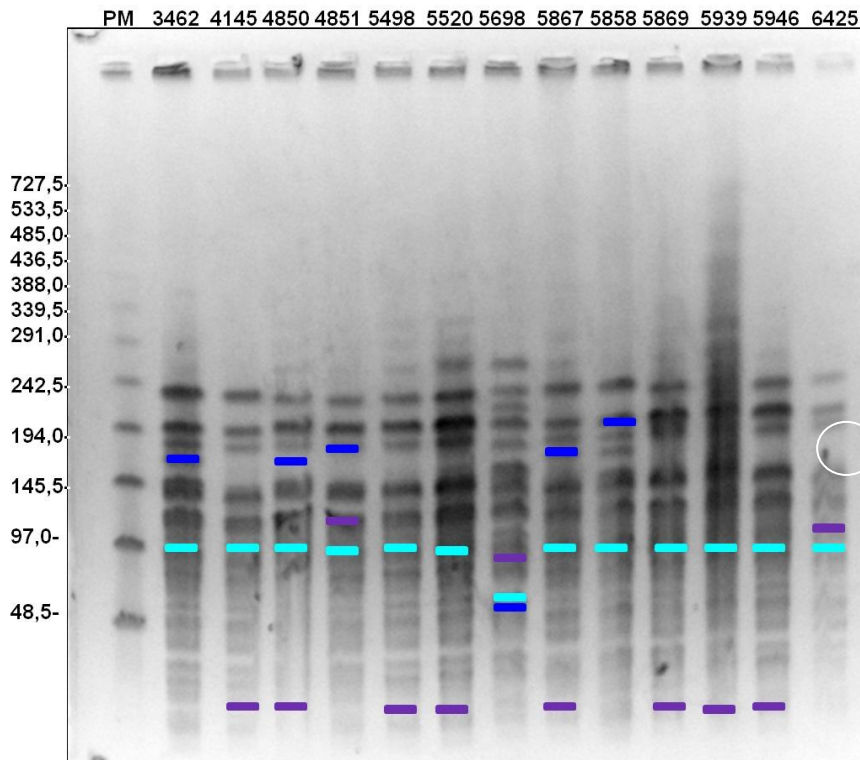


Figura 4.4: Representação dos resultados das hibridações com as sondas para *bla*_{SPM-1}, *rmtD* e *In163* após digestão com enzima de restrição *XbaI* das 13 amostras selecionadas. As regiões coloridas correspondem às bandas marcadas com as sondas: *bla*_{SPM-1}: ■; *rmtD*: ■; *In163*: ■

Tabela 4.2: Resultados da PCR e perfis de hibridação das amostras do ST277, obtidos após digestão com enzimas de restrição *SpeI* e *XbaI* e hibridação com sondas de *bla_{SPM-1}*, *rmtD* e *In163*

Amostras	PCR para <i>bla_{SPM-1}</i> , <i>rmtD</i> e <i>In163</i>	Tamanho da banda marcada após restrição e hibridação (kb)					
		Digestão com <i>SpeI</i>			Digestão com <i>XbaI</i>		
		Sonda <i>bla_{SPM-1}</i>	Sonda <i>rmtD</i>	Sonda <i>In163</i>	Sonda <i>bla_{SPM-1}</i>	Sonda <i>rmtD</i>	Sonda <i>In163</i>
CCBH3462	+ / - / +	8	-	401	165	-	95
CCBH4850	+ / + / +	ND	24	ND	165	19	95
CCBH4851	+ / + / +	8	145	ND	178	117	95
CCBH5698	+ / + / +	30	508	508	59	77	61
CCBH5867	+ / + / +	19	ND	ND	165	19	95
CCBH5868	+ / + / +	19	ND	24	191	ND	95
CCBH4145	- / + / +	-	24	ND	-	19	95
CCBH5498	- / + / +	-	24	ND	-	19	95
CCBH5520	- / + / +	-	24	ND	-	19	95
CCBH5869	- / + / +	-	24	ND	-	19	95
CCBH5939	- / + / +	-	24	401 e 24	-	19	95
CCBH5946	- / + / +	-	24	ND	-	19	95
CCBH6425	- / + / +	-	24	ND	-	106	95

Legenda- ND: Não foi possível Determinar; Negrito: Amostras selecionadas para a próxima fase.

4.3. Seleção das amostras para sequenciamento total do genoma

Para o sequenciamento total do genoma foram selecionadas 5 amostras provenientes das etapas anteriores, sendo uma negativa para *bla_{SPM-1}* e positiva para *rmtD* (CCBH5939), uma positiva para *bla_{SPM-1}* e negativa para *rmtD* (CCBH3462) e três positivas para os dois genes (CCBH4851, CCBH4850 e CCBH5698) (Tabela 4.2, em negrito). Incluímos na etapa de sequenciamento uma amostra negativa para *bla_{SPM-1}* e *rmtD* (CCBH276), pertencente ao ST277, proveniente da Coleção de Culturas de Bactérias de interesse Hospitalar do LAPIH/IOC do ano de 2004, afim de ter um controle negativo antigo para acompanhar a evolução do clone, totalizando 6 amostras (Tabela 4.3).

Todas as 6 amostras sequenciadas eram resistentes à ceftazidima, cefepime, imipenem, meropenem, ciprofloxacina e gentamicina, e sensíveis à polimixina B.

Tabela 4.3: Dados das amostras que entraram na etapa de sequenciamento total do genoma

Amostras	Ano	PCR para										
		<i>bla</i> _{SPM-1} , <i>rmtD</i> e <i>In163</i>	AK	ATM	CAZ	FEP	CIP	GEN	IPM	MER	TZP	PB
CCBH276	2004	-/-/+	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S
CCBH3462	2007	+/-/+	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S
CCBH4850	2008	+/+/+	R	I	R	R	R	R	R	R	R	S
CCBH4851	2008	+/+/+	R	I	R	R	R	R	R	R	R	S
CCBH5698	2010	+/+/+	R	I	R	R	R	R	R	R	R	S
CCBH5939	2010	-/+/+	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S

Legenda: AK-amicacina, ATM-aztreonam, CAZ-ceftazidima, FEP-cefepime, CIP-ciprofloxacina, GEN-gentamicina, IPM-imipenem, MER-meropenem, TZP-piperacilina-tazobactam, PB-polimixina B.

Selecionamos três amostras positivas para os dois genes, pois encontramos marcações distintas: a amostra CCBH4850 não apresentou marcações para *bla*_{SPM-1} com *SpeI*; a amostra CCBH4851 apresentou marcação diferente das demais tanto no teste de restrição com *XbaI* e hibridação com sonda para *rmtD* e *bla*_{SPM-1}, quanto na restrição com *SpeI* seguida de hibridação com *rmtD*; e a CCBH5698, por ser a única amostra *bla*_{SPM-1}, *rmtD* e *In163* positiva que não pertence ao clone A, além de apresentar marcações distintas (Tabela 4.2).

4.4 Resultados do sequenciamento do genoma total

O STG foi realizado com o sistema Illumina MiSeq, gerando de 764.555 a 1.832.294 *reads* por amostra na corrida de 300 ciclos e de 287.569 a 2.588.123 *reads* por amostra na corrida de 500 ciclos. Os dados do sequenciamento foram analisados pela abordagem de “montagem *de novo*”, unindo as *reads* geradas pelas corridas de 300 e 500 ciclos. O número de contigs gerados utilizando as *reads* das duas corridas variou de 150 a 547 por amostra. A corrida de 500 ciclos da amostra CCBH4850 não funcionou, portanto, as *reads* utilizadas para essa amostra correspondem somente à corrida de 300 ciclos, e o número de contigs obtidos foi igual a 1.356 (Tabela 4.4).

Tabela 4.4: Dados referentes às corridas de 300 e 500 ciclos do Sequenciamento Total do Genoma de 6 amostras de *P. aeruginosa* do ST277 através do sistema Illumina MiSeq

Amostras	<i>reads</i> 300 ciclos	<i>reads</i> 500 ciclos	Nº de contigs (300+500)	Cobertura (300+500=total)	Tamanho do genoma (pb)
CCBH276	1.502.745	2.095.147	180	34x + 78x = 112x	6.698.521
CCBH3462	1.832.294	2.588.123	150	41x + 96x = 137x	6.683.131
CCBH4850	1.713.657	-	1.356	39x	6.493.849
CCBH4851	1.445.561	1.232.439	164	32x + 46x = 78x	6.719.789
CCBH5698	1.318.198	287.569	547	29x + 10x = 39x	6.885.052
CCBH5939	764.555	821.626	160	17x + 31x = 48x	6.694.874

4.4.1. Análise dos contigs contendo o gene *bla*_{SPM-1}

Os contigs contendo o gene *bla*_{SPM-1} variaram em tamanho de 3.985pb a 7.084pb entre as amostras positivas para esse gene. O gene *bla*_{SPM-1} foi encontrado dentro do elemento genético ISCR4 (Genebank AY341249.1, Figura 3.3) nas amostras CCBH3462, CCBH4850 e CCBH4851. Na amostra CCBH5698 não foi encontrado nenhum contig contendo o gene *bla*_{SPM-1}. No entanto, encontramos a região contendo o *groEL* e a *orf495* (região de 2.126 pb anterior ao gene *bla*_{SPM-1}) em um contig de 8.788 pb (5698-SPM-1). Para as amostras negativas para *bla*_{SPM-1} (CCBH276 e CCBH5939), não houve alinhamento de contig com nenhuma região da sequência do ISCR4-SPM-1 (Genebank AY341249.1) (Tabela 4.5).

Tabela 4.5: Anotação dos contigs que apresentaram identidade com o elemento genético ISCR4 carreando o gene *bla*_{SPM-1} (Genebank AY341249.1) encontrados nas 6 amostras de *P. aeruginosa* pertencentes ao ST277.

Amostra	Contig(pb)	Organização dos contig
CCBH276	NE	-
CCBH3462	3462-SPM-1 (7.075pb)	
CCBH4850	4850-SPM-1 (4.009 pb)	
CCBH4851	4851-SPM-1 (3.985 pb)	
CCBH5698	5698-SPM-1 (8.788 pb)	
CCBH5939	NE	-

Legenda: NE-Não foi encontrado nenhum contig.

Foi observado nos contigs das amostras CCBH3462 e CCBH5698, regiões adjacentes ao ISCR4. No contig da amostra CCBH3462 foi observado uma região anterior ao ISCR4, que anelou do nucleotídeo 1.903 ao 2.263 à parte da proteína VirD2 (ID: CDI95028, GenBank HG530068.1, e-value: 0.0; identidade: 92%).

No contig da CCBH5698, foi observado uma região de 5.902 pb, posterior a ORF495, que anelou do nucleotídeo 2.886 ao 4.706 com um regulador transcricional hipotético (CDI95038.1, GenBank HG530068.1, e-value: 0.0; identidade: 76%), e do nucleotídeo 6.225 ao 8.472 à proteína VirD2 (ID: CDI95028, GenBank HG530068.1, e-value: 0.0; identidade: 92%).

Foi realizado um alinhamento par a par entre essas regiões dos dois contigs (3462-SPM-1 e 5698-SPM-1) e observou-se que a região de 1 – 2.895pb do contig 3462-SPM-1 foi idêntica à região 4193 - 7088pb do contig 5698-SPM-1 (Figura 4.5).

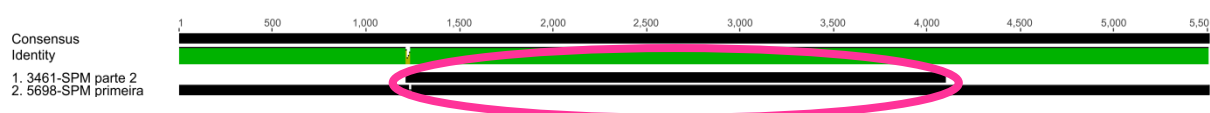


Figura 4.5: Figura representativa do alinhamento par a par entre a parte inicial do contig 3462-SPM-1 e a parte final do contig 5698-SPM-1, gerado pelo programa Geneious. A barra *Identity* com a cor verde significa 100% de identidade entre as duas sequencias.

Procurou-se entre as amostras sequenciadas, contigs que fossem complementares a região adjacente ao ISCR4 observada no contig 3462-SPM-1. Esse contig foi usado como “query” para o blastn do RAST. Foi encontrado um contig na amostra CCBH4851, com 10.722pb, que alinhou do nucleotídeo 1 ao 3.722 à região correspondente à região anterior ao ISCR4 no contig 3462-SPM-1(Figura 4.6) .

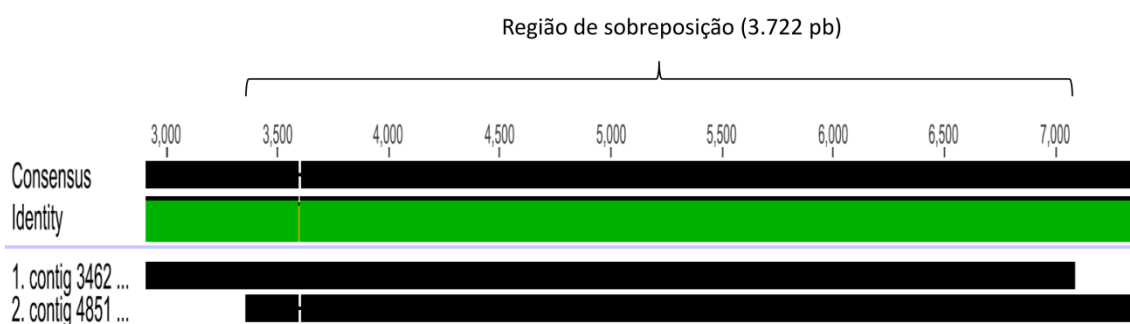


Figura 4.6: Região de sobreposição entre os contigs 3462-SPM-1 e 4851 (10.722pb) após alinhamento par a par entre eles usando o programa Geneious. A barra *Identity* com a cor verde significa 100% de identidade entre as duas sequencias.

O contig de 10.722pb da amostra CCBH4851 foi usado como “query” no Blast, e encontramos 89% de identidade com uma região de um plasmídio descrito em *P. aeruginosa* (e-value: 0.0, GenBank KC543497.1). A região de identidade com esse plasmídio correspondia ao gene da proteína VirD2, já observada no contig 3462-SPM-1, uma proteína de resistência a bacilomicina, um regulador transcricional da família *LysS*, uma lipoproteína hipotética e aos genes *virD4*, *copG*, *trbB*, *trbC*, *trbD*, além de uma proteína hipotética.

Com o objetivo de verificar a existência dessa região anterior à ISCR4 nas outras amostras sequenciadas, um consenso de 13.959pb (gerado a partir do alinhamento par a par entre os contigs 3462-SPM-1 e 4851-10.722pb, Figura 4.7) foi usado como referência para mapeamento das *reads*. O resultado do blastn desse consenso pela plataforma Blast mostrou que os primeiros 7.266 nucleotídeos desse consenso tinham 83% de identidade com o transposon *Tn4371* de *Ralstonia oxalatica* (GenBank AJ536756.1, e-value: 0.0).

