

MARINA ROCHA BORGES DA FONSECA

**CARACTERIZAÇÃO DO FENÓTIPO MUTADOR DE ISOLADOS DE *Proteus mirabilis***

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Microbiologia

São Paulo  
2016

MARINA ROCHA BORGES DA FONSECA

**CARACTERIZAÇÃO DO FENÓTIPO MUTADOR DE ISOLADOS DE *Proteus mirabilis***

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Microbiologia

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo da Silva Galhardo

Versão original

São Paulo  
2016

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica  
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Rocha Borges da Fonseca, Marina  
Caracterização do fenótipo mutador de isolados de  
Proteus mirabilis / Marina Rocha Borges da Fonseca;  
orientador Rodrigo da Silva Galhardo. -- São Paulo,  
2016.  
82 p.

Dissertação (Mestrado) ) -- Universidade de São  
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Frequência de mutação. 2. Mutadores. 3. ICE  
SXT/R391. 4. Fosfomicina. 5. Heteroresistência. I.  
da Silva Galhardo, Rodrigo, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Marina Rocha Borges da Fonseca

Título da dissertação: Caracterização do fenótipo mutador de isolados de *P. mirabilis*

Orientador(a): Prof. Dr. Rodrigo da Silva Galhardo

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a ..... / ..... / ....., considerou

**Aprovada**                       **Reprovada**

Examinador(a):      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente:          Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"  
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP: 05508-000 São Paulo, SP - Brasil  
Telefone: (55) (11) 3091-7733 - Telefax: (55) (11) 3091-8405  
e-mail: [cep@icb.usp.br](mailto:cep@icb.usp.br)

*Comissão de Ética em Pesquisa*

## CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° **706/14** referente ao projeto intitulado: "*Caracterização do fenótipo mutador de isolados de *Proteus mirabilis**" sob a responsabilidade de **Marina Rocha Borges da Fonseca**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP n°466 de 2012.

São Paulo, 15 de dezembro de 2014.

  
PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA  
Coordenador da CEUA - ICB/USP

  
PROF. DR. PAOLO M.A. ZANOTTO  
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

À Eliza, Juliana e Gerusa, as mulheres que tanto admiro.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Rodrigo da Silva Galhardo, pela orientação, apoio e companheirismo durante o mestrado, serei eternamente grata por todo o aprendizado dos últimos dois anos.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marilis do Valle Marques, pela parceria durante os seminários semanais que enriqueceu o meu trabalho e o trabalho dos meus colegas, além de toda a ajuda no dia-a-dia com aparelhos e experimentos.

Ao Prof. Dr. Carlos Frederico Martins Menck e todos os integrantes de seu laboratório, por sempre contribuírem com os experimentos partilhando materiais e aparelhos.

Ao Prof. Dr. Nilton Lincopan e sua aluna de mestrado Fernanda Esposito, pela colaboração com os experimentos  $\beta$ -lactamases de espectro ampliado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a pesquisa (Processo 2015/11348-3).

Aos professores presentes na minha banca de qualificação, Prof. Dr. Beny Spira, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Regina Lúcia Baldini e Prof. Dr. Marcio Vinicius Bertacine Dias, pela avaliação e novas ideias sobre o meu trabalho.

Aos funcionários do Instituto de Ciências Biomédicas e principalmente do Departamento de Microbiologia pela dedicação diária aos estudantes.

À querida amiga Julia Maria Borges Molina e sua família, por me receberem e serem um porto de segurança na nova cidade.

Aos queridos Frank, Juliana, Letícia, Marco e Raquel, integrantes do laboratório em que desenvolvi meu trabalho, sempre parceiros no dia-a-dia que se tornaram grandes amigos.

Aos amigos do laboratório de Fisiologia e Genética Bacteriana, Alexandre, Julia, Juliana, Larissa, Laura, Naara, Nadine e Rodolfo, por toda a parceria e risos, dentro e fora do laboratório.

Às amigas de toda a vida, Nínits, Ana Bia, Barbara, Bia, Bia, Bia, Carol, Clara, Dedê, Fefê, Karla, Larinha, Lia, Lou, Nara, Nati, Nathi, Paula, Tati e Renatinha, me mostrarem que tudo pode ser superado e que nunca estarei sozinha.

Aos amigos de Fortaleza, João, Pedro, Ricardo, Marcio, Victor e especialmente meu irmão Vitor, por toda a torcida, apoio e parceria antes da mudança.

Aos parceiros de graduação e da vida, Fernanda, Raquel, Tamara, Tuane, Marco, Diego, Gabriela e Nayane, por todos os momentos que me fizeram amar ainda mais a Biologia.

Aos amigos de todo o Brasil, Bruna, Duda, Dani, Julia, Julia, Linda e Patricia por serem a prova de que as mudanças sempre valem a pena quando se faz um novo amigo.

Às amigas, Olivia, Paula e Justine, por me ensinarem que a distância não afeta nada que é verdadeiro.

Aos colegas do Grupo PET-Biologia UFC e nossa Tutora Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Izabel Gallão, por me mostrarem o papel social da Universidade.

À minha família, meus pais Gersusa e Ricardo, Vó Ivanise, Tia Ângela, Tio Ronaldo, Prima Rebeca, primos Pedrinho, José, Igor e Alexandre, pelo suporte contínuo à minha formação.

Ao meu querido Pedro, pelo carinho e dedicação que fizeram o último ano de mestrado ser muito mais feliz.

Finalmente, à minha irmã Juliana, a pessoa mais importante do mundo.



## RESUMO

FONSECA, M. R. B. **Caracterização do fenótipo mutador de isolados de *P. mirabilis***. 2016. 84 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Cepas com altas taxas de mutação (mutadoras) foram detectadas em diversos gêneros bacterianos. O aumento nas taxas de mutação está relacionado a defeitos em sistemas de reparo de DNA. Uma alta incidência de isolados clínicos de *Proteus mirabilis* com frequências de mutação maiores do que o esperado foi descrita em estudos antigos. Além disso, o fenômeno observado foi induzido em *Escherichia coli*, quando transformada com um plasmídeo de *P. mirabilis*. Com coleção de 77 isolados clínicos de *P. mirabilis*, medimos a frequência de mutantes espontâneos e verificamos a presença do elemento móvel conjugativo ICE SXT/R391, para desvendar se existe uma relação entre a presença do ICE e variações na frequência de mutação dessas bactérias. 9 isolados clínicos apresentam o ICE. A frequência de mutantes mostrou que não existem mutadores verdadeiros nos isolados, mas encontramos 11 isolados que apresentam uma alta frequência de mutantes Fos<sup>R</sup>. Considerando o alto índice de infecções hospitalares por *P. mirabilis*, é importante entender o fenômeno de resistência à fosfomicina, já que esta é usada na clínica em infecções urinárias. Vimos que não existe relação entre uma frequência de mutantes espontânea elevada e a presença de ICE SXT/R391 em isolados clínicos de *P. mirabilis*.

**Palavras-chave:** Frequência de mutação. Mutadores. ICE SXT/R391. Fosfomicina. Heteroresistência. Infecções do trato urinário. *Proteus mirabilis*.

## ABSTRACT

FONSECA, M. R. B. **Characterization of the mutator phenotype in isolates of *P. mirabilis***. 2016. 84 p. Master thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Strains with high mutation rates (mutators) were detected in several bacterial genera. The increased mutation rate is related to defects in DNA repair systems. A high incidence of *Proteus mirabilis* clinical isolates with high mutation frequencies were described in older studies. In addition, the phenomenon observed was induced in *Escherichia coli*, when transformed with a plasmid of *P. mirabilis*. In a collection of 77 *P. mirabilis* clinical isolates, we measured the frequency of spontaneous mutants and verified the presence of a conjugative element found in this species, ICEs SXT / R391, to verify if there is a relation between the presence of the ICE and variations in mutation frequencies. 9 isolates carry the ICE SXT/R391. The frequency of mutants analysis showed that there are no true mutators among the isolates tested, however we found 11 isolates that show a high frequency of Fos<sup>R</sup> mutants. Considering the high rate of hospital infections caused by *P. mirabilis*, it is important to understand the phenomenon seen with fosfomicin, because this antibiotic is currently used to treat urinary infections. We have seen that there is no relation between a high spontaneous mutation frequency and the presence of ICE SXT/R391 in clinical isolates of *P. mirabilis*.

**Keywords:** Mutation frequency. Mutators. ICE SXT/R391. Fosfomicin. Heteroresistance. Urinary tract infections. *Proteus mirabilis*.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMP – Ampicilina

ATP – Adenosina trifosfato

BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*

CAZ – Ceftazidima

CIM – Concentração inibitória mínima

CIP – Ciprofloxacina

CLED – (meio) Cistina lactose deficiente em eletrólitos

CLSI – *Clinical & Laboratorial Standards Institute*

CTX – Ceftriaxona

DNA - Ácido desoxirribonucléico

dNTP - Desoxirribonucleotídeos fosfatados

DO<sub>600</sub> - Densidade óptica a 600 nanômetros

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

Fos<sup>R</sup> – Resistência a fosfomicina

GEN – Gentamicina

I – Resistência intermediária ao composto em questão

ICE – Elemento integrativo conjugativo

LB – (meio) Luria-Bertani

M – Molar

MH – (meio) Müller-Hinton

MMR – Reparo por emparelhamento errôneo (*Mismatch repair*)

pb - Pares de bases

PCR – Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase chain reaction*)

R – Resistente ao composto quimioterápico em questão

RIF - Rifampicina

Rif<sup>R</sup> – Resistência a rifampicina

Rnase - Ribonuclease

rpm – Rotações por minuto

S – Sensível ao composto quimioterápico em questão

SDS - Dodecil sulfato de sódio

TAE – (tampão) Tris-Acetato-EDTA

TBE – (tampão) Tris-Borato-EDTA

TE – (tampão) Tris-EDTA

TLS – Síntese translesão (*translesion synthesis*)