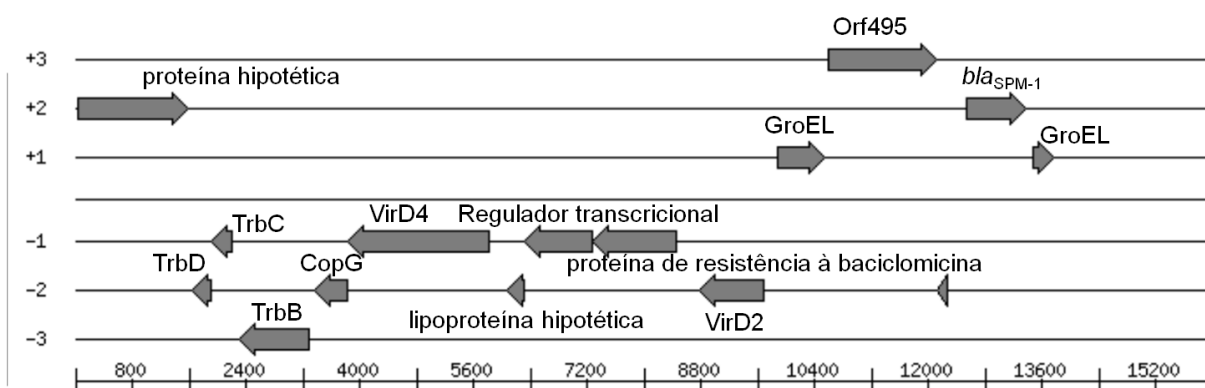
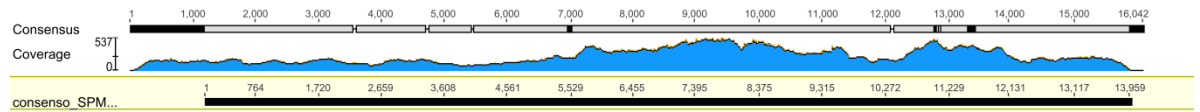


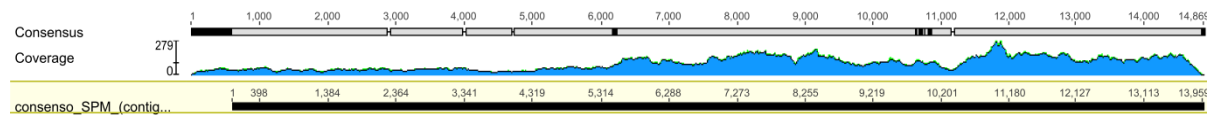
Figura 4.7: Anotação, gerada pelo programa RAST, do consenso de 13.959pb entre os contigs 3462-SPM-1 e 4851-10.722pb. Nesta figura estão representados as fases (-3 a +3) e o sentido (setas) da leitura de cada gene.

Para todas as amostras *bla_{SPM-1}* positivas foi encontrada cobertura em toda extensão do consenso, exceto para a região correspondente ao gene *bla_{SPM-1}* da amostra CCBH5698, que foi pouco coberta (Figura 4.8, D).

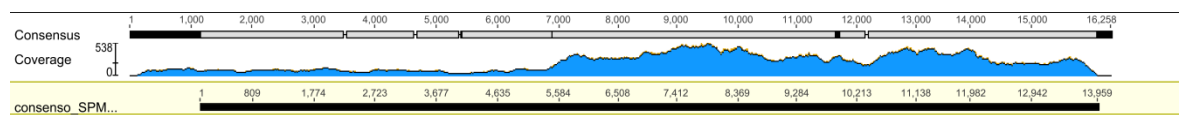
A) CCBH 3462



B) CCBH 4850



C) CCBH 4851



D) CCBH 5698

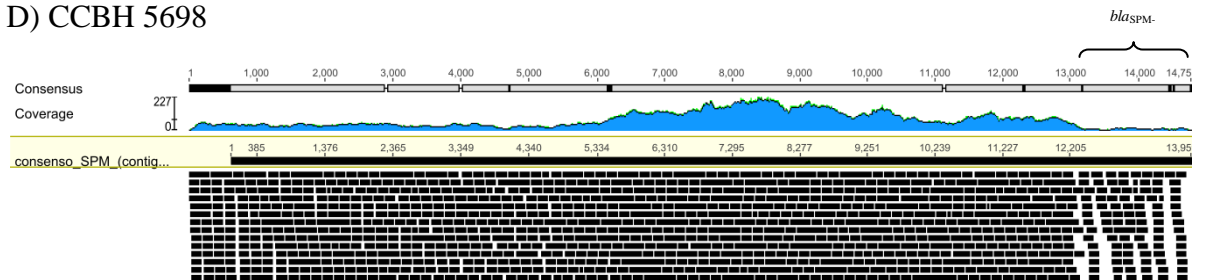
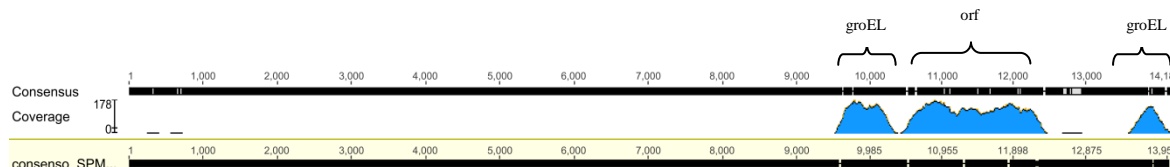


Figura 4.8: Figuras representativas, geradas pelo programa Geneious, do mapeamento das *reads* das amostras positivas para bla_{SPM-1} , usando como referência o consenso 3462-SPM-1 /4851-10.722pb (13.959pb, Figura 4.7). O retângulo superior representa a sequência consenso da amostra (*consensus*), onde as áreas cinzas indicam identidade e as pretas diferenças, em relação a sequência de referência. Os picos azuis representam a cobertura, também representada metricamente na escala à esquerda do alinhamento (*Coverage*). Na figura D, as *reads* da amostra CCBH5698 também estão representadas, como pequenos retângulos pretos.

Para as amostras bla_{SPM-1} negativas (CCBH276 e CCBH5939) foram encontradas apenas as regiões correspondentes ao *groEL* e *orf495* (Figura 4.9). Usando o Blast, verificamos que essa região mostrava alinhamento com a ORF494 (97% de identidade, contra 77% com a ORF495).

A) CCBH276



B) CCBH5939

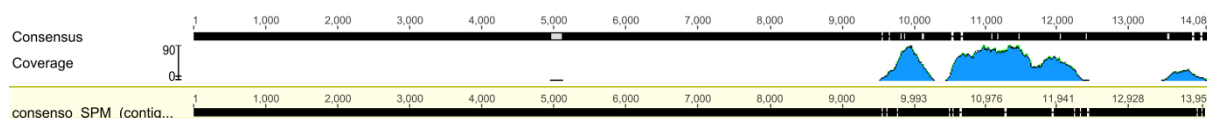


Figura 4.9: Figuras representativas do mapeamento das *reads* das amostras *bla*_{SPM-1} negativas usando como referência o consenso 3462-SPM-1 /4851-10.722pb (13.959pb). O retângulo superior representa a sequência consenso da amostra (*Consensus*), onde as áreas cinzas indicam identidade e as pretas diferenças, em relação a sequência referência. Os picos azuis representam a cobertura, também representada metricamente na escala à esquerda do alinhamento (*Coverage*).

4.4.2 Análise dos contigs contendo *In163* e o gene *rmtD*

O alinhamento da sequência com o número de acesso DQ914960 no GenBank (Figura 3.4), mostrou a presença de contigs que variaram de 2.607pb a 34.655pb em todas as 6 amostras sequenciadas. Pela plataforma Blast, realizamos o blastn desses contigs, encontrando as organizações mostradas na Tabela 4.6.

Tabela 4.6: Anotação dos contigs que apresentaram identidade com o integron *In163* e o elemento genético *ISCR14* carregando o gene *rmtD* (Genebank DQ914960) encontrados nas 6 amostras de *P. aeruginosa* pertencentes ao ST277.

Amostra	Contig (pb)	Organização dos contigs
CCBH276	276-In (33.317 pb)	7.342 pb + In163 + Tn5564 + DNA <i>H. arsenicoxydans</i> 1pb 33.317 pb
CCBH3462	3462-In (17.209 pb)	Tn5564+ 6.903 pb + In163 1pb 17.209 pb
CCBH4850	4850-In+rmtD (10.081pb)	In163 + orf 494 + rmtD 1pb 10.081 pb
CCBH4851	4851-In+rmtD (34.655pb)	In163 + orf494 + rmtD + groEL + orf494 + Tn5564 + DNA <i>H. arsenicoxydans</i> 1pb 34.655 pb
CCBH5698	5698-In+rmtD (19.828pb)	In163 + orf494 + rmtD + groEL+ transposase + 6.200 pb 1pb 19.828 pb
CCBH5939	5930-rmtD (2607pb) e 5939-In (6627pb)	rmtD + orf494 e In163 1pb 2.607 pb 1pb 6.627 pb

O gene *rmtD* foi encontrado associado ao ISCR14 e *In163* em todas as amostras positivas para esse gene, exceto para a amostra CCBH5939, onde não pudemos identificar um único contig contendo as duas regiões (ISCR14 e *In163*) juntas.

O resultado do blastn do contig4851-In+*rmtD* (34.655pb), mostrou alinhamento do nucleotídeo 1 ao 17.815 com a região contendo o *In163*, *orf494* até o gene *cmx* do *Tn5564* (GenBank DQ914960.2, e-value:0.0; Identidade 99%), com uma deleção de 15pb no gene *cmx*. A partir do nucleotídeo 19.213 em diante houve alinhamento, com 99% de identidade, à uma região contendo genes relacionados ao metabolismo respiratório da bactéria *Herminiimonas arsenicoxydans* (alinhamento do 2.043.381 – 2.058.797pb no GenBank CU207211.1; e-value: 0.0).

Realizando blastn pela plataforma Blast, do contig 4851-In+rmtD contra a PAO1 (NCBI Reference Sequence: NC_002516.2), observamos alinhamento, com 75% de identidade, em uma região de 1.112pb da sequência de 15.424pb do DNA da *H. arsenicoxydans*.

A amostra CCBH5698 mostrou-se diferente das demais quanto ao contexto genético do gene *rmtD* e do *In163*. O resultado do blastn do contig 5698-In+rmtD (19.828pb), revelou no primeiro *hit* o *In163*, seguido dos genes para *orf494*, *rmtD* e *groEL* (GenBank DQ914960.2, e-value: 0.0; Identidade: 99%). Observamos nesse contig, a ausência de uma região de 6.368pb, correspondendo à região da *orf494* posterior ao gene *rmtD* até o gene *cmx* na sequência de número de acesso DQ914960.2. Foi encontrando nesta posição, uma transposase que apresentou 99% de similaridade com a transposase da sequência de inserção IS3513 (GenBank CR931997.1). No final deste contig, existe uma região de 6.200 pb que não apresenta *hits* confiáveis com o banco de dados.

A região final do contig 5698-In+rmtD não corresponde a sequência do DNA de *H. arsenicoxydans* encontrado no contig 4851-In+rmtD, pois o alinhamento par a par dessas duas regiões não mostrou nenhuma similaridade (Figura 4.10).

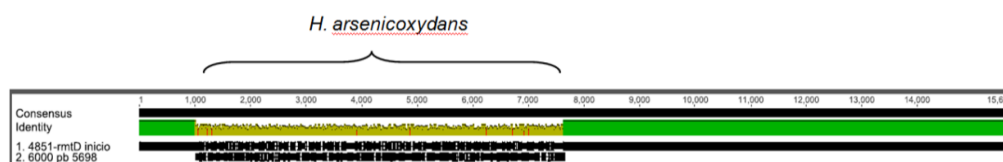


Figura 4.10: Alinhamento par a par entre a região de 6.200 pb contig 5698-In+rmtD, que não apresenta *hits* confiáveis com o banco de dados, e a região do contig 4851-In+rmtD correspondente ao DNA da *H. arsenicoxydans*. A barra *Identity* com a cor verde significa identidade de 100%, já a cor amarela significa diferenças entre as duas sequencias.

A amostra CCBH276 (*rmtD* negativa) apresentou um contig contendo o *In163* de 33.317 pb (contig 276-In). O resultado do blastn desse contig revelou que os nucleotídeos do intervalo de 1 a 7.342 não apresentaram *hits* confiáveis com o banco de dados; logo após se encontrava o *In163* (GenBank DQ914960.2, ID:100%) seguido de parte do *Tn5564* (transposase + *cmx*) (GenBank DQ914960.2, ID:100%). A região do nucleotídeo 17.858 em diante alinhou com a mesma região do cromossomo da bactéria *H. arsenicoxydans* encontrada na amostra CCBH4851 (contig 4851-In+rmtD) (GenBank CU207211.1, e-value: 0.0; Identidade 99%). O alinhamento entre essas regiões dos dois contigs encontra-se na Figura 4.11.

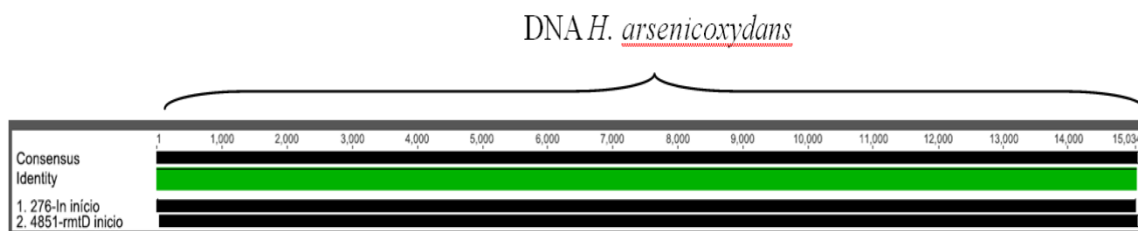


Figura 4.11: Alinhamento par a par entre as regiões dos contigs 276-In e 4851-In+rmtD que correspondem ao DNA da *H. arsenicoxydans*. A barra *Identity* com a cor verde significa 100% de identidade entre as duas sequencias.

Na amostra CCBH3462, que também é positiva para o *In163* e negativa para o gene *rmtD*, foi encontrado um contig de 17.209pb (3462-In). Na região anterior ao integron existia uma sequencia de nucleotídeos de 6.903pb que não apresenta nenhum *hit* confiável com o banco de dados, além de outra cópia de parte do *Tn5564* (GenBank DQ914960.2; e-value: 0.0; Identidade: 100%) (Tabela 4.5).

Um alinhamento par a par foi realizado entre os contigs 276-In e 3462-In e encontramos uma sobreposição de aproximadamente 13.000 pb, correspondente a região sem *hit* no banco de dados mais o *In163* (Figura 4.12 e 4.13, círculo laranja).

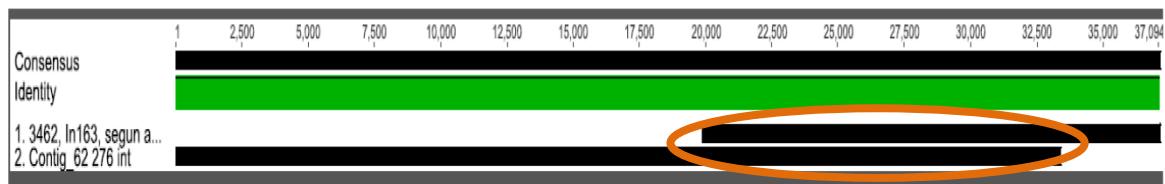


Figura 4.12: Alinhamento par a par entre os contigs 276-In e 3462-In. A barra *Identity* com a cor verde significa 100% de identidade entre as duas sequencias. Em laranja a região de identidade correspondente ao *In163* e a região sem hit no banco de dados

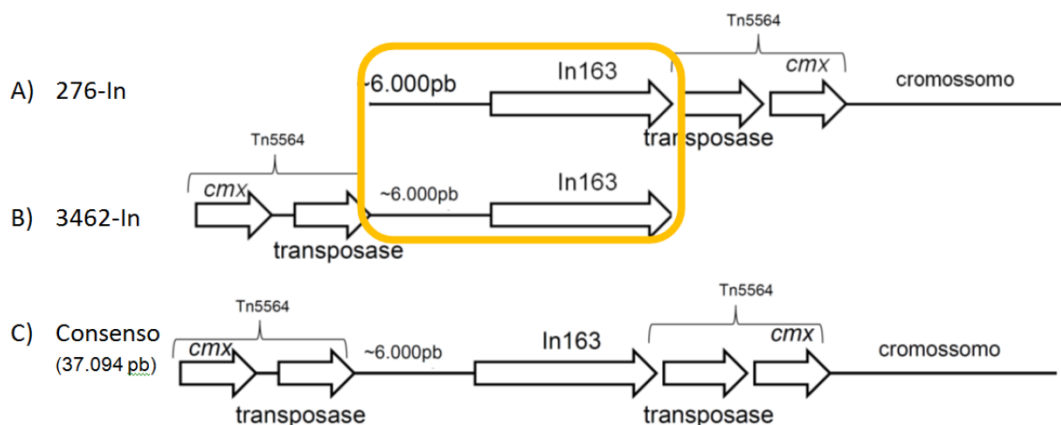
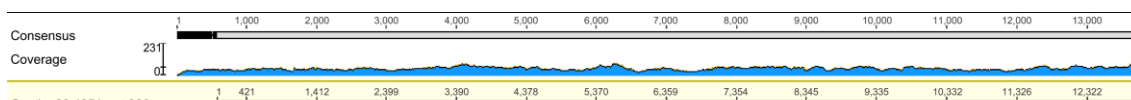


Figura 4.13- Anotação feita através de análise no Blast dos contigs 276-In 3462-In e do consenso gerado entre os contigs 276-In e 3462-In. Em laranja a região de identidade correspondente ao *In163* mais a região sem hit no banco de dados.

Para investigar se as duas amostras *rmtD* negativas apresentavam essas regiões adjacentes à sequencia GenBank DQ914960.2, ou seja, a presença de parte do *Tn5564* anterior ao *In163* e a região do DNA da *H. arsenicoxydans* posterior a este elemento genético, suas *reads* foram mapeadas usando como referência um consenso entre os contig 276-In e 3462-In (37.094 pb), obtido através de alinhamento par a par (Figura 4.13 C). Foi encontrada cobertura em toda extensão para ambas, confirmando a existência dessa região (Figura 4.14).

A) CCBH276



B) CCBH3462

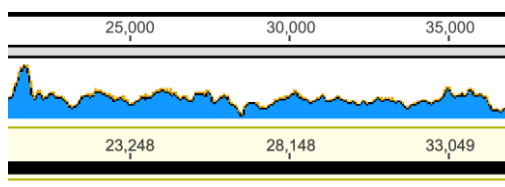


Figura 4.14: Figuras representativas geradas pelo programa Geneious do mapeamento das *reads* das amostras negativas para *rmtD*, usando como referência o consenso entre os contig 276-In e 3462-In (37.094 pb), obtido através de alinhamento par a par. O retângulo superior representa a sequência consenso da amostra (*Consensus*), onde as áreas cinzas indicam identidade e as pretas diferenças, em relação a sequência referência. Os picos azuis representam a cobertura, também representada metricamente na escala à esquerda do alinhamento. A figura (A) representa o alinhamento das *reads* da amostra CCBH276 mapeadas contra a parte do *Tn5564* anterior ao *In163*. A figura (B) representa o alinhamento das *reads* da amostra CCBH3462 com a região do DNA de *H. arsenicoxydans*.

Decidiu-se procurar entre as amostras sequenciadas, contigs que fossem complementares às partes adjacentes à sequência GenBank DQ914960.2 que encontradas até aqui. O consenso de 37.094pb gerado entre os contigs276-In e contig3462-In foi usado como “query” no blastn do RAST. Através desta análise, foram encontrados dois contigs importantes na amostra CCBH5939. Um contig de 179.418pb, que alinhou do nucleotídeo 163.634 ao 179.418 (15.779pb, parte final desse contig) com a região correspondente ao DNA da *H. arsenicoxydans* (posterior à ISCR14), e outro de 40.365pb, que alinhou do nucleotídeo 1 ao 7.611 (parte inicial desse contig) com a região sem *hit* no blast e à parte do *Tn5564* (anterior ao *In163*).

Alinhamentos par a par sucessivos dos contigs 3462-In, 4851-In+rmtD e os dois contigs da amostra CCBH5939 (Figura 4.15) foram feitos, obtendo um consenso de 239.648pb, com conteúdo GC de 65%. Esse consenso foi depositado no RAST para anotação automática, e a plataforma Blast no NCBI também foi usada para identificar as regiões que estão mostradas na Figura 4.16. As regiões do genoma da PAO1, que estão no início e no fim do consenso, são contínuas no genoma da cepa referência, PAO1 (correspondem a 2.948.621-2.923.150 e 2.923.240-2.814.770 na sequência NCBI Reference Sequence: NC_002516.2).

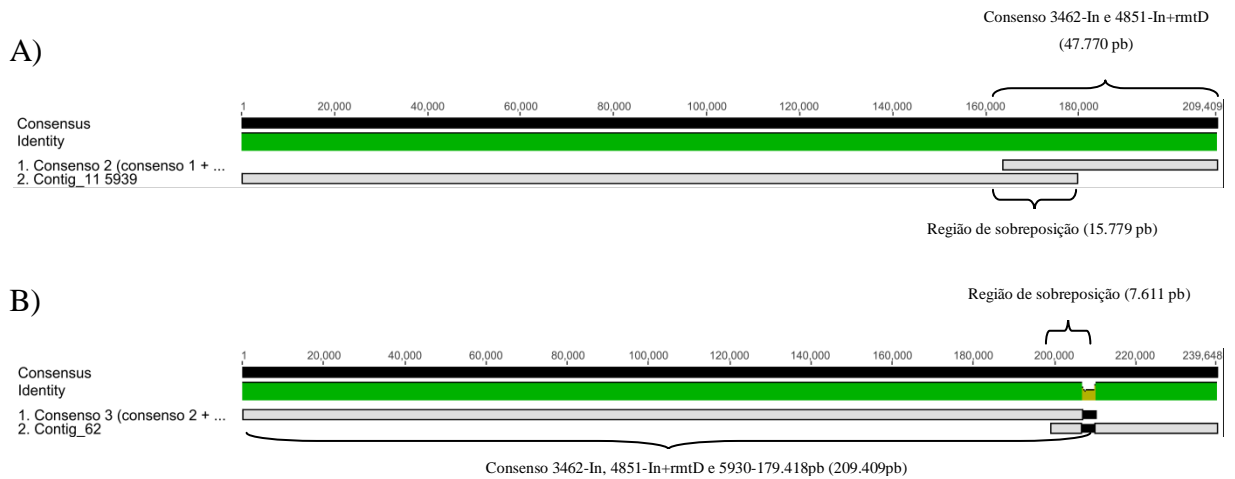


Figura 4.15: Figuras representativas, obtidas pelo Geneious, dos alinhamentos par a par sucessivos entre os contigs 3462-In, 4851-In+rmtD e os dois contigs da amostra CCBH5939. A barra *Identity* com a cor verde significa 100% de identidade entre as duas sequencias. Em (A) está representado o alinhamento entre o consenso 3462-In e 4851-In+rmtD e o contig de 179.418pb da amostra CCBH5939. Em (B) está representado o alinhamento entre o consenso obtido em (A) e o contig de 40.365pb da amostra CCBH5939.

Na região de aproximadamente 100kb do consenso, entre as duas sequencias do genoma da PAO1, estão: parte do *Tn5564* anterior ao *In163*, a sequencia de 17kb já descrita por Doi e colaboradores em 2008 (GenBank DQ914960.2) (65) e a região de *H. arsenicoxydans*, já descritos anteriormente; posteriormente encontramos 21.358pb que anelam à uma região correspondente a genes codificadores de proteínas envolvidas no processo de conjugação (*pilL*, *virD4*) e reparo do DNA (*radC*), presentes no genoma *Alicyiphilus denitrificans* (GenBank CP002449.1, e-value 0.0, ID:88%); e logo após 18.543pb que anelam com uma região correspondente aos genes codificantes de uma topoisomerase do tipo III, proteínas ligadoras de DNA fita simples e várias proteínas hipotéticas semelhantes àquelas encontradas em uma ilha genômica de *P. aeruginosa* (PAGI-I), presentes no transposon *clc* de *Pseudomonas putida* (GenBank AJ617740.2, e-value 0.0, ID:85%).

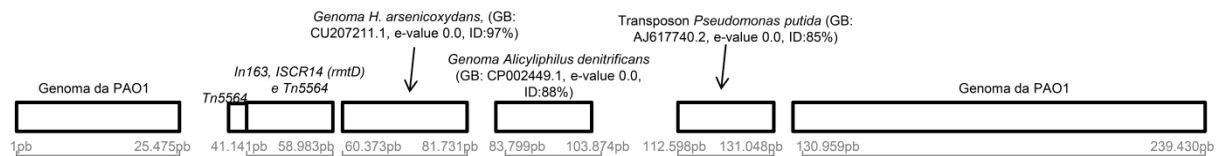
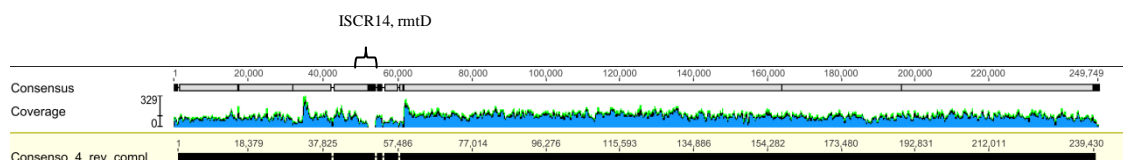


Figura 4.16: Identities do consenso de 239.648pb (gerado entre os contigs 3462-In, 4851-In+rmtD e os dois contigs da amostra CCBH5939) obtido através da plataforma Blast.

Para verificar se esta região (Figura 4.16) existia, as *reads* de todas as amostras foram mapeadas usando este consenso como referência. As amostras CCBH3462 e CCBH276, mostraram uma boa cobertura, com apenas um *gap* na região correspondente a ISCR14(*rmtD*) (Figura 4.17)

A) CCBH276



C) CCBH3462

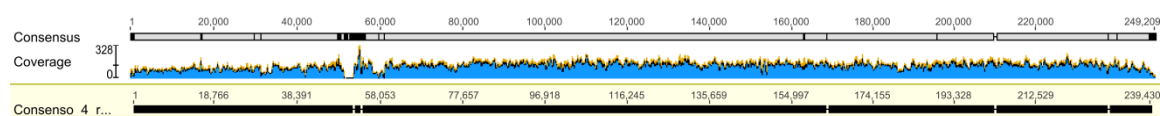
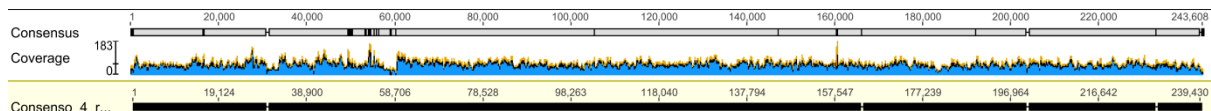


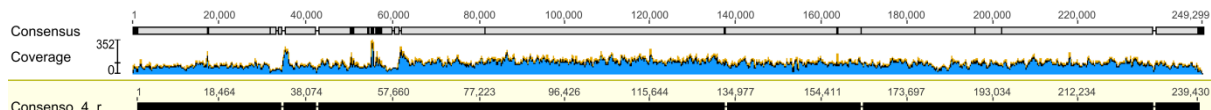
Figura 4.17: Mapeamento das *reads* das amostras *rmtD* negativas usando o contig de 239.648pb como referência. O retângulo superior representa a sequencia consenso da amostra (*Consensus*), onde as áreas cinzas indicam identidade e as pretas diferenças, em relação a sequencia referência. Os picos azuis representam a cobertura, também representada metricamente na escala à esquerda do alinhamento (*Coverage*).

Entre as amostras positivas para *rmtD*, CCBH4850, CCBH4851 e CCBH5939, revelaram cobertura boa em toda extensão (Figura 4.18). O mapeamento por referência das *reads* da CCBH5698 contra o consenso final de 239.648pb, mostrou dois *gaps*. Do nucleotídeo 30.207 ao 32.607 correspondia ao gene *cmx*, e do 55.442 ao 59.042 correspondia à transposase, além de uma aparente grande discordância entre a sequencia de nucleotídeos do consenso 239.648pb e a da amostra (Figura 4.18 C).