TRI – Trimetoprim

UPGMA – *unweighted pair-group method with average linkage*

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Mecanismo MMR .....	18
<b>Figura 2</b> – Esquema da ativação do sistema SOS e ação da polimerase TLS .....	21
<b>Figura 3</b> – Processo de transferência do ICE SXT/R391.....	26
<b>Figura 4</b> – Esquema da organização dos genes do ICE SXT/R391.....	27
<b>Figura 5</b> – Fotos dos experimentos de disco-difusão .....	46
<b>Figura 6</b> – Resultados da contagem de colônias Rif <sup>R</sup> no interior do halo de inibição de rifampicina .....	47
<b>Figura 7</b> - Resultados da contagem de colônias Fos <sup>R</sup> no interior do halo de inibição de fosfomicina .....	49
<b>Figura 8</b> – Relação entre o número de colônias Fos <sup>R</sup> no interior do halo e a área de inibição do antibiótico .....	50
<b>Figura 9</b> – Foto do experimento de disco-difusão - isolado 601 .....	51
<b>Figura 10</b> - Foto do experimento de disco-difusão - isolado 620 .....	52
<b>Figura 11</b> – Frequência de mutantes espontâneos Rif <sup>R</sup> .....	57
<b>Figura 12</b> – Frequência de mutantes espontâneos Fos <sup>R</sup> .....	58
<b>Figura 13</b> – Esquema de genes dos ICEs SXT/R391, evidenciando os pontos onde encontram-se <i>hotspots</i> e zonas de inserção de sequências de DNA .....	61
<b>Figura 14</b> – Fotos dos resultados dos experimentos para detecção de ESBLs .....	64
<b>Figura 15</b> – Resultados de experimentos de sobrevivência à luz UV .....	66
<b>Figura 16</b> – Foto de um gel de agarose dos produtos amplificados das sequências ERIC .....	69
<b>Figura 17</b> – Dendograma ERIC .....	70

**Figura 18** – BLAST ..... ANEXO - A

**Figura 19** – BLAST ..... ANEXO - B

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Lista de linhagens de nossa coleção .....	31
<b>Tabela 2</b> – Iniciadores utilizados durante o estudo .....	38
<b>Tabela 3</b> – Detalhes das reações de PCR para cada par de iniciadores usados .....	40
<b>Tabela 4</b> – Combinações de antibióticos usados para a seleção de transconjugantes ..	42
<b>Tabela 5</b> – Detalhes da reação de PCR para a amplificação de sequências ERIC .....	44
<b>Tabela 6</b> – Valores de CIMs encontrados para todas as linhagens testadas em frequência de mutação .....	53
<b>Tabela 7</b> – Frequência de mutantes Rif <sup>R</sup> .....	54
<b>Tabela 8</b> – Frequência de mutantes Fos <sup>R</sup> .....	55
<b>Tabela 9</b> – Lista dos genes exclusivos de ICEs SXT/R391 encontrados nas linhagens .....	62
<b>Tabela 10</b> – Perfil de resistência das linhagens portadoras de ICE SXT/R391 .....	63

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>1.1 O gênero <i>Proteus</i></b> .....	17
<b>1.2 Mecanismos de reparo de DNA</b> .....	17
1.2.1 MMR - <i>mismatch repair</i> e sistema GO.....	18
1.2.2 Resposta SOS e TLS.....	21
<b>1.3 Detecção de linhagens com fenótipo mutador</b> .....	22
<b>1.4 Fenótipo mutador e heteroresistência</b> .....	23
1.4.1 Fenótipo mutador em <i>P. mirabilis</i> .....	24
<b>1.5 ICEs</b> .....	25
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	30
<b>2.1 Objetivo geral</b> .....	30
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	30
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	31
<b>3.1 Cepas</b> .....	31
<b>3.2 Análise do fenótipo mutador dos isolados</b> .....	34
3.2.1 Teste qualitativo com antibióticos em disco.....	34
3.2.2 Determinação do CIM dos isolados testados.....	35
3.2.3 Medição da frequência de mutantes.....	37
<b>3.3 Teste para a presença do elemento genético móvel tipo ICE</b> .....	38
<b>3.4 Ensaios de conjugação do ICE SXT/R391 para <i>E. coli</i></b> .....	40
3.4.1 Antibiograma das cepas que possuem ICE SXT/R391.....	40
3.4.2 Ensaios de conjugação.....	41
<b>3.5 Experimento de ERIC-PCR</b> .....	43
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	46
<b>4.1 Investigação do fenótipo mutador</b> .....	46
4.1.1 Seleção de candidatos em teste de disco-difusão.....	46
4.1.2 CIM de rifampicina e fosfomicina dos isolados selecionados.....	52
4.1.3 Determinação da frequência de mutantes dos isolados selecionados.....	54
<b>4.2 Estudos com ICEs SXT/R391</b> .....	61
4.2.1 Avaliação da presença de ICEs.....	61
4.2.2 Perfil de resistência das cepas portadoras de ICEs.....	63
4.2.3 Ensaios de conjugação dos ICEs SXT/R391.....	65
<b>4.3 Análise por ERIC-PCR</b> .....	67
4.3.1 Filogenia de linhagens contendo ICEs SXT/R391.....	71
4.3.2 Filogenia dos isolados com altas frequências de mutantes à fosfomicina.....	72
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	73



<b>REFERÊNCIAS</b> .....	74
<b>ANEXOS</b> .....	79
<b>A - BLAST</b> .....	79
<b>B - Miniprep de DNA cromossomal de bactérias gram-negativas</b> .....	84

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 O gênero *Proteus*

O gênero *Proteus* é formado por bactérias gram-negativas móveis, encontradas na água, solo, esgoto e na flora intestinal natural de animais e seres humanos. Dentre os representantes do gênero, a espécie *Proteus mirabilis* é um dos principais agentes causadores de infecções do trato urinário associadas a cateteres (CAUTIs), sendo reportada em 44% dos casos nos Estados Unidos; CAUTIs são o tipo de infecção nosocomial mais comum, chegando a representar 40% do total de infecções hospitalares no mundo, custando milhões de dólares aos sistemas de saúde todos os anos (ARMBRUSTER; MOBLEY, 2012; HOOTON et al., 2010; JACOBSEN et al., 2008; WENNER; RETTGER, 1919).

O gênero *Proteus* é formado por 5 espécies. As duas características mais distintas do grupo são a produção da enzima urease e a mobilidade do tipo *swarming*. Ambos os atributos são essenciais para o processo de infecção urinária característico de cepas de *Proteus*. O *swarming* promove a rápida ascendência da população bacteriana no trato urinário e a ação da enzima urease age cristalizando a uréia e bloqueando as vias do trato urinário (SULLIVAN et al., 2013).

## 1.2 Mecanismos de reparo de DNA

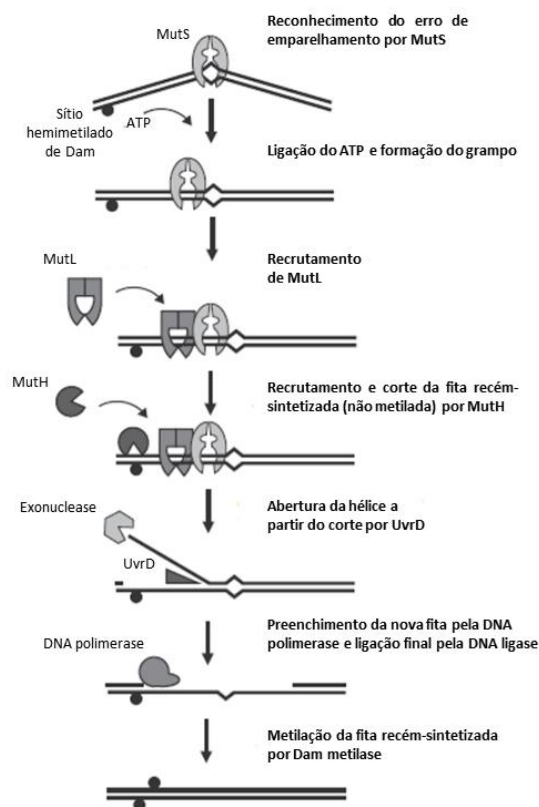
Os tratamentos com antibióticos disponíveis atualmente contra infecções microbianas se mostraram ineficientes nas últimas décadas, devido à propagação horizontal de genes de resistência, e à seleção de mutantes que ocorrem naturalmente, pela pressão evolutiva das condições de estresse causada por estes quimioterápicos (BLÁZQUEZ et al., 2012; DAVIES; DAVIES, 2010).

Para cada antibiótico, existem diferentes modificações moleculares para que uma cepa adquira resistência, fazendo com que a frequência de surgimento de mutantes seja diferente para cada droga. No entanto, existem cepas que apresentam atributos genéticos que se manifestam em um fenótipo de frequência de mutação elevada em relação ao encontrado para outros membros da mesma espécie bacteriana quando

submetidos às mesmas condições. Este fenótipo é denominado de fenótipo mutador (DENAMUR; MATIC, 2006).

### 1.2.1 MMR - *mismatch repair* e sistema GO

A maioria das cepas classificadas como mutadoras apresentam defeitos em genes que codificam enzimas que corrigem erros de emparelhamento do DNA. Esses erros surgem espontaneamente durante a replicação de DNA, e sem o reparo necessário para a correção destes, a célula se apresenta com uma taxa de mutação aumentada. Como exemplo, temos os genes que controlam o sistema de reparo de emparelhamento errôneo (MMR – *mismatch repair*), apresentado na Figura 1, onde um dos genes do sistema (*mutS*, *mutH*, *mutL*, *uvrD* e *dam*) pode apresentar alterações em linhagens mutadoras (LECLERC et al., 1996; LI et al., 2003; MATIC et al., 1997).



**Figura 1** – Esquema de funcionamento do MMR metil-direcionado em *E. coli*. Círculo preto indica a presença de uma adenosina metilada (sítio GATC). Figura modificada do artigo de Putnam, 2016.

Cepas sem o sistema MMR funcional apresentam uma taxa de mutação de 100 a 200 vezes maior do que a taxa esperada para a espécie em estudo, e em qualquer marcador de mutagênese testado, pois os erros que eventualmente se tornam mutações podem se encontrar em qualquer ponto do cromossomo bacteriano (LI et al., 2003; PUTNAM, 2016; TURRIENTES et al., 2013).

Como o MMR, o sistema de reparo dos danos causados pela formação do produto de oxidação da base nitrogenada guanina, a 8-oxo-guanina também contribui para a integridade do DNA e estabilidade do genoma, e uma vez que quando este não se encontra funcional em uma célula, acarreta em uma elevação da taxa de mutação (FRIEDBERG; WALKER; SIEDE, 1995; FUKUI, 2010; JOLIVET-GOUGEON et al., 2011; MICHAELS; MILLER, 1992). Os genes componentes nesse sistema codificam as DNA glicosilases MutM e MutY, além de MutT, uma enzima envolvida em remover 8-oxo-guanina do pool de dNTPs (desoxirribonucleotídeos fosfatados) da célula. No entanto, os relatos de isolados mutadores com defeitos no sistema GO são raros, sendo as linhagens mutadoras mais frequentemente associadas a defeitos em MMR (MANDSBERG et al., 2009; MICHAELS; MILLER, 1992).