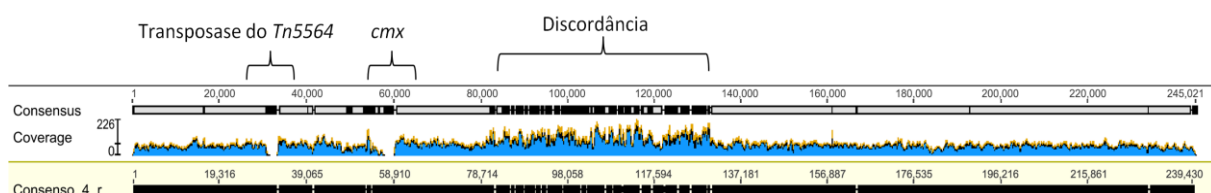
A) CCBH4850



B) CCBH4851



C) CCBH5698



D) CCBH5939

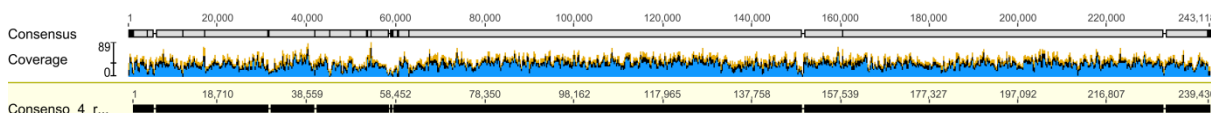


Figura 4.18: Mapeamento das *reads* das amostras *rmtD* positivas usando o contig de 239.648pb como referência. O retângulo superior representa a sequência consenso da amostra (*Consensus*), onde as áreas cinzas indicam identidade e as pretas diferenças, em relação a sequência referência. Os picos azuis representam a cobertura, também representada metricamente na escala à esquerda do alinhamento (*Coverage*).

4.5. Correlação dos resultados de PFGE, Hibridação e Sequenciamento

Analisando em conjunto os resultados obtidos por PFGE seguido de hibridação, e pelo sequenciamento total do genoma, observamos que todas as amostras do clone A apresentaram a mesma estrutura genética em torno dos genes *bla*_{SPM-1} e *rmtD*.

A amostra CCBH5698 (grupo clonal M) apresentou perfis de hibridação diferentes das demais, em todos os testes feitos. Essa diferença foi vista também no sequenciamento, onde não foi possível sequenciar o gene *bla*_{SPM-1}, e a estrutura genética em torno do gene *rmtD* encontrada foi diferente das 5 amostras do grupo clonal A. Em relação à amostra CCBH4851, houve diferenças no perfil de hibridação do gene *rmtD*, e também uma pequena deleção no gene *cmx*, posterior ao gene *rmtD*, observada após análise do sequenciamento.

Tabela 4.7 : Resultados de PFGE, PCR, Hibridação e Sequenciamento total do Genoma das 6 amostras selecionadas.

Amostras	PFGE	Tamanho da banda marcada após restrição e hibridação (Kb)		Sequenciamento		
		PCR para <i>bla</i> _{SPM-1 -1} / <i>rmtD</i> / <i>In163</i>	Digestão com SpeI	Digestão com XbaI	Ambiente <i>bla</i> _{SPM-1 -1}	Ambiente <i>rmtD</i> e <i>In163</i>
			Sondas <i>bla</i> _{SPM-1 -1} / <i>rmtD</i> / <i>In163</i>	Sondas <i>bla</i> _{SPM-1 -1} / <i>rmtD</i> / <i>In163</i>		
CCBH276	A	- / - / +	-	-	-	Consenso 239.648pb (Figura 4.17), sem ISCR14, <i>rmtD</i>
CCBH3462	A	+ / - / +	8 / - / 401	165 / - / 95	Consenso 13.959pb (Figura 4.8A)	Consenso 239.648pb (~Figura 4.17), sem ISCR14, <i>rmtD</i>
CCBH4850	A	+ / + / +	ND / 24, / ND	165 / 19 / 95	Consenso 13.959pb (Figura 4.8B)	Consenso 239.648pb (Figura 4.18A)
CCBH4851	A	+ / + / +	8 / 145 / ND	178 / 117 / 95	Consenso 13.959pb (Figura 4.8C)	Consenso 239.648pb (Figura 4.18B), com deleção <i>cmx</i>
CCBH5698	M	+ / + / +	30 / 508 / 508	59 / 77 / 61	Consenso 13.959pb (Figura 4.8D), sem <i>bla</i> _{SPM-1 -1}	Consenso 239.648pb (Figura 4.18 C), sem Tn5564
CCBH5939	A	- / + / +	- / 24 / 401 e 24	- / 19 / 95	-	Consenso 239.648pb (Figura 4.18 D)

4.6 Análise de mutações e deleções/inserções em genes intrínsecos que levam à resistência

4.6.1 Análise de mutações no gene *OprD* e reguladores de *AmpC*

A análise das mutações encontradas no gene *OprD* e nos genes reguladores de *AmpC* encontram-se na tabela 4.8.

Todas as amostras analisadas exibiram 20 mutações no gene *oprD*, sendo 2 não sinônimas; além disso foram observadas deleções dos nucleotídeos 379 e 380 do gene, o que acarretou em uma mudança no quadro de leitura (*frameshift*) com relação a sequencia de aminoácidos correspondente na PAO1 a partir do aminoácido 126 (Tabela 4.7 e Figura 4.19).

Consensus Identity	110	120	130
Consensus Identity	. . S T E G T H L Q D H A		
1. 276 <i>OprD</i>	. . S T E G T H L Q D H A		
2. 3462 <i>OprD</i>	. . S T E G T H L Q D H A		
3. 4850 <i>OprD</i>	. . S T E G T H L Q D H A		
4. 5698 <i>OprD</i>	. . S T E G T H L Q D H A		
5. 5939 <i>OprD</i>	. . S T E G T H L Q D H A		
6. 4851 <i>OprD</i>	. . S T E G T H L Q D H A		
7. PAO <i>OprD</i>	D K T G T G N L P V M N D G K P R D D Y S R A G G A V K V R I S K T M		

Figura 4.19: Alinhamento das sequencias de aminoácidos da proteína *OprD* entre seis amostras de *P. aeruginosa* pertencentes ao ST277 e a amostra referência PAO1. A figura gerada pelo programa Geneious representa parte do alinhamento mostrando a mudança no quadro de leitura (*frameshift*) a partir do aminoácido 126 da sequencia da proteína *OprD* (total de 444 aminoácidos).

Procurou-se por mutações nos reguladores do gene *ampC* (*ampD* e *dacB*). Para o gene *ampD*, não foi encontrado em nenhum contig das amostras CCBH276 e CCBH5939. Para as demais amostras, 4 mutações foram observadas na sequencia de nucleotídeos, sendo 2 dessas mutações não sinônimas que geram mutações na sequencia de aminoácidos (G148A e S174L) (Tabela 4.8).

Em relação ao gene *dacB*, observamos apenas 3 substituições sinônimas de nucleotídeos, portanto a sequência de aminoácidos foi idêntica à cepa selvagem em todas as amostras (Tabela 4.8).

Tabela 4.8: Alterações nas sequências de nucleotídeos e aminoácidos referentes aos genes *oprD*, *ampD* e *dacB* nas amostras de *P. aeruginosa* pertencentes ao ST277.

Amostras	oprD		ampD		dacB	
	Mutações (NT)	Mutações (AA)	Mutações (NT)	Mutações (AA)	Mutações (NT)	Mutações (AA)
CCBH276	20/2D	MF (126)	-	-	3	NE
CCBH3462	20/2D	MF (126)	4	G148A, S174L	3	NE
CCBH4850	20/2D	MF (126)	4	G148A, S174L	3	NE
CCBH4851	20/2D	MF (126)	4	G148A, S174L	3	NE
CCBH5698	20/2D	MF (126)	4	G148A, S174L	3	NE
CCBH5939	20/2D	MF (126)	-	.	3	NE

Legenda: NT-Nucleotídeos, AA- Aminoácidos, MF-Mudança no quadro de leitura (*frameshift*), D- Deleção, NE-Não existe

4.6.2 Análise de mutações nos genes reguladores de bombas de efluxo

A análise das mutações encontradas nos genes reguladores das bombas de efluxo MexAB-OprM, MexXY-OprM e MexEF-OprN encontram-se na tabela 4.9.

Em relação aos genes reguladores da bomba de efluxo MexAB-OprM, encontramos 4 mutações na sequência de nucleotídeos do gene *PA3721* que geraram duas mutações na sequência de aminoácidos em relação a cepa selvagem (G71E e S208R), comuns à todas as 6 amostras analisadas. Para o gene *mexR*, a sequência de nucleotídeos foi idêntica a da PAO1 em todas as amostras (Tabela 4.9).

Para o gene *mexT*, regulador da bomba de efluxo MexEF-OprN, uma deleção de 8 nucleotídeos (240-247), acarretou uma mudança no quadro de leitura (*frameshift*) na tradução da proteína para todas as amostras a partir do aminoácido 80 (Tabela 4.9 e Figura 4.20).

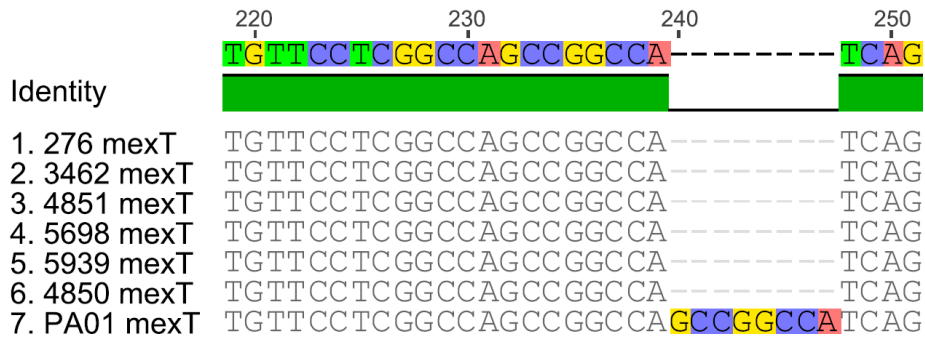


Figura 4.20: Alinhamento das sequencias de nucleotídeos do gene *mexT* entre seis amostras de *P. aeruginosa* pertencentes ao ST277 e a amostra referência PAO1. A figura gerada pelo programa Geneious representa parte do alinhamento mostrando deleção de 8 nucleotídeos da sequencia de *mexT* (total de 1.044 nucleotídeos).

A análise do gene regulador negativo de *mexT* (*mexS*), mostrou 5 mutações na sequência de nucleotídeos, sendo 1 não sinônima, que gerou a substituição D249N na sequencia de aminoácidos (Tabela 4.9).

Para o regulador da bomba de efluxo MexXY-OprM, *mexZ*, todas as amostras apresentaram uma mutação no nucleotídeo 438 seguida de uma deleção de 17 nucleotídeos, do 440 ao 457, que gerou uma mudança no quadro de leitura (*frameshift*) na tradução da proteína a partir do aminoácido 147 em todas as amostras (Tabela 4.9 e Figura 4.21).

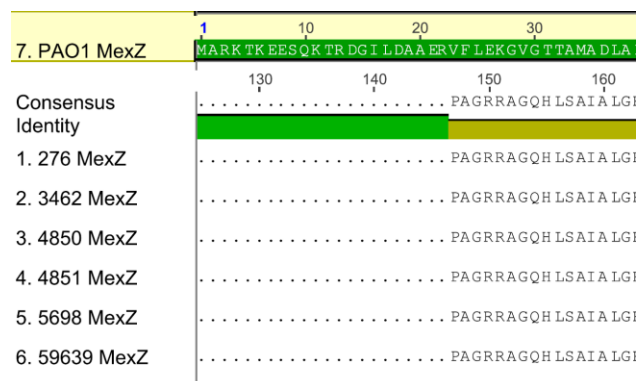


Figura 4.21: Alinhamento das sequencias de aminoácidos da proteína MexZ entre seis amostras de *P. aeruginosa* pertencentes ao ST277 e a amostra referência PAO1. A figura gerada pelo programa Geneious representa parte do alinhamento mostrando a mudança no quadro de leitura (*frameshift*) a partir do aminoácido 147 da sequencia da proteína MexZ (total de 211 aminoácidos).

Tabela 4.9: Alterações nas sequencias de nucleotídeos e aminoácidos referentes aos gene reguladores de bombas de efluxo nas amostras de *P. aeruginosa* pertencentes ao ST277..

Amostras	Mutações nos genes reguladores de bombas de efluxo									
	MexAB-OprM				MexEF-OprN				MexXY-OprM	
	<i>PA3721/NalC</i>		<i>mexR/NalB</i>		<i>mexT</i>		<i>mexS</i>		<i>mexZ</i>	
	Mutações (NT)	Mutações (AA)	Mutações (NT)	Mutações (AA)	Mutações (NT)	Mutações (AA)	Mutações (NT)	Mutações (AA)	Mutações (NT)	Mutações (AA)
CCBH276	4	G71E, S209R	0	NE	D240-247	MF80	5	D249N	1/D440-457	MF147
CCBH3462	4	G71E, S209R	0	NE	D240-247	MF80	5	D249N	1/D440-457	MF147
CCBH4850	4	G71E, S209R	0	NE	D240-247	MF80	5	D249N	1/D440-457	MF147
CCBH4851	4	G71E, S209R	0	NE	D240-247	MF80	5	D249N	1/D440-457	MF147
CCBH5698	4	G71E, S209R	0	NE	D240-247	MF80	5	D249N	1/D440-457	MF147
CCBH5939	4	G71E, S209R	0	NE	D240-247	MF80	5	D249N	1/D440-457	MF147

Legenda: NT-Nucleotídeos, AA- Aminoácidos, MF-Mudança de *frameshift*, D-Deleção

4.6.3 Análise de mutações nos genes responsáveis pela resistência às quinolonas

Para os genes responsáveis pela resistência às quinolonas, *gyrA*, *gyrB*, *parC* e *parE*, encontramos as mudanças mostradas na Tabela 4.10.

A análise da sequência de nucleotídeos do gene *gyrA* revelou 15 mutações em relação à PA01, das quais apenas uma gerou mutação também na sequência de aminoácidos (T83-I), em todas as amostras. Para a amostra CCBH4850, além das mutações citadas acima, outra mutação ocasionou uma segunda alteração na proteína, E188-D (Tabela 4.10).

Já em relação ao gene *gyrB*, observamos duas mutações sinônimas na sequência de nucleotídeos para todas as amostras, sem alteração na proteína (Tabela 4.10).

Em *parC* encontramos 19 mutações na sequência de nucleotídeos em relação a mesma sequência na cepa de referência. Destas, duas mutações levaram as mudanças de aminoácidos S87-L e H262-Q, para todas as seis amostras (Tabela 4.10).

Para *parE*, as 8 mutações de nucleotídeos observadas em todas as 6 amostras não geraram mudanças na sequência de aminoácidos da proteína, no entanto, para a amostra CCBH4850, uma nona mutação levou à mudança T26-P.

Tabela 4.10: Alterações nas sequências de nucleotídeos e aminoácidos referentes aos genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* e *parE* nas amostras de *P. aeruginosa* pertencentes ao ST277.

Amostras	<i>gyrA</i>		<i>gyrB</i>		<i>parC</i>		<i>parE</i>	
	Mutações (NT)	Mutações (AA)	Mutações (NT)	Mutações (AA)	Mutações (NT)	Mutações (AA)	Mutações (NT)	Mutações (AA)
CCBH276	15	T83I	2	NE	19	S87L, H262Q	8	NE
CCBH3462	15	T83I	2	NE	19	S87L, H262Q	8	NE
CCBH4850	15 + 1	T82I + E188D	2	NE	19	S87L, H262Q	8, A76C	T26P
CCBH4851	15	T83I	2	NE	19	S87L, H262Q	8	NE
CCBH5698	15	T83I	2	NE	19	S87L, H262Q	8	NE
CCBH5939	15	T83I	2	NE	19	S87L, H262Q	8	NE

Legenda: NT-Nucleotídeos, AA- Aminoácidos, MF-Mudança no quadro de leitura (*frameshift*), D-Deleção, NE- Não existe

5. DISCUSSÃO

Nas últimas décadas, devido ao aumento da utilização de antimicrobianos de amplo espectro, principalmente em unidades de terapia intensiva, tem se observado a emergência mundial de bastonetes Gram-negativos MDR, incluindo *P. aeruginosa*. Surtos envolvendo *P. aeruginosa* MDR ocorrem em diferentes países, e envolvem principalmente clones produtores de β -lactamases tipo MBLs (62, 87). A propagação de clones MDR chama a atenção devido a necessidade de vigilância dessas cepas no ambiente hospitalar.

Depois do primeiro relato de uma cepa de *P. aeruginosa* expressando a MBL SPM-1 em São Paulo, um clone MDR epidêmico produtor desta enzima (chamado de clone SP) tem se disseminado pelo Brasil. Vários trabalhos mostram a propagação desse clone: em 2003 foi registrada a sua disseminação pelos estados brasileiros da Bahia, Ceará, Distrito Federal, São Paulo e Pará; no ano de 2004 foi descrita em Pernambuco; em 2006 no Rio de Janeiro; em 2007 no Maranhão e em 2009 em Goiás (62, 63, 59, 88, 89).

Fonseca e colaboradores aplicaram o esquema de MLST para determinar a epidemiologia do clone MDR de *P. aeruginosa* produtor de SPM-1. As análises dessas amostras por PFGE em paralelo com MLST mostraram que elas estavam agrupadas no clone SP e pertenciam ao ST277 (73).

Das 50 amostras de *P. aeruginosa* MDR incluídas neste estudo, foi possível confirmar a prevalência do ST277(38%), sendo que todas as amostras positivas para *bla*_{SPM-1} (n=7) pertenciam a este ST.

No entanto, a amostra CCBH5698, embora tenha sido alocada no ST277, pertencia a outro grupo clonal determinado por PFGE (clone M), que apresentou 75% de similaridade com as amostras pertencentes ao clone SP (clone A neste estudo).

Se os perfis de fragmentação do DNA das amostras *bla*_{SPM-1} positivas gerados por PFGE fossem avaliadas usando, por exemplo, o critério descrito por Tenover e colaboradores (1995) (90), seriam consideradas não relacionadas aquelas amostras que tivessem sete ou mais bandas de diferença entre si, ou considerando o percentual de similaridade utilizando o coeficiente de *Dice*, aquelas com similaridade menor ou igual a 80%. Contudo, é importante ressaltar que estes critérios foram estabelecidos para caracterização de surtos.

Assim, em conjunto com os resultados do MLST, nossos dados embasam a sugestão de Silva e colaboradores (2011), de que as amostras produtoras de SPM-1 são derivadas de um único clone que sofreu variações genéticas pelo acúmulo de mutações ao longo do tempo,

uma vez que os genes de manutenção da espécie permaneceram conservados (todas do ST277) (74).

A presença do gene *bla*_{SPM-1} em clones não relacionados, identificados por PFGE e Ribotipagem, já foi descrito por outros autores. Castanheira e colaboradores em 2008 identificaram 16 clones produtores de SPM-1 através de ribotipagem (67). Silva e colaboradores em 2011 avaliaram 50 amostras positivas para *bla*_{SPM-1} através de PFGE, ribotipagem e MLST e observaram que as amostras foram distribuídas em 5 perfis de PFGE e 11 ribotipos diferentes, entretanto todas pertenceram ao ST277, sendo apenas uma amostra do ST235 (74).

Estudo publicado por Kiewitz & Tümmler em 2000 mostra que os diferentes perfis eletroforéticos de *P. aeruginosa* gerados por PFGE são resultados de deleções e /ou inserções no genoma dessa espécie em 92% dos casos, e em apenas 8% as diferenças nos padrões de restrição se devem a mutações no sítio de restrição da enzima (91). Como os genes conservados utilizados para tipagem por MLST não sofrem esses rearranjos, a ocorrência de diferentes alelos dependem da ocorrência de mutações de nucleotídeos únicos (SNPs), muito menos frequentes no genoma da bactéria do que deleções e /ou inserções. Por isso, o PFGE é mais utilizado em casos de surtos, pelo seu alto poder discriminatório, e o MLST é mais utilizado para estudos evolucionários e comparativos, pela amplificação de genes conservados (1).

Apesar de já ter sido descrito a presença do ST277 em outros países, apenas um relato na Suécia descreve a presença do ST277 carreando o gene *bla*_{SPM-1} fora do Brasil (64). Assim, o que parece é que a aquisição dessa enzima seja uma característica do ST277 no Brasil, refletindo a fuga do gene *bla*_{SPM-1} a partir de uma espécie não identificada, com a subsequente disseminação nacional e um único exemplo de transferência internacional (1).

Além de carrear o gene *bla*_{SPM-1}, o ST277 também tem sido associado a outros genes de resistência que contribuem para o fenótipo multirresistente desse clone.

Carvalho e colaboradores em 2006, mostraram que amostras brasileiras positivas para *bla*_{SPM-1} também carreavam um integron de classe 1 (*In163*) contendo cassetes de genes que conferem resistência a β -lactâmicos e aminoglicosídeos (*aacA4*, *bla*_{OXA-56} e *aadA7*), e uma *ISPa21* (59).

Além disso, tem sido descrito, nas amostras pertencentes ao ST277, a presença do gene *rmtD* adjacente a este integron (65). Este gene codifica a metilase de RNAr 16S RmtD, que confere resistência a altas concentrações de quase todos os tipos aminoglicosídeos (66).

No presente estudo, o *In163* foi detectado em 16 amostras, todas pertencentes ao ST277 (84% das amostras desse ST). Não existem estudos mostrando a prevalência deste *In163* no ST277 nem na população bacteriana.

Já em relação ao gene *rmtD*, a prevalência foi alta na amostragem estudada aqui (54%). Essa taxa foi menor que os resultados obtidos entre amostras de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenem isoladas entre 2005 e 2006 no Brasil (75%) (66), no entanto nossos dados mostram que esse gene ainda é bastante frequente entre as amostras dessa espécie no nosso país.

De acordo com os estudos publicados até o momento, o gene *rmtD* só foi encontrado em bactérias Gram-negativas isoladas na América Latina (69). No que diz respeito a *P. aeruginosa*, as amostras dessa espécie positivas para *rmtD* só foram encontrada no Brasil (66, 67, 71).

Neste estudo, 55% das amostras *rmtD* positivas pertenciam ao clone epidêmico (clone SP/ST277). No estudo de Doi e colaboradores em 2007, essa taxa foi igual a 76% (66). Esses dados mostram maior prevalência desse gene em um clone específico, o que pode estar relacionado a identificação de *rmtD* apenas em *P. aeruginosa* do Brasil, já que esse clone é endêmico no nosso país, e pouco se sabe sobre sua presença no mundo.

Encontramos coprodução de *bla_{SPM-1}* e *rmtD* em 32% das nossas amostras do ST277. Este tipo de associação foi observada pela primeira vez em 2006 (70), e já foi descrita como alta (81%) entre amostras do clone SP do estado de São Paulo, isoladas entre os anos de 2005 e 2006 (66). Contudo, taxas bem inferiores (15%) foram observadas em amostras brasileiras clonalmente distintas e geograficamente não relacionadas, isoladas no ano de 2002 (66, 67).

Assim, de acordo com os nossos resultados e o descrito na literatura, o ST277 parece estar intimamente relacionado à disseminação de SPM-1 e RmtD, juntos ou separados.

A relação dos genes *rmtD* e *bla_{SPM-1}* com o ST277, leva a hipótese de que esses mecanismos de resistência poderiam estar associados em estruturas genéticas que permitiriam, por exemplo, a sua mobilização e transferência conjunta. Um exemplo são elementos conjugativos e integrativos (ICE).

Os ICEs englobam todos os elementos móveis auto-transmissíveis conjugativos integrativos, independente do mecanismo usado para tais processos. Isso inclui elementos que são caracterizados comumente como transposons conjugativos e elementos cromossômicos classificados como ilhas genômicas (IG). Muitas IG que não são móveis devem se tratar de ICEs defeituosos (48).

Ilhas genômicas são discretos segmentos de DNA que contém informações que contribuem para a diversificação e adaptação do microrganismo, tendo um impacto significativo na plasticidade e evolução do genoma, disseminação de resistência à antibióticos e genes de virulência, e formação de vias catabólicas (92).

P. aeruginosa possui várias ilhas genômicas caracterizadas, carreando genes associados a sistemas de transporte (PAGI-2, LESGI-3), virulência (PAPI-1, PAPI-2, LESGI-5) e resistência (GI2) (93, 94)

Em relação a localização genética destes genes (cromossomal ou plasmidial), nada foi descrito para *rmtD* e *In163*, e existem apenas poucos relatos sugerindo a presença de *bla*_{SPM-1} tanto em plasmídios como cromossomo. Os resultados obtidos por Poirel e colaboradores em 2004 sugeriram que o gene *bla*_{SPM-1} estaria inserido em um grande plasmídio de 400 kb. No entanto, as tentativas de transferir esse possível plasmídio por eletroporação falharam, sugerindo que o gene *bla*_{SPM-1} seria diferente de *bla*_{IMP} e *bla*_{VIM} com relação à habilidade de ser transmitido entre microrganismos (63, 95).

A hipótese de que o gene *bla*_{SPM-1} possa estar localizado no cromossomo não pode ser descartada. Em estudo realizado por Salabi e colaboradores em 2010, esse gene foi encontrado em duas cópias no DNA de três amostras positivas, e experimentos de hibridação mostraram que ele estaria no cromossomo bacteriano (64).

Para tentar elucidar a localização genética destes genes realizamos testes de hibridação, visando a possibilidade de encontra-los em um mesmo fragmento de restrição e assim inferir a proximidade entre eles.

Vários trabalhos utilizam de PFGE seguido de hibridação para determinar a localização de genes (96). A utilização em particular da enzima *I-CeuI* é comum em estudos com o objetivo de determinar a localização plasmidial ou cromossômica de genes adquiridos (64).

A enzima *I-CeuI* é capaz de reconhecer e cortar sítio de 26 pb altamente conservado no gene *rml* (23S RNAr). Assim, o número de fragmentos obtidos pela restrição com esta enzima é indicativo do número de genes *rml* no genoma (97).

A quantidade e a localização dos genes *rml* são conservados entre as amostras de uma mesma espécie bacteriana. A restrição *in silico* da amostra PAO1 (NCBI Reference Sequence: NC_002516.2) com a enzima de restrição *I-CeuI*, gera 4 grandes fragmentos, de aproximadamente 4.061kb, 945kb, 772kb e 472kb. Entre as amostras estudadas aqui, foi possível visualizar no gel de PFGE apenas os fragmentos de aproximadamente 945kb, 772kb

e 472kb. Acredita-se, então, que o fragmento de aproximadamente 4.061Kb não tenha entrado no gel devido ao seu alto peso molecular (Figura 4.2).

Os resultados obtidos com esses testes não foram conclusivos quanto a localização plasmidial ou cromossômica de nenhum dos alvos pesquisados. Em todas as amostras houve apenas marcação no poço. Assim, podemos supor que estes genes estejam inseridos no cromossomo, pois com o tempo de corrida e o tamanho dos fragmentos observados no gel, acreditamos que mesmo plasmídios de alto peso molecular teriam migrado no gel de PFGE.

Entretanto, não podemos descartar a possibilidade destes genes estarem inseridos em um plasmídio que possa ter ficado preso junto ao DNA cromossomal no poço ou ter saído do gel devido ao longo tempo de corrida utilizado.

De acordo com os resultados obtidos nas etapas de hibridação após digestão com *SpeI* e *XbaI*, não foi possível obter nenhum fragmento de DNA contendo os genes *bla_{SPM-1}* e *rmtD* juntos.

Doi e colaboradores (2008) mostraram a presença do *In163* e do gene *rmtD* em um fragmento de 17kb gerado pela digestão com a enzima *SpeI* (GenBank DQ914960) (65). No presente estudo, conseguiu-se obter marcação com a sonda de *In163* para todas as amostras após digestão com *SpeI*. Tendo observado a presença destas estruturas genéticas (*rmtD* e *In163*) juntas na amostra CCBH5939, em um fragmento de aproximadamente 25kb, mesmo tamanho dos fragmentos marcados com *rmtD* para a maioria das amostras, acreditamos que este fragmento de 25kb seja correspondente ao fragmento de 17kb do estudo citado, já que o peso molecular dos fragmentos foi uma estimativa gerada pelo programa Bionumerics baseando-se em um peso molecular cujo o menor fragmento possuía 48,5kb (Figuras 4.3 e 4.4). A amostra CCBH5698 mostrou essas duas estruturas juntas em um fragmento de aproximadamente 508kb, reafirmando a ideia de que essa amostra tenha sofrido rearranjos em relação às demais.

Em relação a digestão com a *XbaI*, foram obtidas marcação em quase todas as amostras, mas as duas estruturas (*rmtD* e *In163*) encontravam-se em fragmentos diferentes. No entanto, através de restrição *in silico* da sequência depositada no GenBank (DQ914960) existe um sítio de restrição da enzima *XbaI* nesta região, o que justifica a marcação em bandas diferentes para esses dois alvos. Por isso, os resultados dessa etapa não são definitivos quanto a distância entre *rmtD* e *bla_{SPM-1}*, uma vez que mesmo se eles fossem próximos poderia existir um sítio de restrição enzimática entre esses genes.

Para maiores esclarecimentos, algumas amostras foram selecionadas para a etapa de sequenciamento total do genoma. Neste grupo amostral haviam amostras positivas apenas

para um dos genes estudados, amostras positivas para os dois e uma negativa para os dois genes, e entre elas perfis de hibridação distintos. Procurou-se selecionar amostras que fossem representativas de cada situação, para analisar a fundo o contexto genético destes genes, e se haveria alguma relação entre eles.

A grande vantagem do tipo de tecnologia para sequenciamento usada, é que ela permite a produção de um número muito grande de dados, sequenciando milhões de fragmentos de DNA em paralelo, com uma única corrida (80). Entre outras funções, sequenciadores de nova geração vêm sendo usados para sequenciar e caracterizar clones bacterianos importantes (87).

O sequenciamento com a plataforma MiSeq e montagem usando o pacote Geneious, gerou de 150 a 1.356 contigs por amostra. Não foi possível montar o genoma completo. A existência de várias regiões repetitivas no genoma da *P. aeruginosa* provavelmente dificultou sua montagem.