Dentre as espécies de enterobactérias mais estudadas, *Escherichia coli* e *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, quando analisadas em relação à frequência de mutação, apresentam o surgimento de cepas mutadoras em suas populações com uma frequência de  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$  em condições de laboratório (LECLERC et al., 1996; MAO et al., 1997). Entretanto, estes números não condizem com o observado em coleções de linhagens naturais ou obtido em ambientes hospitalares de pacientes infectados, onde se observa que 1 a 5% dos isolados exibem fenótipo mutador. A maior ocorrência de cepas mutadoras em linhagens patogênicas, como já dito anteriormente, deve ocorrer por pressão das condições onde esta se encontra, como a ação de antibióticos. Em condições ambientais, tanto a exposição a concentrações sub-inibitórias de antibióticos (usados na agropecuária, por exemplo) quanto outras questões físicas do ambiente podem contribuir com as diferentes taxas de mutação encontradas nos micro-organismos que colonizam esses locais (LECLERC et al., 1996).

Apesar de uma alta taxa de mutagênese possibilitar uma maior sobrevivência durante o tratamento com quimioterápicos, a virulência de uma cepa não é necessariamente aumentada devido ao fenótipo mutador (DENAMUR et al., 2002;

PICARD et al., 2001).

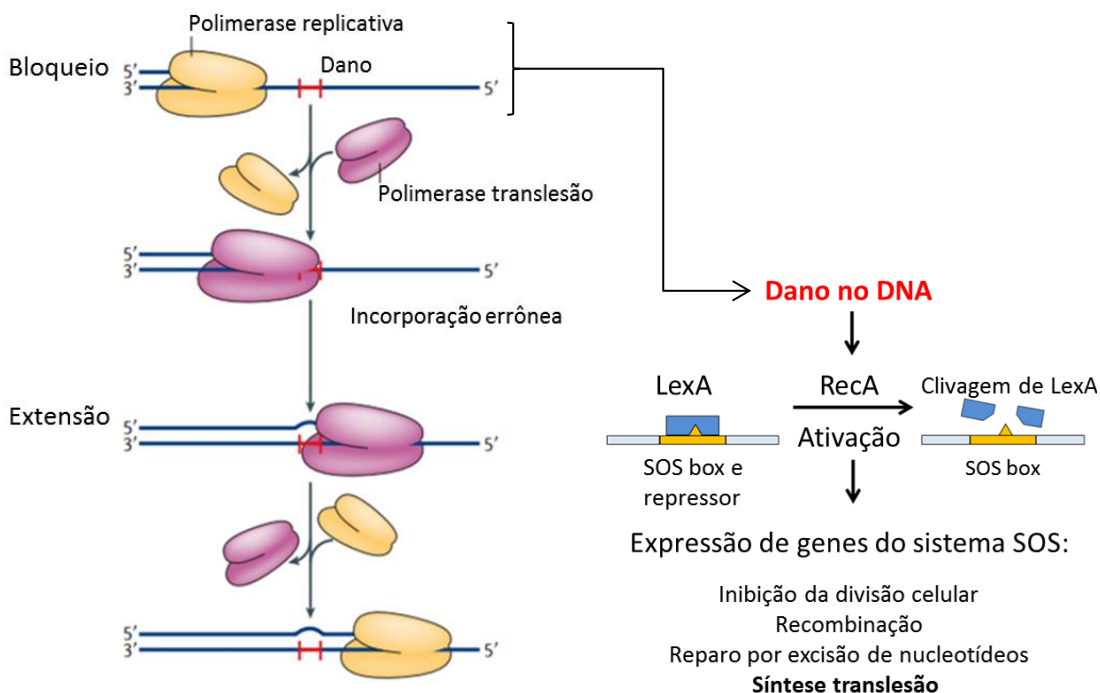
Tratamentos com antibióticos podem selecionar bactérias com fenótipo mutador mesmo que estas se encontrem em baixos números em populações bacterianas selvagens. Quando há pressão seletiva do antibiótico para resistência, um alelo mutador, que gere deficiência no sistema MMR, pode ser juntamente selecionado (*hitchhiking*), podendo então levar à modificações em outros sistemas, como o de enzimas de detoxificação, aumentando o espectro de resistência de uma população bacteriana durante o tratamento contra a infecção (GIRAUD et al., 2002). Em caso de falha do tratamento terapêutico escolhido no estágio inicial da infecção, testes para a detecção de mutadores podem ser importantes para a continuação do tratamento, e talvez a melhor escolha venha a ser uma terapia com antibióticos combinados, minimizando os riscos de seleção de mutadores (TENAILLON et al., 1999).

Bactérias com fenótipos hiper-mutadores e hiper-recombinates, após o processo de adaptação às condições do meio, podem chegar a restaurar sistemas modificados que causam o aumento da frequência de mutação, modulando a velocidade de evolução bacteriana com uma fase transitória de um fenótipo mutador, evitando a geração de mutações neutras ou deletérias e evitando gastos maiores de energia quando em ambiente estável. Geralmente isso ocorre através de transferência lateral de DNA, onde uma bactéria pode adquirir genes funcionais do MMR. Durante a resposta SOS, que será discutida a seguir, existe uma ativação de genes responsáveis por sistemas de recombinação homóloga, o que pode eventualmente contribuir para que a bactéria adquira diversos genes funcionais que possam estar danificados, já que a resposta SOS é ativada em casos de dano no DNA onde seja reconhecido DNA de fita simples (JOLIVET-GOUGEON et al., 2011).

Apesar das vantagens adaptativas, altas frequências de mutação podem interferir no *fitness* do microrganismo, onde a taxa de crescimento de uma linhagem bacteriana pode ser menor do que o esperado para a espécie e atrapalhar a evolução da infecção; Como é o caso de infecções urinárias, onde a taxa de crescimento é um fator importante para que a bactéria estabeleça a infecção no organismo do hospedeiro ao alcançar órgãos como a bexiga ou os rins (NILSSON et al., 2003).

### 1.2.2 Resposta SOS e TLS

Mesmo com os sistemas de reparo mediados por proteínas que atuam especificamente no dano, estes podem persistir no DNA até que a replicação seja iniciada. Quando isso acontece, a célula precisa de um mecanismo de emergência que atue rapidamente, impedindo o bloqueio da forquilha de replicação, já que em alguns casos a DNA polimerase replicativa III não consegue agir adicionando um nucleotídeo em frente a trechos de DNA onde se encontra uma lesão. Nesse caso, o bloqueio da forquilha de replicação leva a formação de DNA fita simples, que é ligado pela RecA (recombinase A), esta ativação de RecA, por sua vez, promove a autólise do repressor LexA, liberando a expressão do conjunto de genes que formam o sistema SOS (Figura 2). As ações promovidas pelo sistema SOS na célula incluem a inibição da divisão celular (evitando que o cromossomo ainda não completamente duplicado seja fragmentado de maneira irregular inviabilizando a sobrevivência das células filhas), indução da recombinação, indução do sistema de reparo por excisão de nucleotídeos, indução da expressão de polimerases da família Y, a mais importante destas é a polimerase V, codificada pelos genes *umuDC*. Estas são capazes de ultrapassar as lesões que bloqueiam a forquilha de replicação (TLS) e apresentam uma baixa fidelidade de adição de nucleotídeos (Figura 2) (KREUZER, 2013; SEDGWICK; HO; WOODGATE, 1991).



**Figura 2** – Esquema da ativação do sistema SOS pelo bloqueio da forquilha de replicação do DNA. Quando a forquilha de replicação é bloqueada por um dano na estrutura do DNA, a proteína RecA se liga à fita simples de DNA, e a proteína LexA, repressora do conjunto de genes da resposta SOS, passa por um processo de autoclivagem. Uma vez que o repressor LexA não se encontra mais no SOS box, a expressão dos genes do sistema SOS é iniciada. Figura adaptada do artigo de Sale, Lehmann & Woodgate, 2012.

### 1.3 Detecção de linhagens com fenótipo mutador

Atualmente, a análise de fenótipo mutador é feita com experimentos onde se mede o surgimento de células mutantes resistentes a antibióticos. A rifampicina é um dos antibióticos mais usados como marcador de mutagenese, sendo empregada para diversas espécies de bactérias. O gene *rpoB* codifica a subunidade  $\beta$  da RNA polimerase (alvo da rifampicina), sendo altamente conservado em bactérias. Neste, apenas três pequenas regiões aceitam variação de nucleotídeos sem interferir na atividade da proteína durante a transcrição, porém conferindo resistência à rifampicina. Desta forma, com apenas um par de primers para uma dessas regiões, 88% dos pontos onde as mutações possam ter ocorrido podem ser amplificados para sequenciamento, que permite detecção das mutações que causam resistência a este antibiótico (GARIBYAN et al., 2003). Além disso, mutantes deficientes em MMR, ou em outras vias de reparo de DNA, apresentam espectros de mutação espontânea característicos ao longo do gene *rpoB*, possibilitando assim obter evidências quanto ao defeito de reparo de DNA presente na linhagem em análise (GARIBYAN et al., 2003).

Outro antibiótico comumente empregado em trabalhos de investigação sobre mutagenese é a fosfomicina (ELLINGTON et al., 2006; NILSSON et al., 2003). A fosfomicina age na síntese de parede celular, interferindo especificamente na fase de produção de ácido N-acetilmurâmico pela enzima UDP-N-acetilglicosamina-3-enolpiruvil transferase, codificada pelo gene *murA*. A resistência a esse antibiótico pode ser conferida por plasmídeos contendo uma enzima que degrada a fosfomicina (metaloglutationa transferase) (ARCA; HARDISSON; SUÁREZ, 1990). Entretanto, estudos em *E. coli* mostram que são mais comuns as alterações em genes cromossômicos, que impedem a entrada do antibiótico no meio intracelular, através de mutações de troca de base, deleções ou inserções nos genes responsáveis pelos transportadores GlpT e UhpT, que transportam glicerol-3-fosfato e hexoses respectivamente (MICHALOPOULOS; LIVADITIS; GOUGOUTAS, 2011). Estudos

em outras bactérias mostraram que os genes citados em *E. coli*, podem não estar envolvidos no transporte de fosfomicina em outras bactérias, por exemplo, em *Pseudomonas aeruginosa*, apenas modificações no gene *glpT* conferem resistência à Fosfomicina (CASTAÑEDA-GARCÍA et al., 2009). O sistema de resistência conferida por plasmídeos é raro e foi descrito em apenas alguns grupos de bactérias. Já em *P. mirabilis* não existem estudos que descrevam os mecanismos de resistência à fosfomicina.

Com o declínio de sucesso em tratamentos com antibióticos, a clínica voltou a prescrever antibióticos que já haviam entrado em desuso, como a fosfomicina. Nos últimos anos, esse antibiótico voltou a ser usado no tratamento de infecções urinárias por administração oral, e em infecções nosocomiais por administração intravenosa. Por ser um antibiótico com poucos efeitos colaterais aos pacientes, que poderia ser usado em conjunto com outros antibióticos, cientistas mostraram que este seria uma boa alternativa no tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli* e *Enterococcus faecalis* multirresistentes (FALAGAS et al., 2010; KARAGEORGOPOULOS et al., 2012; MICHALOPOULOS; LIVADITIS; GOUGOUTAS, 2011).

É importante ressaltar as diferenças na natureza das mutações de resistência aos dois antibióticos citados, onde a resistência à rifampicina é conferida apenas por troca de bases em regiões específicas de um gene essencial que não pode sofrer inativação. Já na aquisição de resistência à fosfomicina, genes que codificam transportadores podem ser inativados por inserções, deleções, ou trocas de bases, sendo as mutações que conferem resistência à fosfomicina mais frequentes que mutações que podem conferir resistência à rifampicina.

#### **1.4 Fenótipo mutador e heteroresistência**

Além dos mecanismos já descritos, diferenças na resistência a antibióticos dentro de uma mesma população também podem ser observadas em cepas com sistemas de reparo aparentemente eficientes, por um fenômeno denominado de heteroresistência. A definição de heteroresistência é variada na literatura. Em uma revisão de 2015, definiu-se como heteroresistente, uma cepa que apresenta subpopulações com perfis diferentes de concentração inibitória mínima CIM a um antibiótico, onde o valor dessa



concentração não pode ser definido, mas um intervalo de concentrações. A identificação de uma cepa heteroresistente é bastante importante para a escolha de terapias com antibióticos, já que uma cepa heteroresistente pode não ser completamente susceptível ao tratamento escolhido (EL-HALFAWY; VALVANO, 2015).

Heteroresistência já foi descrita em diversos gêneros bacterianos em pesquisas com diversas drogas, e até mesmo em espécies de fungos. Esse fenômeno é observado em uma frequência de  $10^{-7}$  a  $10^{-3}$  em cepas de diversas espécies bacterianas, e ainda não se conhece o mecanismo molecular que explica esta observação (BEN-AMI et al., 2016; EL-HALFAWY; VALVANO, 2015; ENGEL et al., 2013).

#### 1.4.1 Fenótipo mutador em *P. mirabilis*

Um estudo brasileiro do final do século XX descreveu eventos de instabilidade de certos fenótipos em isolados clínicos multirresistentes de *P. mirabilis*. Inicialmente, em 1978, observou-se que cepas recém-isoladas de pacientes poderiam apresentar variações na atividade proteásica em placas de ágar contendo gelatina, apresentando dois caracteres: um estável, onde todos os indivíduos excretavam a enzima gelatinase, que se apresenta pela observação de um halo referente à degradação de gelatina ao redor de colônias, e um caráter instável, onde parte dos indivíduos da população observada não apresentavam halo que evidencia ação da gelatinase. Os fenótipos foram caracterizados como  $P^+$  quando as colônias excretam protease e  $P^-$  quando não excretam protease. A diversidade da frequência de cepas  $P^+$  e  $P^-$  não se repetiu em outras espécies, como observado pelo mesmo pesquisador com *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*. (COSTA, 1978).

Costa também observou o mesmo tipo de instabilidade em mutações que causam auxotrofia, mas não em outras atividades metabólicas de *P. mirabilis* (1978). Metade dos isolados clínicos com multirresistência a antibióticos apresentava fenótipo mutador medido pela elevação na frequência de auxotróficos, incidência bem maior que a reportada posteriormente por LeClerc e Mao em 1996 e 1997 para *E. coli* e *S. typhimurium*. Essa alta frequência de auxotrofia não podia ser explicada pelas taxas normais de mutação (COSTA, 1978; KIMURA; OHTA, 1973).

Nenhuma relação entre as duas variações de estabilidade dos fenótipos, de

excreção de protease e auxotrofia, foi encontrada, e o possível envolvimento de um vírus ou transposon foram hipóteses afastadas (COSTA, 1978).

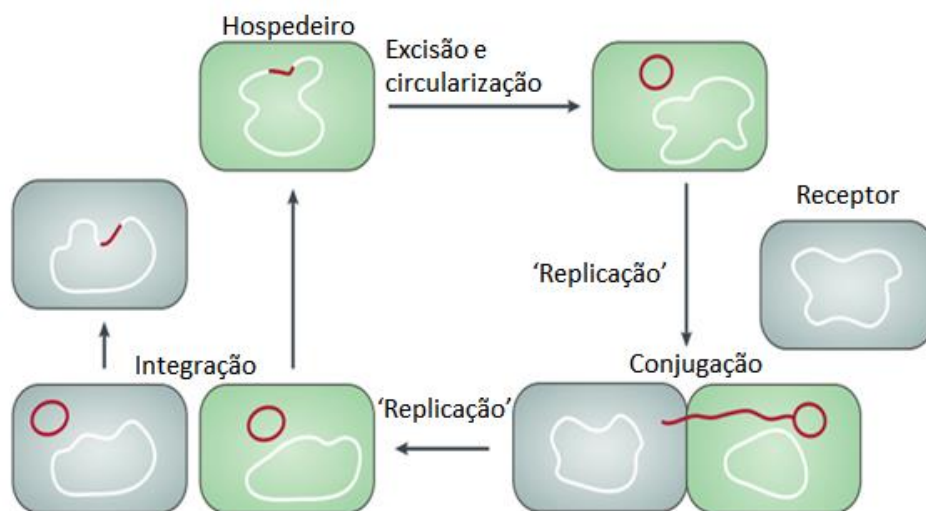
Em 1994, ao obter conjugantes de uma cepa de *E. coli* geneticamente estável e prototrófica portando o elemento genético móvel que conferia a resistência a antibióticos dos isolados de *P. mirabilis* estudados, os pesquisadores observaram que a cepa de *E. coli* adquiriu instabilidade genética bastante similar à exibida pela cepa parental de *P. mirabilis*, com alta incidência de mutantes auxotróficos (NEWTON; COSTA, 1994). De maneira intrigante, estes autores não foram capazes de detectar DNA plasmidial em todos os isolados instáveis de *P. mirabilis*.

Tal fenômeno, de grande interesse dos pontos de vista clínico e básico, não foi estudado posteriormente, e permaneceram inexplorados até hoje. Acreditamos que novos experimentos aliados ao atual estado da arte do conhecimento sobre os mecanismos de reparo de DNA e mutagênese, podem trazer importantes contribuições para o entendimento deste fenômeno.

### 1.5 ICEs

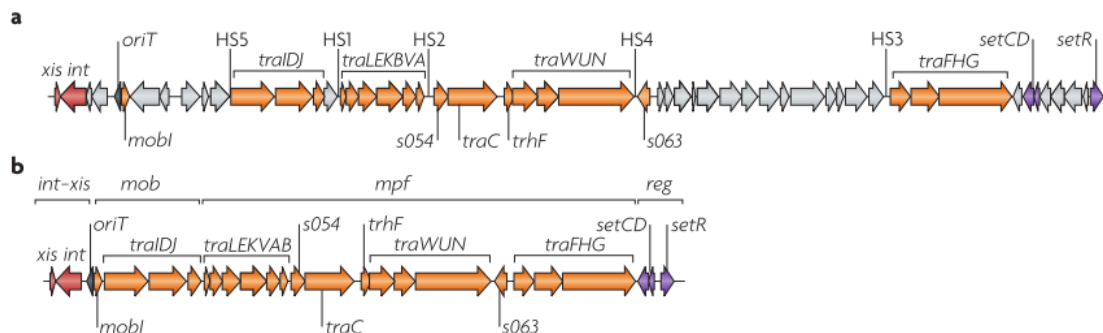
Considerando a possibilidade de transferência de um fenótipo mutador em *P. mirabilis*, analisamos os possíveis elementos genéticos que explicassem os fenômenos observados. O grupo gammaproteobacteria pode carregar elementos conjugativos integrativos (ICE - *Integrative conjugating elements*), que foram descritos e vêm sendo alvo de diversos estudos sobre a propagação de genes de resistência à antibióticos. O ICE SXT foi o primeiro descrito para esse grupo, em 1993 na cepa O139 de *Vibrio cholera*, conferindo à esta resistência à sulfametoxazol, trimetoprim e estreptomicina. Outra família de elementos genéticos móveis importante é a R391, que foi descrita nos anos 70 em *Providencia rettgeri*, com uma marca de resistência à kanamicina. Após estudos mais completos, foi concluído que os elementos genéticos SXT, R391 e IncJ apresentavam uma relação importante entre si, por seus “*core genes*” e por se integrarem no mesmo ponto específico do cromossomo do hospedeiro, e por possuírem a mesma proteína que promove a integração do elemento no ponto 5’ terminal do gene *prfC* (fator 3 de liberação da cadeia de peptídeos – RF3). Atualmente as famílias foram agrupadas e são chamadas de ICEs SXT/R391 (CARRARO; BURRUS, 2014; WOZNIAK; WALDOR, 2010).

ICEs são elementos genéticos móveis que se comportam temporariamente como plasmídeos, formando estruturas de DNA circular, e são transferidos por conjugação para células presentes no mesmo meio. A diferença para os plasmídeos está na capacidade dos ICEs de se integrar em pontos do DNA cromossômico e se manter estável durante a replicação do mesmo. Os ICEs podem então se excisar do cromossomo hospedeiro, iniciando o processo de transferência por conjugação, como mostrado na Figura 3 (WOZNIAK; WALDOR, 2010; WOZNIAK et al., 2009).



**Figura 3** – Processo de transferência por conjugação de ICEs, realizado completamente por genes presentes na estrutura do próprio elemento genético. Imagem adaptada do artigo de Waldor e Wozniak (2010).

ICEs apresentam um conjunto de genes altamente conservados que regulam os processos de excisão, conjugação e integração cromossômica, e também apresentam genes que foram eventualmente transportados, dependendo do local de onde o elemento foi excisado do cromossomo (WOZNIAK; WALDOR, 2010). No entanto, mesmo os genes altamente conservados na estrutura dos ICEs podem ser dispensáveis, já que nem todos agem nos processos de transferência e integração, sendo apenas 25 dos 52 genes conservados no esqueleto de ICEs da família SXT/R391 responsáveis por estes processos de transferência, como é mostrado na Figura 4 (WOZNIAK et al., 2009).



**Figura 4** – Imagem retirada do artigo de Waldor e Wozniak (2010). A – Esquema do esqueleto de ICEs da família SXT/R391, os genes em cor laranja são genes relacionados a conjugação, os genes em vermelho são responsáveis pelos processos de excisão e integração; os genes em cor violeta são genes envolvidos na regulação da expressão dos genes do ICE; os genes em cor cinza tem função acessória ou desconhecida. B – O conjunto mínimo de genes necessários para o funcionamento do ICE.

A regulação dos ICEs SXT/R391 é mediada por danos no DNA. Estudos mostraram que a resposta SOS promove a autoproteólise de SetR, através da ativação de RecA. Assim, termina a repressão de SetR sobre os genes *setCD*; SetC e SetD quando expressas regulam positivamente a expressão de genes que regulam os eventos de excisão, conjugação e integração do ICE (BEABER; HOCHHUT; WALDOR, 2004; POULIN-LAPRADE; BURRUS, 2015; WOZNIAK; WALDOR, 2010).