O auxílio de outra tecnologia de sequenciamento de nova geração, além de diferentes estratégias de montagem e fechamento de *gaps* poderão auxiliar futuramente nesse objetivo.

Apesar do genoma completo não ter sido montado, foi possível visualizar um pouco mais do contexto genético onde estão inseridos os genes *bla*_{SPM-1} e *rmtD*. Antes deste presente trabalho, o que era sabido sobre o contexto genético de *bla*_{SPM-1}, *rmtD* e *In163* pode ser resumido nos próximos três parágrafos.

Poirel e colaboradores descreveram o gene *bla*_{SPM-1} em uma região de 3.312pb, onde foi observado anterior ao gene *bla*_{SPM-1} uma fase de leitura aberta, *orf495*, cujo produto faz parte da estrutura transponível, ISCR4. Anterior à *orf495*, está presente a sequência codificante da extremidade C-terminal de uma proteína chaperonina hipotética, conhecida como GroEL1. Posterior ao *bla*_{SPM-1}, uma sequência que codifica para a parte N-terminal truncada de uma proteínas similar à GroEL1, chamada de GroEL2 (Figura 3.3.). O final 5' da *orf495*, anterior ao *bla*_{SPM-1}, é idêntico a extremidade 3' do gene *groEL2*. Portanto, pelo menos parte da *orf495* está presente nas duas extremidades de *bla*_{SPM-1}, indicando uma possível duplicação de parte da estrutura genética alvo, subsequente a um processo de mobilização, por exemplo um evento de *one-ended*, que contribui para o aumento da dispersão do gene de resistência (63).

O contexto genético do gene *rmtD* já foi descrito em uma amostra de *K. pneumoniae* e uma de *P. aeruginosa* pertencente ao ST277 (65).

Em *K. pneumoniae*, foi observado uma região de 9,1kb que incluía o gene *rmtD* seguido do gene hipotético de RNAt ribosiltransferase, e logo depois o gene *groEL* truncado. Delimitando essa região, existia uma *orf494* de cada lado, porém as duas eram interrompidas

por uma sequência de inserção *IS26*. Na extremidade 5' dessa região existia um integron de classe I truncado pela *IS26* (65).

Na amostra de *P. aeruginosa* foi sequenciado uma região de 17,9kb, que compreendia o *In163* (cujo a integrase estava truncada por uma *orf102*), e logo em seguida encontrava-se o *rmtD*, seguido de um gene hipotético de RNAt ribosiltransferase, e o gene *groEL* truncado. Essa região é delimitada por duas cópias da *orf494* (não truncadas), que representa o elemento ISCR14, estrutura capaz de exercer um papel vital na mobilização do gene. A jusante da segunda cópia da *orf494* estão *sull* e parte do transposon *Tn5564*, que contém o gene *cmx*, codificador da proteína exportadora de cloranfenicol (65).

Uma vez que a relação entre *rmtD* e *In163* estava descrita, a localização do gene *bla_{SPM-1}* em relação à essas duas estruturas permanecia desconhecida. Essa informação é importante já que todos eles são características adquiridas importantes de um mesmo clone.

Através de sucessivas análises - que incluíram os contigs gerados na montagem *de novo*, montagens por referência e alinhamentos par a par - chegou-se a uma região de 13.959pb, que incluía o gene *bla_{SPM-1}* inserido na ISCR4, além de outros genes anteriores à essa estrutura.

Dentre os genes encontrados a frente do ISCR4, foram encontrados *virD2* e *virD4*. Esses genes foram descritos em um plasmídio de *Agrobacterium tumefaciens*. A região *vir* desse plasmídio inclui no mínimo seis componentes: *virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE* e *virG*. O operon *virD* codifica peptídeos que participam de uma reação de clivagem do DNA plasmidial sítio-cadeia-específica, antes da sua transferência de uma célula para outra. No estudo de Rivera-Calzad e colaboradores em 2013, foi realizado uma análise molecular de *virD* que revelou que ele pode codificar, no mínimo, quatro peptídeos de pesos moleculares distintos. Desses, *VIRD1* e *VIRD2* são requeridos para clivagem endonucleotídica das extremidades da molécula do DNA plasmidial (98). Já a molécula *VIRD4* faz parte da estrutura do sistema de secreção do tipo IV (T4S) *VirB/D* de *A. tumefaciens* (99).

Sistemas de secreção do tipo IV são preferencialmente usados para o transporte de proteínas efetoras bacterianas passando pela membrana bacteriana e a membrana da célula eucariótica receptora. Esse sistema de secreção também media a transferência horizontal de genes, contribuindo para plasticidade do genoma, evolução do patógeno e disseminação de genes de resistência à antibióticos e fatores de virulência (100).

Outro grupo de genes encontrados no contig contendo *bla_{SPM-1}* foram os *trb*. Esses genes fazem parte de um operon (operon *trb*) identificado no plasmídio RK2, que possui uma ampla gama de hospedeiros (101). Os genes codificados por esse operon são os principais

responsáveis pelo espalhamento promiscuo desse plasmídio. Eles codificam as principais proteínas do aparato responsável por promover a formação de “pontes de acasalamento”, através das quais o DNA é transferido. A proteína TrbB é o principal produto desse operon, atuando como uma espécie de chaperonina no processo de montagem de estruturas associadas à membrana da bactéria, como pili e sistemas de transporte (101). Já o gene *trbC* codifica o precursor de uma subunidade de um pili conjugativo (102).

Os outros genes encontrados estão relacionados com a resistência ao cobre em *Vibrio cholerae* (*copG*) e biciclomicina, um antibiótico que se liga especificamente a proteína Rho, impedindo que esta proteína bloqueie a transcrição de genes adquiridos (103, Tran et. al., 2011).

A função não essencial exercida pelos genes encontrados na região anterior de *bla*_{SPM-1}, como envolvimento na transferência de material genético entre células e resistência à compostos, sugerem que este gene faça parte de um plasmídio ou de uma outra estrutura móvel que teria sido incorporada ao cromossomo dessa cepa de *P. aeruginosa*.

Não foi possível aumentar a região 3' da sequência já descrita por Poirel e colaboradores em 2004 (63). Na extremidade dessa região existe um gene *groEL*, que está presente em mais de uma cópia no genoma de *P. aeruginosa*, e possui sequências repetidas invertidas. Isso provavelmente impediu a extensão dessa região.

O fato do gene *bla*_{SPM-1} não ter sido sequenciado na amostra CCBH5698 não indica sua ausência nessa mostra, uma vez que o resultado da PCR e os testes de hibridação para esse gene foram positivos.

Para as amostras *bla*_{SPM-1} negativas, a região ao redor do gene contendo os genes aqui descritos estava ausente. Caso *bla*_{SPM-1} estivesse inserido em uma região cromossômica pré-existente no clone ST277, mesmo as amostras negativas teriam as regiões adjacentes ao gene.

De acordo com o resumo publicado no *Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (ICAAC) de 2007, Castanheira e colaboradores sugerem que o gene *bla*_{SPM-1} esteja associado a um ICE transposon Tn4371-like (ICE_{Tn4371}6060) (104), não depositado no banco de dados de GenBank. A região onde encontramos o gene *bla*_{SPM-1} inserido em nosso estudo (Figura 4.7) se assemelha à sequência desse transposon (*Tn4371*, GenBank AJ536756.1) em uma região que vai do nucleotídeo 1 ao 7.266pb (e-value: 0.0, ID:83%). Na nossa sequência, a partir do nucleotídeo 10.000 aproximadamente, se encontra a ISCR4. Segundo Castanheira e colaboradores (104), o elemento ISCR4 teria sido o responsável pela inclusão de *bla*_{SPM-1} no ICE_{Tn4371}6060. O fato de termos encontrado uma

região similar a esse ICE anterior ao ISCR4 pode ser indicativo de que essa região realmente se trate do ICE_{Tn4371}6060. Caso essa informação seja confirmada posteriormente, a inserção desse gene em um ICE pode explicar os relatos do mesmo tanto em plasmídio (63) quanto em cromossomo (64), uma vez que é característico desse elemento se inserir em plasmídios bem como em cromossomos (47).

Em relação ao contexto genético do gene *rmtD* e do *In163*, foi encontrado um consenso de 239.648pb.

As extremidades desse consenso correspondem a regiões do cromossomo da cepa referência PAO1 (NCBI Reference Sequence: NC_002516.2). Essas duas regiões são contínuas na cepa original, o que sugere que a região de aproximadamente 100kb encontrada entre elas tenha se inserido no cromossomo das amostras do ST277 em algum momento da evolução.

Segundo Juhas e colaboradores, ilha genômica é um termo global usado para a família de discretos elementos de DNA que fazem parte do cromossomo de uma célula, podendo conduzir ou ter conduzido a diferenciação da cepa. Esses elementos compartilham algumas características como i) tamanho relativamente grande, entre 10 e 200kb; ii) são reconhecidos através de estatísticas de nucleotídeos como conteúdo GC, frequência de tetranucleotídeos ou uso de códons; iii) geralmente são inseridos em genes de RNAt e flanqueadas por repetições diretas de 16 a 20pb, perfeitas ou quase perfeitas; iv) muitas vezes abrigam genes que codificam para integrases ou fatores relacionados à sistemas de conjugação plasmidial ou fagos envolvidos na transferência de ilhas genômicas; v) costumam carrear IS ou transposons; e finalmente vi) costumam carrear genes que oferecem uma vantagem seletiva para a bactéria hospedeira (92).

Analisando a anotação do consenso, observou-se que exatamente na região onde o bloco de DNA da PAO1 teria sido interrompido, existe a sequência que codifica para o RNAt de uma glicina, e mais a frente o gene de uma integrase. Inseridos na região de aproximadamente 100kb estão ainda a ISCR14, duas cópias de parte do *Tn5564*, *In163*, genes relacionados ao sistema de conjugação plasmidial (*virB4*, *virD4*, *pilL*) e uma região com 85% de identidade com parte de um transposon de *P. putida* onde se encontram várias proteínas hipotéticas encontradas em uma ilha genômica de *P. aeruginosa* (PAGI-1) (GenBank AJ6177402, e-value 0.0).

Os genes *virB2* e *virD4* encontrados aqui provavelmente fazem parte do T4SS VirB/D já citado anteriormente (99). Relatos da presença de T4SS em ilhas genômicas de diferentes

bactérias (100), reforçam a hipótese de que a estrutura descrita aqui se trate de uma variante desse elemento genético.

Dentro dessa região de 100kb, encontramos 21kb correspondentes ao genoma da bactéria *H. arsenicoxydans*, uma representante de um novo gênero que compreende bactérias isoladas de vários ambientes aquáticos, incluindo, minerais, água potável e ambientes contaminados (105). Como *P. aeruginosa* também é uma bactéria ambiental, presente em recursos hídricos (3), a troca de material entre essas duas espécies provavelmente ocorreu nesse ambiente.

Uma característica usada para diferenciar sequências de DNA intrínsecas de uma espécie daquelas adquiridas, é o conteúdo GC desta região. Genes adquiridos de outras espécies geralmente possuem o um conteúdo GC menor que o genoma necessário para manutenção da espécie (93).

O conteúdo GC da região de 100kb encontrada em nosso estudo contendo o gene *rmtD* e o *In163* é de 63% e o conteúdo GC do genoma de *P. aeruginosa* é aproximadamente 66,6%. Apesar de não ter sido uma diferença muito significativa, esta região só apresentou identidade com outras espécies (não *P. aeruginosa*), como *H. arsenicoxydans*, *Alicyciphilus denitrificans* e *P. putida* (Figura 4.16)

Além disso, é sabido que uma vez integrado ao cromossomo, o DNA “estrangeiro” sofre a mesma pressão que o resto do genoma, e com o passar do tempo ele deve perder as diferenças na composição da sequência, e tornar-se indistinguível do resto do genoma (93). Visto que as amostras negativas para *rmtD* desse estudo possuem essa região supostamente correspondente a uma IG, sugere-se que ela exista a muito tempo neste clone de *P. aeruginosa*, tempo suficiente para que seu conteúdo GC se iguale ao restante do genoma.

A amostra CCBH5698 apresentou uma estrutura em torno do *In163* e *rmtD* diferente em relação as demais amostras. Foi observada a ausência da transposase do *Tn5564* e do gene *cmx*, além de uma aparente grande discordância entre uma sequência de nucleotídeos encontrada dentro da nova suposta IG e a sequência da amostra (Figura 4.18C). Estas diferenças, além das diferenças encontradas nos padrões de hibridação e no padrão de fragmentação do DNA pelo PFGE, demonstram a ocorrência de vários rearranjos nesta amostra indicando uma maior distância evolutiva entre elas.

A resistência a gentamicina (aminoglicosídeo) nas amostras *rmtD* negativas pode ser explicado pela presença do gene *aacA4* e *aadA7*, encontrados no *In163* em todas as amostras sequenciadas.

Através do sequenciamento total do genoma, investigamos também a presença de mutações em outros genes relacionados a resistência a antimicrobianos, já que as amostras selecionadas foram consideradas multirresistentes (resistentes a ceftazidima e/ou cefepime, amicacina e/ou gentamicina e ciprofloxacina).

Além da produção de enzimas inativadoras de antibióticos do tipo β -lactâmicos, *P. aeruginosa* possui outras formas não menos importantes de se tornarem resistentes a essas drogas, como bombas de efluxo que expulsam o antibiótico da célula bacteriana; e alterações nos poros da membrana plasmática, tornando-os ineficientes (33).

Perfis distintos de susceptibilidade e mecanismos de resistência aos β -lactâmicos foram encontrados entre amostras de *P. aeruginosa* do Brasil e dos EUA. Enquanto no Brasil havia prevalência da superexpressão das bombas de efluxo do tipo MexXY-OprM e do gene *ampC*; nos Estados Unidos, MexXY-OprM e MexAB-OprM eram igualmente superexpressas e a superexpressão de *ampC* não foi detectada. Isso exemplifica a importância de determinar a epidemiologia local, através da investigação dos perfis e dos mecanismos de resistência de clones prevalentes em cada região (106).

Todas as amostras sequenciadas no presente trabalho apresentaram deleção de 2 nucleotídeos que acarretou em uma mudança no quadro de leitura (*frameshift*) da proteína OprD. Deleções que criam novos quadros de leitura podem impedir a produção de uma proteína funcional, e a perda dessa proteína pode reduzir significativamente a susceptibilidade à β -lactâmicos, levando à resistência ao imipenem e a redução da susceptibilidade ao meropenem (27, 31).

Estudos prévios sugerem que mutações inativadoras da OprD são o principal mecanismo (98%) para resistência ao imipenem em *P. aeruginosa* (107). A diminuição da expressão de OprD devido a mutações no gene é considerada uma característica universal de amostras resistentes ao imipenem (108, 30, 32). Isso justificaria a presença de resistência ao imipenem nas amostras negativas para SPM-1 incluídas em nosso estudo (Tabela 4.3).