ICEs são responsáveis pela transmissão de fenótipos de resistência à antibióticos, resistência à metais pesados, determinantes de virulência, capacidade de degradação de grupos aromáticos e até capacidade de fixação de nitrogênio. Essas características são provenientes de grupos de genes que se inserem em pontos específicos do ICE, chamados de *hotspots* (5) e zonas de inserção (4). Um dos 9 pontos está localizado em um gene de interesse de nosso estudo, o gene *rumB* (WOZNIAK et al., 2009).

A família de ICEs SXT/R391 é encontrada em isolados naturais de  $\gamma$ -proteobactérias e apresenta alta prevalência (30 a 40%) em isolados clínicos de *P. mirabilis* com perfil de resistência adquirida para  $\beta$ -lactâmicos incluindo cefalosporinas e cefamicinas de terceira gerações, segundo um estudo com amostras de um hospital na Espanha (MATA et al., 2011). Outro estudo mais recente relatou a presença desses ICEs em isolados de *P. mirabilis* provenientes de amostras de fezes de gaivotas no sul da França, onde cerca de 40% das aves apresentavam em suas fezes cepas com gene de

resistência  $\text{bla}_{\text{CMY-2}}$  em decorrência da presença de ICEs nesses isolados. Esse mesmo estudo encontrou relações genéticas entre 6 isolados de *P. mirabilis* de fezes das aves com dois isolados clínicos de hospitais da mesma região (ABERKANE et al., 2015).

Além das características já descritas, muitos desses ICEs carregam genes relacionados à replicação e ao reparo de DNA, como os genes que codificam uma DNA polimerase envolvida na resposta SOS, denominados *rumBA*. Tais genes são homólogos dos genes *umuDC* de *E. coli*, já bem caracterizados funcionalmente (KULAEVA et al., 1995; MEAD et al., 2007; SEDGWICK; HO; WOODGATE, 1991). Essa polimerase faz parte da família Y de polimerases, e é muito propensa a erros por sua habilidade de dar continuidade a replicação mesmo quando existem lesões no DNA, uma vez que a forquilha de replicação é bloqueada com uma polimerase replicativa, permitindo diversificação genética (BEABER; HOCHHUT; WALDOR, 2004; MEAD et al., 2007). A presença de DNA polimerases propensas a erros na célula procariótica faz com que estas compitam com a DNA polimerase III pela forquilha de replicação e tolerem danos do DNA que seriam bloqueios para as polimerases replicativas (GOODMAN; WOODGATE, 2014). Tais polimerases propensa a erros, quando atuando sobre DNA sem lesão, exibem taxas de erro 100 vezes mais altas do que as polimerases replicativa (JAROSZ et al., 2007).

Em um estudo de 2007, foi mostrado que a polimerase da família Y codificada pelo gene *rumAB*, proveniente do ICE R391, tem uma maior capacidade de promover mutagênese por meio do sistema SOS do que polimerases dessa mesma família mas codificadas por outros genes, como os genes *mucAB* e *umuDC*, tanto em experimentos que medem a taxa de mutação espontânea, naqueles que medem como a taxa de mutação induzida (MEAD et al., 2007).

Intrigantemente, a presença de ICEs SXT/R391 causa uma sensibilização da célula exposta à luz ultra-violeta (UV). Um estudo mostrou que uma *E. coli* portadora de ICE R391, ao ser irradiada com luz UV, sofria de citotoxicidade causada por uma proteína (codificada pela orf 43) que é expressa nessa condição, e que aparentemente age lisando a membrana celular da bactéria, promovendo uma liberação do ICE em sua forma circular, o que para os pesquisadores do estudo em questão poderia representar a natureza egoísta dos elementos genéticos móveis, onde esse destruiria a célula hospedeira fragilizada para ser liberado no meio podendo eventualmente transformar

outras células (ARMSHAW; PEMBROKE, 2015; RYAN; ARMSHAW; PEMBROKE, 2016).

Buscamos correlacionar a presença de genes da resposta SOS como o *rumAB* além de outros genes relacionados à replicação de DNA que se encontram nos esqueletos de ICEs com o possível aumento da taxa de mutação e um fenótipo mutador transmissível em *P. mirabilis*.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

Investigar a incidência do fenótipo mutador em isolados clínicos de *P. mirabilis* recentes, e observar se há relação entre este fenótipo e a prevalência de ICEs da família SXT/R391 em isolados clínicos do Brasil.

### **2.2 Objetivos específicos**

- 1) Utilizando uma coleção de *P. mirabilis*, de 77 isolados clínicos, procuramos determinar a incidência de fenótipo mutador, através da análise da frequência de células mutantes resistentes à rifampicina e fosfomicina em culturas de cada um desses isolados;
  
- 2) Determinar a prevalência de ICEs da família SXT/R391 nos isolados de nossa coleção, comparando os números com a prevalência desses elementos encontradas em estudos de outros países.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Cepas

Os isolados clínicos de *Proteus mirabilis* utilizados no presente trabalho são provenientes de amostras de sangue (6 isolados), urina (44 isolados), pregas cutâneas, escarra, aspiragem traqueal, entre outros. Os isolados foram obtidos em diferentes laboratórios de análises clínicas e hospitais do estado de São Paulo e da cidade de Maringá no Paraná, totalizando de 77 isolados clínicos.

Contamos também com a cepa ATCC 25933 (CEFAR - *Proteus mirabilis* CCD – P001 Código: 235.001) procedente de vagina humana e a cepa HI4320 procedente de infecção urinária, isolada em Michigan nos Estados Unidos, que apresenta genoma sequenciado onde foi verificada a presença de ICE da família SXT/R391 (PEARSON et al., 2008). Estas duas cepas serviram como referência durante os experimentos.

A lista completa de identificação dos isolados e de cepas usadas como referência, é encontrada na Tabela 1 a seguir.

**Tabela 1** – Lista de isolados clínicos que constam em nossa coleção, indicando o material de origem onde a bactéria foi isolada e o local onde foi feito o processo.

Identificação	Material de origem	Local de origem
HI4320	Urina	EUA - Pearson <i>et. al</i> , 2008
ATCC 25933	Vagina	EUA - ATCC®
11	Urina	Maringá – PR
12	Urina	Maringá – PR
14	Sonda urinária	Maringá – PR
15	Sonda urinária	Maringá – PR
16	Fragmento de debridamento	Maringá – PR
19	Urina	Maringá – PR
21	Urina	Maringá – PR
22	Urina	Maringá – PR
23	Sonda urinária	Maringá – PR



24	Sonda urinária	Maringá – PR
26	Sonda urinária	Maringá – PR
27	Aspirado Traqueal	Maringá – PR
28	Aspirado Traqueal	Maringá – PR
29	Urina	Maringá – PR
30	Sonda urinária	Maringá – PR
32	Sonda urinária	Maringá – PR
33	Secreção ocular	Maringá – PR
34	Sonda urinária	Maringá – PR
35	Sonda urinária	Maringá – PR
36	Urina	Maringá – PR
37	Urina	Maringá – PR
38	Urina	Maringá – PR
39	Sonda urinária	Maringá – PR
41	Aspirado traqueal	Maringá – PR
42	Aspirado traqueal	Maringá – PR
43	Líquido intra-abdominal	Maringá – PR
44	Urina	Maringá – PR
47	Aspirado traqueal	Maringá – PR
48	Urina	Maringá – PR
49	Secreção abscesso	Maringá – PR
51	Urina	Maringá – PR
52	Urina	Maringá – PR
53	Urina	Maringá – PR
57	Urina	Maringá – PR
547	Urina	São Paulo – SP
548	Sonda urinária	São Paulo – SP
549	Urina	São Paulo – SP
569	Sangue	H.U. USP
570	Prega cutânea	H.U. USP
571	Sangue	H.U. USP
572	Sonda urinária	H.U. USP
573	Sonda traqueal	H.U. USP

574	Prega cutânea	H.U. USP
575	Sangue	H.U. USP
576	Prega cutânea	H.U. USP
577	Sonda urinária	H.U. USP
578	Sonda urinária	H.U. USP
591	Urina	CEAC-SUL SP
592	Urina	CEAC-SUL SP
593	Urina	CEAC-SUL SP
594	Urina	CEAC-SUL SP
595	Urina	CEAC-SUL SP
596	Urina	CEAC-SUL SP
597	Urina	CEAC-SUL SP
598	Escarra	CEAC-SUL SP
599	Escarra	CEAC-SUL SP
600	Raspagem tendão	CEAC-SUL SP
601	Sonda traqueal	CEAC-SUL SP
602	Sonda traqueal	CEAC-SUL SP
603	Escarra	CEAC-SUL SP
604	Escarra	CEAC-SUL SP
605	Trocater	CEAC-SUL SP
606	Sangue	CEAC-SUL SP
607	Urina	CEAC-SUL SP
612	Urina	São Paulo – SP
613	Urina	São Paulo – SP
614	Urina	São Paulo – SP
615	Urina	São Paulo – SP
616	Urina	São Paulo – SP
617	Urina	São Paulo – SP
618	Urina	São Paulo – SP
619	Urina	São Paulo – SP
620	Urina	São Paulo – SP
621	Sangue	São Paulo – SP
622	Sangue	São Paulo – SP

### 3.2 Análise do fenótipo mutador dos isolados

Para análise do fenótipo mutador dos isolados de *P. mirabilis*, caracterizamos as frequências de mutação usando duas metodologias distintas, um ensaio para a seleção primária e qualitativa de supostos mutadores, e um experimento posterior para a análise quantitativa para confirmação do fenótipo. Para todas as linhagens selecionadas, as frequências de mutantes foram comparadas com as frequências da cepa ATCC 25933 (controle) e com a cepa HI4320, portadora de ICE da família SXT/R391.

#### 3.2.1 Teste qualitativo com antibióticos em disco

Os isolados foram submetidos a testes para determinação do número de colônias satélite (variantes resistentes) no interior do halo de inibição de discos contendo antibióticos (DENAMUR et al., 2002; ELLINGTON et al., 2006). No entanto foi necessário padronizar o ensaio com o meio que seria usado no experimento, já que o *swarming* realizado pela bactéria poderia interferir no resultado.

Em ágar Müller-Hinton (MH), o meio de ágar indicado pelo CLSI para ensaios de disco-difusão, verificou-se que não era possível visualizar a formação das colônias satélite, pois o véu formado naturalmente pelas bactérias do gênero *Proteus* cobria a parte mais externa do halo. O mesmo acontecia com ágar Luria-Bertani (LB). Testamos então a comparação entre os dois meios sólidos que inibem completamente o *swarming* do gênero *Proteus*, CLED (*Cystine lactose electrolyte deficient*) e MacConkey. Foi feita a semeadura a partir do mesmo inóculo em ambos os meios inibidores de motilidade com auxílio de *swabs* estéreis, e discos de rifampicina e fosfomicina em concentrações de 30 e 200 respectivamente, colocados nas placas. Verificamos que a formação de colônias satélite no interior do halo era diferente nos dois meios, apesar da variação entre cepas ser parecida. Acreditamos que o mecanismo de inibição de *swarming* poderia estar interferindo, no caso do CLED a deficiência de eletrólitos é responsável pelo fenômeno e no ágar MacConkey a presença de sais biliares (em baixa concentração). Após os testes, decidimos utilizar o ágar MacConkey nos experimentos

de disco-difusão e também nos experimentos posteriores de determinação da frequência de mutantes.

Durante a padronização, vimos que a contagem de colônias variava bastante entre os dias de experimentos e foi decidido que a contagem deveria ser realizada com réplicas de cada cepa inoculadas a partir de colônias isoladas em um único dia, para cada antibiótico a ser testado, evitando que pequenas mudanças na temperatura da estufa ou da concentração de sais da água utilizada no experimento, entre outras variantes, pudessem interferir ainda mais nos resultados.

Para o experimento, 5 réplicas dos 77 isolados clínicos e da cepa ATCC foram feitas para os discos de Fosfomicina e 3 réplicas das mesmas cepas para os discos de Rifampicina. No momento de realização deste experimento ainda não contávamos com a cepa HI4320. Os inóculos foram crescidos até a saturação (18 a 20 horas) em meio líquido LB, e então submetidos aos ensaios de disco-difusão, sendo semeados 50  $\mu$ L dos inóculos na placa de ágar MacConkey e espalhados com *swab* estéril já embebido em LB líquido, para que o inóculo não fosse absorvido pelo algodão, modificando a quantidade de células semeadas. Esse procedimento foi adotado por ser inviável padronizar os inóculos (390 para fosfomicina e 234 para rifampicina) em um único dia de semeadura. As placas foram colocadas em estufa 37 °C por 18 horas.

Os resultados foram comparados sempre com o controle, a cepa ATCC 25933. Há uma variação esperada no diâmetro do halo de inibição, que varia de acordo com o CIM de cada isolado, mas apenas 1 isolado se mostrou resistente à rifampicina e nenhum à fosfomicina.

Para cada isolado, foi contado o número de colônias satélite no interior do halo de inibição e medido o diâmetro do halo, e a mediana resultante dos dados de colônias/cm<sup>2</sup> de halo foram usadas para a organização de gráficos que evidenciaram os isolados com números acima da mediana dos resultados de toda a coleção.

### 3.2.2 Determinação do CIM dos isolados testados

Uma vez que os isolados candidatos foram definidos, a continuação dos experimentos exigia que a concentração inibitória mínima dos antibióticos fosse medida, pois resultados de frequência de mutantes estariam equivocados caso os

experimentos quantitativos fossem feitos com concentrações não completamente inibitórias para cada isolado.

Experimentos para a definição da CIM foram realizados nos isolados selecionados para Rifampicina e Fosfomicina de acordo com o manual “M100-S25: *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-fifth Informational Supplement*” desenvolvido pelo CLSI (*Clinical & Laboratory Standards and Institute*). Para rifampicina, o manual determina que a CIM pode ser medida por diluição (macro ou micro-diluição) em caldo MH. Foram preparadas placas de 96 poços para realizar o procedimento por micro-diluição do antibiótico, as concentrações testadas em  $\mu\text{g/mL}$  foram: 1,56 – 3,125 – 6,25 – 12,5 – 25 – 50 – 100 – 200. Cada poço foi inoculado com uma suspensão de células ajustada para 0,5 McFarland, com 4 réplicas por isolado. Os controles usados foram feitos na mesma placa de 96 poços com meio sem inóculo, para verificar a esterilidade do caldo, e um controle positivo em meio com inóculo, ambos sem antibiótico. As placas de 96 poços foram cultivadas em estufa a 37 °C por aproximadamente 18 horas, e os resultados documentados pela observação de turbidez dos poços que evidenciasse o crescimento das cepas.

Para fosfomicina, o manual do CLSI indica que o CIM seja testado com diluição do antibiótico em ágar, pois o teste em caldo é prejudicado pela alta frequência de mutantes espontâneos. Placas de ágar MH (1,5% de ágar) suplementadas com glicose-6-fosfato a uma concentração de 25  $\mu\text{g/mL}$ , como indica o manual, foram então preparadas com o antibiótico nas seguintes concentrações em  $\mu\text{g/mL}$ : 240 – 120 – 60 – 30 – 15 – 7,5 – 3,75 – 1,875. Placas de controle negativo foram adicionadas com meio MH sem antibiótico, para verificar a contagem de células totais. Para a semeadura nas placas, os inóculos foram ajustados para 0,5 McFarland. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C por aproximadamente 18 horas.

Para este experimento, o manual do CLSI indica que caso seja visualizada uma colônia, no local de semeadura, o evento pode ser ignorado e o CIM pode ser determinado no valor da concentração da placa com esse perfil, caso os controles estejam corretos.

O experimento para a determinação do CIM de fosfomicina foi repetido 3 vezes para os isolados 548, 578, 591, 600, 612, 613, 618, 620, pois foi difícil de determinar um CIM específico. Por vezes, o crescimento diminuía, mas não cessava completamente

em certas concentrações em experimentos diferentes, e observamos também casos onde o crescimento bacteriano cessava em uma concentração, mas voltava a ser visualizado na concentração dobrada.

### 3.2.3 Medição da frequência de mutantes

Após a seleção de isolados através do teste de contagem de colônias satélite no teste de disco-difusão, e da determinação do CIM de cada um desses isolados para rifampicina e fosfomicina, os testes para a determinação de frequência de mutantes puderam ser conduzidos.

Testes para determinação da frequência de mutantes espontâneos dos isolados selecionados foram feitos com culturas recém-recuperadas de congelamento em glicerol (20%) à -80 °C. Para cada isolado, um mínimo de 9 culturas independentes, iniciadas com colônias isoladas, foram testadas.

As colônias foram inoculadas individualmente, cada uma em tubo de 14 mL estéril contendo 3 mL de LB líquido, e incubadas por 20 a 24 horas em estufa a 37 °C. Cada cultura em meio líquido foi semeada para que fossem contabilizados os números de células viáveis (diluição seriada e semeadura em placas contendo apenas ágar MacConkey), e os números de mutantes espontâneos para cada um dos dois antibióticos (em ágar MacConkey sendo usadas as concentrações de 24 µg/mL da rifampicina e 30 µg/mL de fosfomicina).

Após incubação à 37 °C (sem antibióticos e com rifampicina por 24 horas; fosfomicina por 48 horas), o número de colônias de todas as placas foi contado, e a frequência de mutantes espontâneos determinada pelo resultado da divisão do número de mutantes sobre o número de células viáveis presentes na cultura.

Como definição clássica, o fenótipo mutador pode ser confirmado quando a cepa apresenta um aumento de pelo menos 10 vezes na frequência de mutação em relação ao valor médio da população para, pelo menos, dois marcadores de mutagênese distintos (DENAMUR et al., 2002; MAO et al., 1997; TURRIENTES et al., 2013).

### 3.3 Teste para a presença do elemento genético móvel tipo ICE

A fim de estabelecer a prevalência de ICEs especificamente da família SXT/R391 em isolados clínicos de *P. mirabilis*, realizamos o procedimento de PCR para a identificação de genes exclusivos dos ICEs dessa família.

Utilizando iniciadores descritos na Tabela 2, definidos por Mata et al., (2011) para o gene da integrase (*int*) e iniciadores desenhados no presente estudo para amplificação dos genes *rumA* e *rumB* presentes no esqueleto de ICEs da família STX/R391, realizamos o procedimento de PCR para detectar a amplificação dos genes. O gene da integrase é amplamente usado para a identificação de ICEs em coleções de isolados naturais e clínicos, por ser um gene que caracteriza as diferentes famílias de ICEs, definindo o local de integração dos elementos (MATA et al., 2011; WOZNIAK; WALDOR, 2010); já os genes *rumA* e *rumB*, foram escolhidos por serem de interesse ao presente estudo e por fazerem parte dos 52 “*core genes*” da família SXT/R391 (WOZNIAK; WALDOR, 2010).

**Tabela 2** – Sequências de iniciadores usadas para amplificação dos genes de interesse indicados durante o presente estudo. O tamanho de cada produto de PCR é indicado.

Iniciadores usados durante o estudo			
Iniciadores	Sequência de nucleotídeos (5' - 3')	Tamanho do produto de PCR	Gene-alvo
<b>SXTINT F</b>	TCG ATG ATG GTC TCT AGC TG	1200	Integrase da família SXT
<b>SXTINT R</b>	TCA GTT AGC TGG CTC GAT GC		
<b>RUMA F</b>	TGG TGA CCA CAC CAA ATA TCT C	372	<i>rumA</i> - ICE SXT/R391 - DNA polimerase da família Y
<b>RUMA R</b>	AAG CCA AGC GCC TTC GTA TT		
<b>RUMB F</b>	TTG AGC TCT CTG ACG GTT CTC	684	<i>rumB</i> - ICE SXT/R391 - DNA polimerase da família Y
<b>RUMB R</b>	ATT TGC CTT GGT GGA CTG CAA		
<b>RPOB F</b>	GAA TGT CAG ATC CGT GGT GT	953	<i>rpoB</i> de <i>P. mirabilis</i> -
<b>RPOB R</b>	CCA ACC GCA GAG AGA TCA TA		

			subunidade $\beta$ da RNA Polimerase
<b>ERIC 1R</b>	ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C	Variados	Sequências
<b>ERIC 2</b>	AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G		intergênicas repetitivas

O DNA genômico de todos os 77 isolados e das 2 cepas usadas como referência foram extraídos pelo protocolo de extração de DNA genômico de bactérias entéricas feito com clorofórmio (protocolo anexo II) (WEN-PING; TSONG-TEH, 1993). Os produtos da extração foram estocados em tubos *epENDORF* em freezer à -20 °C.

Considerando que o DNA genômico extraído poderia não estar íntegro para todas as amostras, realizamos a PCR de uma porção do gene *rpoB* com todos os DNAs de isolados e cepas referência. O gene *rpoB* deve ser amplificado em todas as amostras por ser um gene essencial e que tolera apenas mutações de troca de bases em pontos específicos do gene. Uma vez que o era visualizado o produto de PCR em uma reação com os iniciadores do gene *rpoB*, em todas as amostras de DNA genômico, prosseguimos com a amplificação dos genes *int*, *rumA* e *rumB*.