A seleção de mutantes superprodutores de AmpC durante a terapia antimicrobiana é conhecida por ser causada principalmente por mutações em *ampD* e/ou *dacB* (46). Nós encontramos apenas duas mutações em *ampD* e nenhuma em *dacB*. Uma das mutações encontradas em *ampD* neste trabalho, substituição de uma glicina por uma alanina na posição 148, também foi observada na AmpD da maioria das amostras estudadas por Schmidtke & Hanson (109), mas nenhuma relação direta foi estabelecida entre essa mutação e a resistência à β -lactâmicos. Portanto, a contribuição da hiperprodução de AmpC para o fenótipo multirresistentes das amostras sequenciadas não pode ser concluída.

Sobre a bomba de efluxo MexAB-OprM, foram encontrados apenas mutantes NaIC, com a substituição de uma glicina por glutamato na posição 71 e serina por arginina na posição 209, já encontradas em outros estudos (38, 32). A mutação S209R em mutantes NaIC possui impacto na atividade de efluxo da bomba, no entanto G71E é considerado insignificante. A significância dessa combinação para expressão de *mexB* necessita de mais investigações (32), porém deve ser considerada visto que as amostras negativas para *bla*_{SPM-1} são resistentes ao meropenem (Tabela 4.3).

O gene repressor da bomba de efluxo MexXY-OprM, *mexZ*, apresentou mudança no quadro de leitura (*frameshift*) produzindo uma proteína não funcional, o que já foi associado à superprodução constitutiva dessa bomba (38). A superexpressão de MexXY-OprM em amostras clínicas confere resistência não somente à aminoglicosídeos, mas também ao cefepime e fluoroquinolonas (6).

Amostras com o gene *mexT* funcional e conseqüentemente atividade detectável da bomba MexEF-OprN, são conhecidas como mutantes *nfxC*. Foi observada a ausência de 8pb no gene *mexT* das nossas amostras, deleção que já foi associada ao fenótipo *nfxC* nos trabalhos de Maseda e colaboradores (2000) (41) e Llanes e colaboradores (2011) (110), resultando na diminuição da sensibilidade à antibióticos como clorofenicol e fluoroquinolonas, e aumento da virulência pelo efluxo de moléculas do sistema de sinalização QS (41, 37, 40).

Estudos recentes têm mostrado que para a bomba de efluxo MexEF-OprN ser hiperepressa é necessário a uma mutação no gene *mexS* (regulador negativo de *mexT*) além da mutação no gene *mexT* (Masseda et. al., 2000). No presente estudo, observou-se apenas uma mutação na sequência da proteína de MexS, a substituição de D249N. Essa mutação foi a mesma observada em amostras que hiperproduziam a bomba de efluxo MexEF-OprN no trabalho de Llanes e colaboradores (2011) (110).

Os reguladores das três bombas de efluxo estudadas aqui estavam alterados, levando provavelmente à superexpressão das mesmas, o que levaria a resistência a diferentes drogas como meropenem (MexAB-OprM), fluoroquinolonas (MexEF-OprN) e aminoglicosídeos (MexXY-OprM). No entanto, testes que avaliem o nível de expressão dessas bombas são necessários para confirmar essa suposição.

A superexpressão concomitante de bombas de efluxo diferentes em *P. aeruginosa* aumenta a capacidade desses sistemas, contribuindo para a emergência de amostras MDR (36, 38, 29).

O principal mecanismo de resistência à fluoroquinolonas é a ocorrência de mutações sítio-específicas nos genes da DNA girase (*gyrA* e *gyrB*) e da topoisomerase IV (*parC* e *parE*) (39,43).

Em todas as amostras, foram encontradas mutações em GyrA (T83I) e ParC (S87L, H262Q). Mutações nesses dois genes são as mais frequentes causando altos níveis de resistência à ciprofloxacina (43).

As mesmas mutações encontradas neste estudo, substituição de uma treonina por isoleucina na posição 83 em GyrA e serina por leucina na posição 87 em ParC, já foram associadas à resistência à fluoroquinolonas em outros trabalhos (111, 39, 43). Portanto, a resistência à ciprofloxacina encontrada para todas as nossas seis amostras poderia ser explicada por essas mutações.

As mutações encontradas aqui podem justificar o fato de *P. aeruginosa* pertencentes ao clone ST277 exibirem altos níveis de resistência aos carbapenemas, cefalosporinas de amplo espectro, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos mesmo na ausência de SPM-1 ou RmtD. Esse acúmulo de resistência impõe uma imensa limitação para as opções terapêuticas disponíveis no tratamento de infecções causadas por esse clone.

Nesse trabalho foi possível identificar a conservação de mutações em amostras do mesmo clone isoladas em anos (2004, 2007, 2008 e 2010) e estados (Rio de Janeiro e Goiás) diferentes. Essas observações são indícios da conservação dessas características entre linhagens distintas, provavelmente uma característica do clone ST277. A aquisição de resistência pode ser um fator-chave para a ascensão de um clone, tornando-o prevalente e multirresistente (1).

Com esse estudo, análises comparativas de sequências permitiram observar as peculiaridades de clone ST277 de *P. aeruginosa*, e assim obter novas visões sobre esse clone espalhado pelo mundo, mas principalmente importante no Brasil.

6. CONCLUSÃO

Observamos com o nosso estudo que as amostras *bla*_{SPM-1} positivas se encontravam em dois clones (A e M) através de PFGE, entretanto ambos correspondiam ao ST277. Isso indica uma mesma origem filogenética desses clones, porém a amostra do clone M teria sofrido rearranjos ao longo do tempo, em genes não conservados provavelmente, que levaram as diferenças observadas nos resultados de *Sourthen blot* e sequenciamento, em relação às demais amostras.

Os genes *bla*_{SPM-1 -1} e *rmtD* parecem não estar associados no mesmo contexto genético, mas ambos estão em regiões ausentes no genoma da cepa selvagem usada como referência (PAO1). Essas regiões são semelhantes à elementos genéticos móveis. No caso do gene *rmtD* e In163, os encontramos inseridos em uma ilha genômica incorporada ao cromossomo bacteriano. Para *bla*_{SPM-1}, ainda não sabemos se esse elemento está incorporado ao cromossomo, ou livre em forma de plasmídio.

Encontramos mutações nos genes *oprD*, *ampD*, *mexZ* (regulador da bomba MexXY-OprM), *mexS* (regulador de MexT), *mexT* (regulador de MexEF-OprN), *gyrA* e *parC* que foram comuns às seis amostras sequenciadas do ST277. Isso explicaria o fenótipo MDR nas amostras negativas para *rmtD* e/ou *bla*_{SPM-1 -1}.

Além disso, como estas amostras foram isoladas em estados e anos diferentes acreditamos que essas mutações sejam características do ST277, o que pode ser um dos fatores associados a característica epidêmica deste clone no Brasil.

7. REFERÊNCIAS

- 1- Woodford N, Turton JF, Livermore DM. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 2011; 35(5):736-55.
- 2- Kanj SS, Kanafani ZA. Current concepts in antimicrobial therapy against resistant Gram-negative organisms: extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae, carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Mayo Clin Proc.* 2011;86(3):250-9.
- 3- Blondell-Hill E, Henry DA, Speert DP. *Pseudomonas*. In: *Manual of Clinical Microbiology*. (Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA, editors). 9^a ed. ASM Press, Washington, DC, USA; 2007. Pag 734-748
- 4- Pollack, M. *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Principles and practice of infectious diseases*. (Mandeli, G.L., Benett, J.E. & Dolin, R. editors), 4th ed. New York, Churchill Livingstone. 1995. Pp. 1980-2003.
- 5- Koneman EW, Stephen D. Allen S.D., Janda WJ, Schreckenberger PC, C. Winn WC. *Diagnóstico Microbiológico - Texto e Atlas Colorido - 6^a Ed.* Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ; 2008.
- 6- Mesaros N, Nordmann P, Plésiat P, Roussel-Delvallez M, Van Eldere J, Glupczynski Y, et al. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clin Microbiol Infect.* 2007; 13(6): 560–578.
- 7- Ratnaningsish E, Dharmsthvi S, Kirishnapillaai V, Morganm A, Sinclair M, Holloway BW. A combined physical and genetic map of *Pseudomonas aeruginosa* PA0.J *Gen Microbiol.* 1990; 136: 2351-2357.
- 8- Sader HS, Gales AC, Pfaller MA, Mendes RE, Zoccoli C, Barth A, Jones RN. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Braz J Infect Dis.* 2001; 5(4):200-14.
- 9- Gales AC, Castanheira M, Jones RN, Sader HS. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012; 73(4):354-60.
- 10- Eguchi H, Miyamoto T, Kuwahara T, Mitamura S, Mitamura Y. Infectious conjunctivitis caused by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a bathroom. *BMC Res Notes.* 2013; 6(1):245.

- 11- Setoguchi M, Iwasawa E, Hashimoto Y, Isobe M. A patient with infective endocarditis caused by community-acquired *Pseudomonas aeruginosa* infection. Intern Med. 2013; 52(11):1259-62.
- 12- Andrade SS, Sader HS, Barth AL, Ribeiro J, Zoccoli C, Pignatari AC, Gales CC. Antimicrobial Susceptibility of Gram-negative Bacilli isolated in Brazilian Hospitals participating in SENTRY Program (2003-2008). Braz J Infect. Dis. 2008; 12:3-9.
- 13- Saiman L, Siegel J. The Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference on Infection Control Participants. Suppl Am J Infect Control. 2003; 31(3): S1-62.
- 14- Kerr KG, Snelling AM. *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. J Hosp Infect . 2009; 73:338-344.
- 15- Rumbaugh KP, Griswold JA, Hamood AN. The role of quorum sensing in the in vivo virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. Microbes Infect. 2000; 2(14):1721-31.
- 16 -Shih PC & Huang CT. Effects of quorum-sensing deficiency on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and antibiotic resistance. J. Antimicrob Chemother. 2002; 49: 309-314.
- 17- Moore NM, Flaws ML. Antimicrobial Resistance Mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa*. Clin Lab Sci . 2011; 24(1): 47.
- 18- Tamma PD, Cosgrove SE, L L. Combination Therapy for Treatment of Infections with Gram-Negative Bacteria. Maragakis. Clin Microbiol Ver. Jul. 2012; 25(3): 450-470.
- 19- Suarez C, Peña C, Arch O, Dominguez MA, Tubau F, Juan C, Gavaldá L, Sora M, Oliver A, Pujol M, Ariza J. A large sustained endemic outbreak of multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*: a new epidemiological scenario for nosocomial acquisition. BMC Infect. Dis. 2011; 13: 11-272.
- 20- Bonten MJ, Bergmans DC, Speijer H, Stobberingh EE. Characteristics of polyclonal endemicity of *Pseudomonas aeruginosa* colonization in intensive care units. Implications for infection control. Am J Respir Crit Care Med. 1999;160(4):1212-9.
- 21- National Nosocomial Infections Surveillance System. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. Am J Infect Control. 2004; 32(8):470–485.
- 22- Zilberberg MD, Shorr AF. Prevalence of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and carbapenem-resistant Enterobacteriaceae among specimens from hospitalized patients with pneumonia and bloodstream infections in the United States from 2000 to 2009. J Hosp Med. 2013; 8(10):559-63.

- 23- OPAS/OMS e Anvisa. Termo de Cooperação 37 (TC 37) entre a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS/OMS) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Monitoramento e Prevenção da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde. Relatório Anual 2008. Brasília, julho de 2009.
- 24- Gales AC, Jones RN, Turnidge J, Rennie R, Ramphal R. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates: occurrence rates, antimicrobial susceptibility patterns, and molecular typing in the global SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin Infect Dis.* 2001; 32: suppl. 2, 146-155.
- 25- Hancock RE. Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative Gram-negative bacteria. *Clin Infect Dis.* 1998;27 Suppl 1:S93-9.
- 26- Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Our worst nightmare? *Clin Infect Dis.* 2002; 34: 634-40.
- 27- Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22(4):582-610.
- 28- Deplano A, Denis O, Poirel L, Hocquet D, Nonhoff C, Byl B, Nordmann P, Vincent JL, Struelens, MJ. Molecular characterization of an epidemic clone of panantibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 1198-1204.
- 29- Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Tubau F, Macia MD, Rodríguez C, Moya B, Zamorano L, Suárez C, Peña C, Martínez-Martínez L, Oliver A; Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI). Overexpression of AmpC and efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from bloodstream infections: prevalence and impact on resistance in a Spanish multicenter study. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55(5):1906-11.
- 30- Xavier DE, Picão RC, Girardello R, Fehlberg LCC, Gales AC. Efflux pumps expression and its association with porin down-regulation and b-lactamase production among *Pseudomonas aeruginosa* causing bloodstream infections in Brazil. *BMC Microbiology.* 2010; 10:217.
- 31- Fang ZL, Zhang LY, Huang YM, Qing Y, Cao KY, Tian GB, Huang X. OprD mutations and inactivation in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from China. *Infect Genet Evol.* 2014; 21:124-8.
- 32- Liu Y, Li XY, Wan LG, Jiang WY, Li FQ, Yang JH. Efflux system overexpression and decreased OprD contribute to the carbapenem resistance among extended-spectrum beta-

lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a Chinese university hospital. *Microb Drug Resist.* 2013; 19(6):463-8.

33- Lee JY, Ko KS. OprD mutations and inactivation, expression of efflux pumps and AmpC, and metallo- β -lactamases in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from South Korea. *Int J Antimicrob Agents.* 2012; 40(2):168-72.

34- Ball PR, Shales SW, Chopra I. Plasmid-mediated tetracycline resistance in *Escherichia coli* involves increased efflux of the antibiotic. *Biochem Biophys Res Commun.* 1980;93:74–81.

35- Poole K. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Annals of Medicine.* 2007; 39: 162–176.

36- Lee A, Mao W, Warren MS, Mistry A, Hoshino K, Okumura R, Ishida H, Lomovskaya O. Interplay between efflux pumps may provide either additive or multiplicative effects on drug resistance. *J Bacteriol.* Jun 2000;182(11):3142-50.

37- Maseda H, Uwate M, Nakae T. 2. Transcriptional regulation of the mexEF-oprN multidrug efflux pump operon by MexT and an unidentified repressor in nfxC-type mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett.* 2010 Oct;311(1):36-43.

38- Llanes C, Hocquet D, Vogne C, Benali-Baitich D, Neuwirth C, Plésiat P. Clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* overproducing MexAB-OprM and MexXY efflux pumps simultaneously. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48(5):1797-802.

39- Gorgani N, Ahlbrand S, Patterson A, Pourmand N. Detection of point mutations associated with antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents.* 2009; 34(5):414-8.

40- Luong PM, Shogan BD, Zaborin A, Belogortseva N, Shrout JD, Zaborina O, Alverdy JC. Emergence of the P2 phenotype in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 strains involves various mutations in mexT or mexF. *J Bacteriol.* 2014; 196(2):504-13.