O procedimento de PCR foi feito com a DNA Taq Polimerase (5 U/ $\mu$ L) da marca Sinapse Biotecnologia, que tem eficiência de amplificação de 1 kb por minuto de extensão. Considerando o tamanho do *amplicon* de cada gene, e a temperatura de anelamento dos iniciadores, a reação de PCR foi programada como descrito na Tabela 3 em termociclador da marca Eppendorf AG (Mastercycler® nexus). O mix de amplificação de cada amostra continha 25  $\mu$ L de volume total, sendo 2,5  $\mu$ L de tampão (10 X PCR Buffer – 100 mM Tris-Cl - pH 8.8, 500 mM KCl, 1% Triton-X-100, 16 Mm MgCl<sub>2</sub>), 0,20  $\mu$ L de Taq Polimerase, 0,25  $\mu$ L de cada um dos pares de iniciadores (*int*, *rumA* e *rumB* descritos na tabela 2), 0,5  $\mu$ L de dNTPs, 1  $\mu$ L de amostra de DNA previamente extraído (20 ng/ $\mu$ L) e 20,3  $\mu$ L de água Milli-Q autoclavada.

O produto de PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 0,8% em tampão TBE 0,5 X (Tris-borato-EDTA) contendo brometo de etídio (0,5  $\mu$ g/mL de gel) por 30 minutos a 100 Volts.



**Tabela 3** – Etapas de amplificação em termociclador dos 3 genes investigados para a determinação da prevalência dos ICEs SXT/R391 nos isolados clínicos do presente estudo.

Etapa	Temperatura	Tempo
Desnaturação inicial	94 °C	5 minutos
30x	Desnaturação	94 °C 1 minuto
	Anelamento	<i>rpoB</i> – 54 °C <i>int</i> – 51 °C <i>rumA</i> – 60 °C <i>rumB</i> – 60 °C 30 segundos
	Extensão	72 °C <i>rpoB</i> – 1 minuto <i>int</i> - 1 minuto <i>rumA</i> - 30 segundos <i>rumB</i> - 45 segundos
	Extensão final	72 °C 10 minutos
Estoque	4 °C	∞

### 3.4 Ensaios de conjugação do ICE SXT/R391 para *E. coli*

Foram realizados experimentos de conjugação, na tentativa de transferir o ICE SXT/R391 encontrado nos isolados clínicos de nosso estudo, para a cepa de *E. coli* MG1655.

#### 3.4.1 Antibiograma das cepas que possuem ICE SXT/R391

Foi realizado teste para identificar o perfil de resistência das cepas com resultado positivo para a PCR de identificação de genes exclusivos dos ICEs da família SXT/R391. O teste foi feito por ensaio de disco-difusão de acordo com o protocolo padronizado pelo manual “M100-S25: *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-fifth Informational Supplement*” desenvolvido pelo CLSI (*Clinical & Laboratory Standards and Insitute*).

O teste foi feito no mínimo duas vezes para cada isolado. Uma colônia foi

inoculada em 3 mL de caldo MH e colocada em estufa 37 °C por um período de 18 a 20 horas. Os inóculos foram diluídos de acordo com a escala padronizada à uma turbidez equivalente à 0,5 McFarland, que equivale a aproximadamente  $10^4$  células/mL. 100 µL do inóculo diluído foram transferidos para uma placa de petri de 100 mm contendo 25 mL de ágar MH e espalhados com um *swab* estéril. O número máximo de 6 discos por placa foi respeitado e após 16 horas de incubação das placas em estufa 37 °C, o raio dos halos foi medido e a interpretação dos resultados foi realizada conforme a recomendação do CLSI.

Além disso, foi realizada a investigação da presença de β-lactamases de espectro ampliado, em parceria com o laboratório do Professor Dr. Nilton Lincopan. A triagem inicial para detecção de β-lactamases de espectro ampliado em *P. mirabilis* é feita após identificação de um perfil de resistência para um dos três seguintes antibióticos: cefpodoxima, ceftriaxona e ceftazidima. Uma vez que são selecionadas as cepas, o teste de confirmação foi feito também por um método de disco-difusão, chamado especificamente de teste de aproximação de disco, onde foram colocados a 20 mm de distância de um disco de amoxicilina + ácido clavulânico os discos de ceftriaxona e de ceftazidima. Caso o mecanismo que possibilita a resistência seja a ação de uma enzima β-lactamase de espectro ampliado, o halo de inibição deve aumentar na área de interseção entre os discos, evidenciando o sinergismo entre a ação dos compostos em combinação.

#### 3.4.2 Ensaio de conjugação

Em posse do antibiograma dos isolados portadores de ICEs, ensaiamos o experimento de conjugação destes com a cepa de *E. coli* MG1655 estocada na coleção de cepas do nosso laboratório em freezer -80° C.

Inicialmente, isolamos um mutante espontâneo da cepa de *E. coli* resistente à Rifampicina a partir de um inóculo (crescido por mais de 16 horas em estufa 37 °C) semeado em meio de ágar MacConkey contendo 100 µg/mL de Rifampicina. Em posse de uma cepa de *E. coli* Rif<sup>R</sup> seria possível selecionar apenas esta espécie após o período de incubação de conjugação de uma mistura de *E. coli* com *P. mirabilis*.

Uma vez feito o estoque da cepa *E. coli* Rif<sup>R</sup>, foi definido o MIC dessa linhagem para os antibióticos que poderiam ter o gene de resistência em *P. mirabilis* transferidos

à *E. coli* após a conjugação; Ampicilina = 16 µg/mL; Cefotaxima = 0,25 µg/mL; Ceftriaxona < 0,125 µg/mL; Ciprofloxacina < 0,125 µg/mL; Gentamicina = 0,25 µg/mL; Trimetoprim = 0,25 µg/mL.

O ensaio de conjugação foi então feito em placas de ágar LB, onde se misturavam em uma proporção de 1:1, culturas de *E. coli* Rif<sup>R</sup> a uma DO<sub>600</sub> 1,0 de turbidez, com culturas igualmente concentradas de cada linhagem de *P. mirabilis* portador de ICE SXT/R391 resistente aos antibióticos com descrição de marca de resistência transferível por elementos genéticos móveis (cepas 19, 578, 603, 607, 618 e 619). Foi depositado na placa um total de 100 µL de cada cultura, e estas foram colocadas em estufa a 37 °C por cerca de 20 horas. O material do crescimento bacteriano foi coletado e suspenso em solução salina, e diluições seriadas do material dissolvido foram semeadas em placas de MacConkey com uma mistura de rifampicina e um segundo antibiótico, para o qual a cepa de *P. mirabilis* apresentou resistência no antibiograma, como mostrado na Tabela 4.

**Tabela 4** – Descrição dos antibióticos escolhidos para seleção de transconjugantes de *E. coli* após identificação das cepas de *P. mirabilis* que carregam ICEs SXT/R391. A escolha dos antibióticos foi feita com base no perfil de resistência das cepas de *P. mirabilis*.

Semeadura das conjugações							
	19	578	591	603	607	618	619
<b>RIF + AMP</b>	X	X		X	X	X	X
<b>RIF + CAZ</b>		X		X		X	X
<b>RIF + CTX</b>		X		X	X	X	X
<b>RIF + CIP</b>	X	X		X	X	X	X
<b>RIF + GEN</b>			X	X	X	X	X
<b>RIF + TRI</b>				X	X		

Além de realizar o ensaio da maneira descrita, tentamos induzir a transferência do ICE, considerando que danos no DNA regulam positivamente os eventos de excisão e conjugação do ICE, aplicamos uma dose de luz ultravioleta (UV) nas linhagens de *P. mirabilis* antes do procedimento usual de conjugação.

Foi feita então uma curva de sobrevivência, e escolhida uma dose de 10 J/m<sup>2</sup> de

UV que foi aplicada nas cepas de *P. mirabilis* para indução do processo de transferência do ICE que não causasse mais que 80% de mortalidade das células.

O ensaio de conjugação foi então realizado, inóculos de *E. coli* Rif<sup>R</sup> e das cepas já descritas de *P. mirabilis* foram feitos em 3 mL de LB líquido e colocados em estufa 37 °C por aproximadamente 18 horas. As culturas foram então diluídas a uma DO<sub>600</sub> de 0,1 e incubadas por cerca de 1 hora e 20 minutos até que a DO<sub>600</sub> atingisse valores entre, 0,4 – 0,5. As culturas de *P. mirabilis*, agora em fase exponencial, foram centrifugadas e o LB foi retirado dos tubos e os *pellets* ressuspensos em solução salina, para então serem submetidos à dose de UV determinada. Após a exposição à 10 J/m<sup>2</sup> de UV, 50 µL do inóculo irradiado de *P. mirabilis* e a mesma quantidade do inóculo não-irradiado de *E. coli*, foram dispensados no centro de placas de MacConkey de acordo com o perfil de resistência da cepa de *P. mirabilis* na conforme descrito na Tabela 4. As placas da conjugação foram colocadas em estufa a 37 °C por cerca de 20 horas. Assim como a conjugação feita sem a indução por UV, o material do crescimento bacteriano foi coletado e ressuspensado em solução salina, e a suspensão foi semeada em placas de MacConkey com uma mistura de Rifampicina e um segundo antibiótico (como na Tabela 4), para que *E. coli* transconjugantes fossem selecionadas.

### 3.5 Experimento de ERIC-PCR

O experimento de ERIC (*Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence*) se baseia em sequências palindrômicas de 127 pares de bases que foram descritas em *E. coli*, e se repetem em múltiplas cópias no genoma de bactérias entéricas e vîbrios.

Para o desenvolvimento da técnica, inicialmente ensaiamos a realização deste com o método de PCR de colônia, no entanto verificamos que as bandas não eram tão visíveis e decidimos extrair o DNA total dos isolados.

O experimento foi feito então, com o DNA genômico obtido anteriormente para a identificação dos genes exclusivos dos ICEs SXT/R391.

O procedimento de PCR foi feito com a DNA Taq Polimerase (5 U/µL) da marca Sinapse Biotecnologia. O mix de amplificação de cada amostra continha 25 µL

de volume total com 2,5  $\mu\text{L}$  de tampão (10 X PCR Buffer – 100 mM Tris-Cl - pH 8.8, 500 mM KCl, 1% Triton-X-100, 16 Mm  $\text{MgCl}_2$ ), 0,20  $\mu\text{L}$  de Taq Polimerase (5 U/ $\mu\text{L}$ ), 0,25  $\mu\text{L}$  de cada um dos pares de iniciadores (10 mM) descritos na tabela 2, 0,5  $\mu\text{L}$  de dNTPs (10 mM), 1  $\mu\text{L}$  de amostra de DNA (20 ng/ $\mu\text{L}$ ) previamente extraído e 20,3  $\mu\text{L}$  de água Milli-Q autoclavada em tubo estéril.