41- Maseda H, Saito K, Nakajima A, Nakae T. Variation of the mexT gene, a regulator of the MexEF-OprN efflux pump expression in wild-type strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters.* 2000;191(2):107-12.

42- Sobel ML, Neshat S, Poole K. Mutations in PA2491 (*mexS*) Promote MexT-Dependent *mexEF-oprN* Expression and Multidrug Resistance in a Clinical Strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 2005;187(4):1246-53.

- 43- Pasca MR, Dalla Valle C, De Jesus Lopes Ribeiro AL, Buroni S, Papaleo MC, Bazzini S, et. al. Evaluation of fluoroquinolone resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* multidrug resistance clinical isolates. *Microb Drug Resist.* 2012; 18(1):23-32.
- 44- Poole K. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. *Front Microbiol.* 2011; 5:2:65.
- 45-Livermore DM. Bacterial resistance to carbapenems. *Adv Exp Med Biol.* 1995; 390:25-47.
- 46- Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Domínguez MA, Gago JF, Juan C, Tubau F, Rodríguez C, Moyà B, Peña C, Martínez-Martínez L, Oliver A; Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI). Genetic markers of widespread extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56(12):6349-57.
- 47- Toleman MA, Bennett PM, Walsh TR. ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century? *Microbiol Mol Biol Rev.* 2006; 70(2):296-316.
- 48-Wozniak RA, Waldor MK. Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8(8):552-63.
- 49- Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. Genetic support and diversity of acquired extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative rods. *Infect Genet Evol.* 2012; 12(5):883-93.
- 50- Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1980; 289(1036):321-31.
- 51- Hall BG, Barlow M. Revised Ambler classification of β -lactamases. *J Antimicrob Chemother* . . 2005; 55(6):1050-1
- 52- El Salabi A, Walsh TR, Chouchani C. Extended spectrum β -lactamases, carbapenemases and mobile genetic elements responsible for antibiotics resistance in Gram-negative bacteria. *Crit Rev Microbiol.* 2013; 39(2):113-22.
- 53- Bush K, Fisher JF. Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new β -lactamases from gram-negative bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 2011;65:455-78.
- 54- Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2007; 20(3):440-58.
- 55- Picoli SU. Metallo- β -lactamase e *Pseudomonas aeruginosa*. *RBAC.* 2008; 40(4): 273-277.
- 56- Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, Gales AC, Biedenbach DJ, Jones RN, Walsh TR. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin America:

report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Programme. J. Antimicrob. Chemother. 2002; 50: 673-679.

57- Zavascki AP, Barth AL, Gonçalves AL, Moro AL, Fernandes JF, Martins AF, Ramos F, Goldani LZ. The influence of metallo-beta-lactamase production on mortality in nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* infections. J Antimicrob Chemother. 2006; 58(2):387-92.

58- Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? Clin Microbiol Rev. 2005; 18(2): 306-325.

59- Carvalho AP, Albano RM, de Oliveira DN, Cidade DA, Teixeira LM, Marques EA. Characterization of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo-beta-lactamase in a hospital located in Rio de Janeiro, Brazil. Microb Drug Resist. 2006; 12(2):103-8.

60- Picão RC, Poirel L, Gales AC, Nordmann P. Diversity of beta-lactamases produced by ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates causing bloodstream infections in Brazil. Antimicrob Agents Chemother. 2009; 53(9):3908-13.

61- Franco MR, Caiaffa-Filho HH, Burattini MN, Rossi F. Metallo-beta-lactamases among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian university hospital. Clinics (Sao Paulo). 2010; 65(9):825-9.

62- Gales AC, Menezes LC, Silbert S, Sader HS. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- β -lactamase. J Antimicrob Chemother. 2003; 52: 699-702.

63- Poirel L, Magalhães M, Lopes M, Nordmann P. Molecular analysis of metallo- β -lactamase gene bla_{SPM-1}-surrounding sequences from disseminated *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Recife, Brazil. Antimicrob. Agents Chemother. 2004; 48: 1406-1409.

64- Salabi AE, Toleman MA, Weeks J, Bruderer T, Frei R, Walsh TR. First report of the metallo-beta-lactamase SPM-1 in Europe. Antimicrob Agents Chemother. 2010; 54(1):582.

65- Doi Y, Adams-Haduch JM, Paterson DL. Genetic environment of 16S rRNA methylase gene *rmtD*. Antimicrob Agents Chemother. 2008; 52(6):2270-2.

66- Doi Y, Ghilardi AC, Adams J, de Oliveira Garcia D, Paterson DL. High prevalence of metallo-beta-lactamase and 16S rRNA methylase coproduction among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Brazil. Antimicrob Agents Chemother. 2007b; 51(9):3388-90.

- 67- Castanheira M, Fritsche TR, Sader HS, Jones RN. RmtD 16S RNA methylase in epidemiologically unrelated SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52(4):1587-8;
- 68- Wachino J, Arakawa Y. Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: an update. *Drug Resist Updat.* 2012; 15(3):133-48.
- 69- Zhou Y, Yu H, Guo Q, Xu X, Ye X, Wu S, Guo Y, Wang M. Distribution of 16S rRNA methylases among different species of Gram-negative bacilli with high-level resistance to aminoglycosides. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2010; 29(11):1349-53.
- 70- Doi, Y., de Oliveira Garcia, D., Adams, J., Paterson, D.L. 2007. Coproduction of novel 16S rRNA methylase RmtD and metallo-beta-lactamase SPM-1 in a panresistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007a; 51(3):852-6.
- 71- Fontes LC, Neves PR, Oliveira S, Silva KC, Hachich EM, Sato MI, Lincopan N. Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* coproducing metallo- β -lactamase SPM-1 and 16S rRNA methylase RmtD1 in an urban river. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55(6):3063-4.
- 72- Sader H, Jones RN, Gales AC, Silna JB, Pignatari AC, the SENTRY Participants Group (Latin America). SENTRY Antimicrobial Surveillance Program Report: Latin American and Brazilian Results for 1997 through 2001. *Braz J Infect Dis.* 2004; 8: 25-79.
- 73- Fonseca EL, Freitas Fdos S, Vicente AC. The colistin-only-sensitive Brazilian *Pseudomonas aeruginosa* clone SP (sequence type 277) is spread worldwide. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54(6):2743.
- 74- Silva FM, Carmo MS, Silbert S, Gales AC. SPM-1-Producing *Pseudomonas aeruginosa*: Analysis of the Ancestor Relationship Using Multilocus Sequence Typing, 75-Pulsed-Field Gel Electrophoresis, and Automated Ribotyping. *Microb Drug Resist.* 2011; 17(2):215-20.
- 76- Jolley K. *Pseudomonas aeruginosa* MLST website. [Base de dados da internet]. University of Oxford.[acesso em 01 abril de 2014]. Disponível em <http://pubmlst.org/paeruginosa/>.
- 77- Guevara A, Sierra R CI, de Waard J. Molecular characterization of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from four hospitals of Venezuela. *Rev Chilena Infectol.* 2012; 29(6):614-21.

- 78- Yi M, Wang P, Liu Y. Molecular typing and resistance mechanisms of carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a Chinese surgical intensive care unit. *Chin Med J (Engl)*. 2014; 127(6):1071-6.
- 79- Sabat AJ, Budimir A, Nashev D, Sá-Leão R, van Dijk Jm, Laurent F, Grundmann H, Friedrich AW; ESCMID Study Group of Epidemiological Markers (ESGEM). Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Euro Surveill*. 2013; 18(4):20380.
- 80- Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, Lin D, Lu L, Law M. Comparison of next-generation sequencing systems. *J Biomed Biotechnol*. 2012; 2012:251364.
- 81- Normand R, Yanai I. An introduction to high-throughput sequencing experiments: design and bioinformatics analysis. *Methods Mol Biol*. 2013; 1038:1-26.
- 82- Guia do Usuário do sistema MiSeq [homepage na internet]. Illumina Illumina, San Diego, Califórnia, EUA. 2013. Disponível em: http://supportres.illumina.com/documents/documentation/system_documentation/miseq/translations/miseq-system-user-guide-15027617-k-ptb.pdf.
- 83- Caetano-Anollés, G., Gresshoff, P.M. Characterization and Classification of Microbes By Rep-PCR Genomic Fingerprinting and Computer-assisted Pattern Analysis". *DNAMarkers: Protocols, applications and overviews*. Ed. J. Wiley and Sons, New York, NY. 1997; P.151-171.
- 84- Ribot EM, Fair MA, Gautom R, Cameron DN, Hunter SB, Swaminathan B, Barrett TJ. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathog Dis*. 2006; 3(1):59-67.
- 85- Sambrook & Russell. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Volume 3. CSHL Press. 2001.
- 86- Winsor GL, Lam DK, Fleming L, Lo R, Whiteside MD, Yu NY, Hancock RE, Brinkman FS (2011). *Pseudomonas* Genome Database [Base de dados da internet]. [atualizado em 29 de Janeiro de 2014, último acesso em 15 de Março de 2014]. Disponível em: <http://pseudomonas.com/>.
- 87- Witney AA, Gould KA, Pope CF, Bolt F, Stoker NG, Cubbon MD, Bradley CR, Fraise A, Breathnach AS, Butcher PD, Planche TD, Hinds J. Genome sequencing and characterization of an extensively drug-resistant sequence type 111 serotype O12 hospital outbreak strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect*. 2014; 14.

- 88- Cipriano R, Vieira VV, Fonseca EL, Rangel K, Freitas FS, Vicente AC. Coexistence of epidemic colistin-only-sensitive clones of *Pseudomonas aeruginosa*, including the *bla*_{SPM} clone, spread in hospitals in a Brazilian Amazon City. *Microb Drug Resist.* 2007; 13(2):142-6.
- 89- Gonçalves DC, Lima AB, Leão LS, Filho JR, Pimenta FC, Vieira JD. Detection of metallo-beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospitalized patients in Goiânia, State of Goiás. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2009; 42(4):411-4.
- 90- Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33: 2233-2239.
- 91- Kiewitz C, Tümmler B. Sequence diversity of *Pseudomonas aeruginosa*: impact on population structure and genome evolution. *J Bacteriol.* 2000 Jun;182(11):3125-35.
- 92- Juhas M, van der Meer JR, Gaillard M, Harding RM, Hood DW, Crook DW. Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *FEMS Microbiol Rev.* 2009; 33(2):376-93.
- 93- Kung VL, Ozer EA, Hauser AR. The accessory genome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2010;74(4):621-41.
- 94- Martínez T, Vazquez GJ, Aquino EE, Goering RV, Robledo IE. Two novel class I integron arrays containing IMP-18 metallo- β -lactamase gene in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Puerto Rico. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56(4):2119-21.
- 95- Scheffer MC, Gales AC, Barth AL, Carmo Filho JR, Dalla-Costa LM. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clonal spread in southern Brazil and in the state of Goiás. *Braz J Infect Dis.* 2010; 14(5):508-9.
- 96- Farinha MA, Ronald SL, Kropinski AM, Paranchych W. Localization of the virulence-associated genes *pilA*, *pilR*, *rpoN*, *fliA*, *fliC*, *ent*, and *fbp* on the physical map of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 by pulsed-field electrophoresis. *Infect Immun.* 1993; 61(4):1571-5.
- 97- Liu SL, Hessel A, Sanderson KE. Genomic mapping with I-Ceu I, an intron-encoded endonuclease specific for genes for ribosomal RNA, in *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, and other bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90(14):6874-8.
- 98- Ghai J, Das A. The *virD* operon of *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid encodes a DNA-relaxing enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989; 86(9):3109-13.

- 99- Rivera-Calzada A, Fronzes R, Savva CG, Chandran V, Lian PW, Laeremans T, Pardon E, Steyaert J, Remaut H, Waksman G, Orlova EV. Structure of a bacterial type IV secretion core complex at subnanometre resolution. *EMBO J.* 2013; 32(8):1195-204.
- 100- Juhas M, Crook DW, Hood DW. Type IV secretion systems: tools of bacterial horizontal gene transfer and virulence. *Cell Microbiol.* 2008; 10(12):2377-86.
- 101- Zatyka M, Jagura-Burdzy G, Thomas CM. Transcriptional and translational control of the genes for the mating pair formation apparatus of promiscuous IncP plasmids. *J Bacteriol.* 1997; 179(23):7201-9.
- 102- Park W, Jeon CO, Hohnstock-Ashe AM, Winans SC, Zylstra GJ, Madsen EL. Identification and characterization of the conjugal transfer region of the pCg1 plasmid from naphthalene-degrading *Pseudomonas putida* Cg1. *Appl Environ Microbiol.* 2003; 69(6):3263-71.
- 103- Marrero K, Sánchez A, González LJ, Ledón T, Rodríguez-Ulloa A, Castellanos-Serra L, Pérez C, Fando R. Periplasmic proteins encoded by VCA0261-0260 and VC2216 genes together with copA and cueR products are required for copper tolerance but not for virulence in *Vibrio cholerae*. *Microbiology.* 2012; 158(Pt 8):2005-16.
- 104- Castanheira M, Gales A, Walsh TR, Campana EH, Toleman MA (2007) Association of *bla*_{SPM-1} with the transposon Tn4371. 47th Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy 17-20 September 2007, Chicago, IL.
- 105- Muller D, Médigue C, Koechler S, Barbe V, Barakat M, Talla E, et. al. A tale of two oxidation states: bacterial colonization of arsenic-rich environments. *PLoS Genet.* 2007; 3(4):e53. Epub 2007 Mar 5.
- 106- Fehlberg LC, Xavier DE, Peraro PP, Marra AR, Edmond MB, Gales AC. Beta-lactam resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* strains causing bloodstream infections: comparative results between Brazilian and American isolates. *Microb Drug Resist.* 2012; 18(4):402-7.
- 107- Riera E, Cabot G, Mulet X, García-Castillo M, del Campo R, Juan C, Cantón R, Oliver A. *Pseudomonas aeruginosa* carbapenem resistance mechanisms in Spain: impact on the activity of imipenem, meropenem and doripenem. *J Antimicrob Chemother.* 2011; 66(9):2022-7.
- 108- Quale J, Bratu S, Gupta J, Landman D. Interplay of efflux system, *ampC*, and *oprD* expression in carbapenem resistance of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50(5):1633-41.

- 109- Schmidtke AJ, Hanson ND. Role of ampD homologs in overproduction of AmpC in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008; 52(11):3922-7.
- 110- Llanes C, Köhler T, Patry I, Dehecq B, van Delden C, Plésiat P. Role of the MexEF-OprN efflux system in low-level resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; 55(12):5676-84.
- 111- Lee JK, Lee YS, Park YK, Kim BS. Alterations in the GyrA and GyrB subunits of topoisomerase II and the ParC and ParE subunits of topoisomerase IV in ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents*. 2005; 25(4):290-5.