A reação foi programada em termociclador da marca Eppendorf AG (Mastercycler® nexus) como mostrado na Tabela 5.

**Tabela 5** – Condições de ciclagem para a realização de ERIC-PCR.

Etapa	Temperatura	Tempo
Desnaturação inicial	92 °C	4 minutos
40 X	Desnaturação	94 °C
	Anelamento	48 °C
	Extensão	72 °C
Extensão final	72 °C	5 minutos
Estoque	4 °C	$\infty$

Os produtos da reação de PCR foram mantidos a 4 °C para que fossem analisados em gel de agarose. Os géis foram feitos com 2% de agarose diluída em tampão 1 X TAE e solidificados em uma forma de 10 cm<sup>2</sup>. A corrida do gel foi realizada a 100 Volts por 2 horas. Após a corrida, os géis foram corados por 30 minutos em uma solução de Brometo de etídio em TAE 1 X (1  $\mu\text{L}$  de Brometo a 10 mg/mL para cada 10 mL da TAE), e fotos dos géis foram registradas através de transluminador (MultiDoc-It Digital Imaging System UVP).

A análise das fotos registradas dos géis foi feita através do *software* Bionumerics versão 6.5 (Applied Maths Info) onde era feita a identificação das bandas; O coeficiente de similaridade escolhido foi o de Jaccard com otimização de 1% e tolerância de 2 %; E o método de análise dos clusters foi o UPGMA (*unweighted pair-group method with*

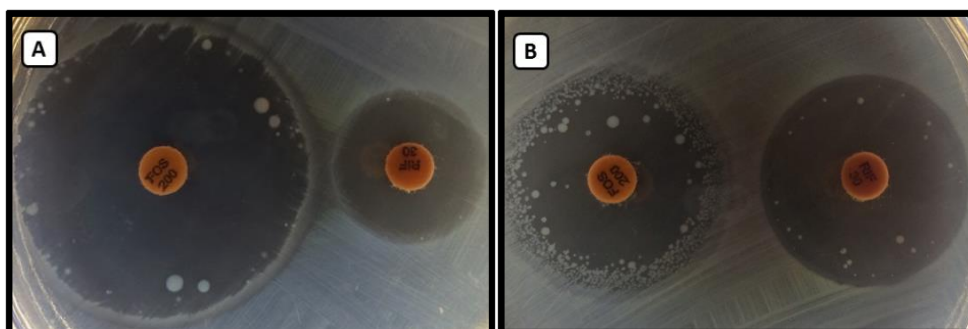
*average linkage*), como feito também para isolados clínicos de *P. mirabilis* na publicação de Michelim e colaboradores em 2008.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Investigação do fenótipo mutador

#### 4.1.1 Seleção de candidatos em teste de disco-difusão

Para a padronização deste experimento, consultamos a metodologia adotada pelo CLSI para uso de discos para difusão de antibióticos em ágar, que inclui a utilização de ágar Müller-Hinton mesmo que este não seja capaz de inibir o *swarming* realizado por *P. mirabilis*. No manual é orientado que o véu formado por este fenômeno seja ignorado no momento de medição do halo de inibição, pois é possível diferenciar a borda do halo de inibição do véu. No caso desse experimento, o véu de *swarming* impediu a visualização de colônias satélite interferindo em nossos resultados. Após essa constatação, testamos uma cultura derivada de uma mesma colônia para a comparação de 4 meios de ágar, MH, LB, MacConkey e CLED. O tamanho dos halos de inibição não apresentava variação entre os diferentes meios. A contagem de colônias satélite em MH e LB eram difíceis já que o véu formado pela bactéria cobria parte do halo, escondendo colônias de menor tamanho. Entre os meios inibidores de motilidade, apesar de não apresentarem diferenças na variação do número de colônias entre as cepas, decidimos usar MacConkey. Um exemplo dos resultados observados durante esse experimento é mostrado na Figura 5.

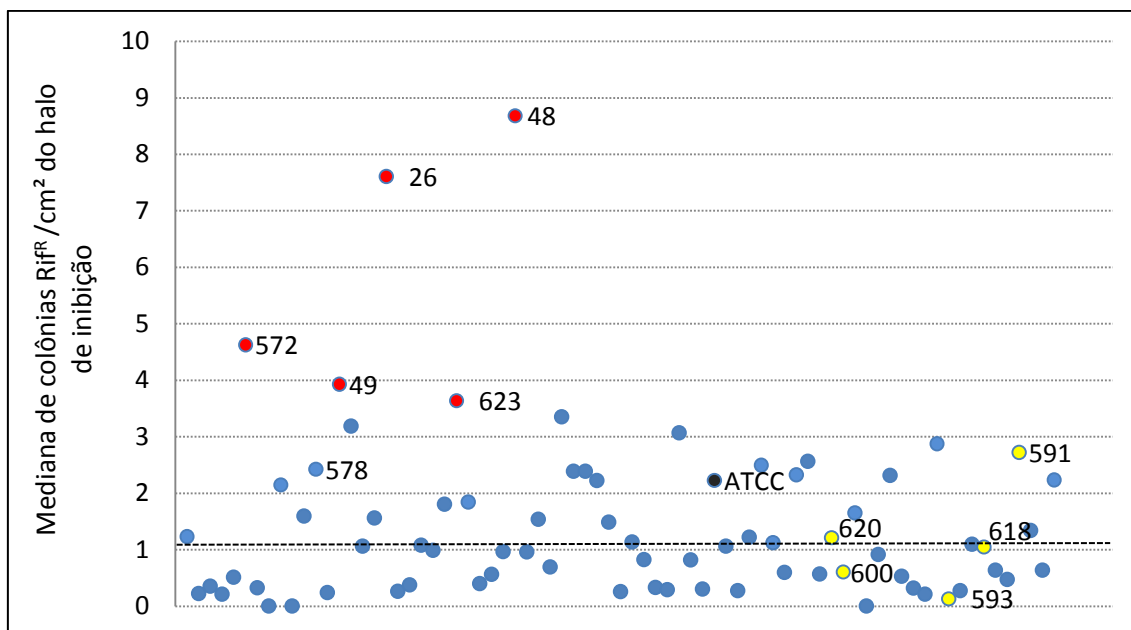


**Figura 5** – Fotos obtidas durante testes de disco-difusão realizados em nosso laboratório com cepas de *P. mirabilis* de nossa coleção. Cepa ATCC em teste com discos de Fosfomicina e Rifampicina (A); Isolado 578 em teste com discos de Fosfomicina e Rifampicina (B).

Sendo assim, o experimento foi realizado com a contagem das colônias satélite e

a medição do diâmetro do halo de inibição em ágar MacConkey. 3 a 5 culturas independentes de cada isolado foram submetidas ao teste, e conseguimos obter o valor da mediana de colônias/cm<sup>2</sup> no interior do halo de inibição de antibiótico, como mostrado nas Figuras 6 e 7 a seguir. Para a escolha dos candidatos, decidimos um ponto de corte de 4 X a mediana da população.

Curiosamente, os resultados variaram, e os isolados com maiores médias não foram os mesmos nos dois antibióticos. Então, decidimos selecionar isolados com base nas duas análises, mesmo que estes apresentassem um valor baixo quando testado com segundo antibiótico. Considerando essas diferenças, temos os isolados 26, 48, 49 e 572 selecionados com os resultados de disco-difusão de rifampicina, que apresentavam de 4 a 8,68 colônias/cm<sup>2</sup> enquanto a mediana da população foi definida como 1,06 colônias/cm<sup>2</sup>, como mostrado na Figura 6.



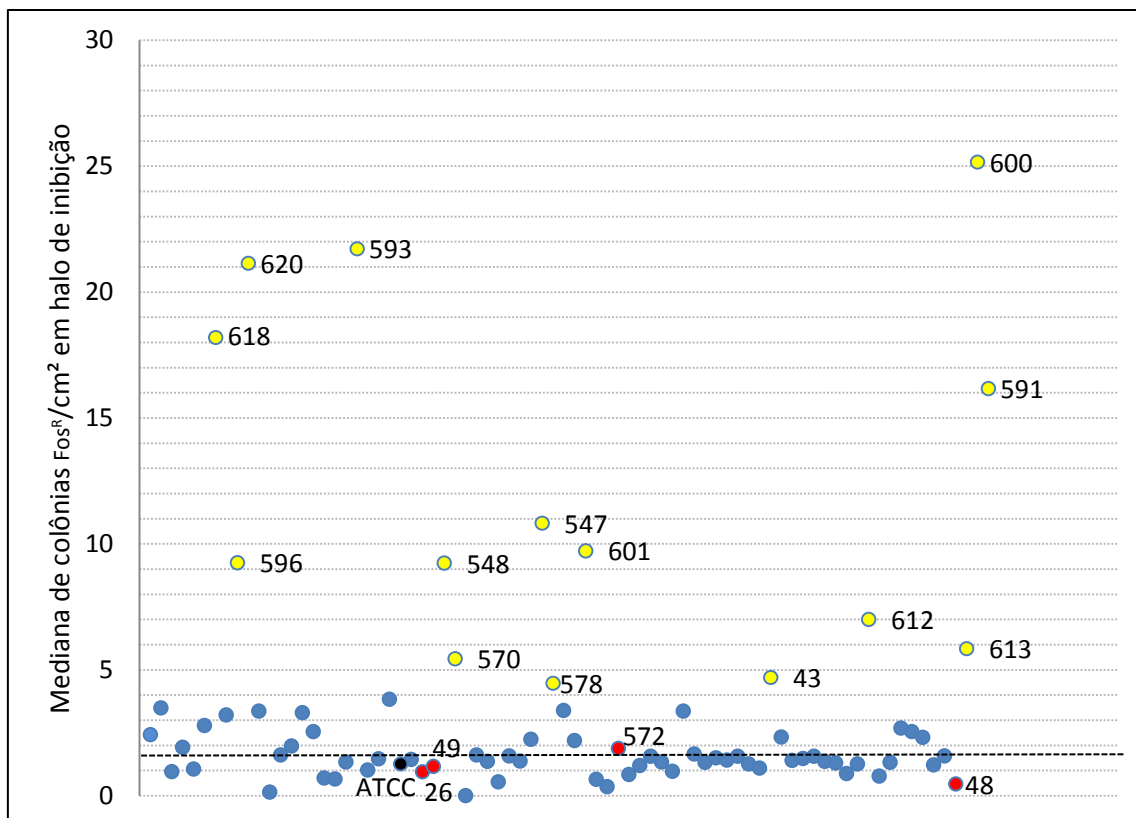
**Figura 6** – Resultado do experimento de contagem de colônias-satélite no interior do halo de inibição de testes de disco-difusão com rifampicina (30 µg). O número de colônias foi dividido pela área do halo, e a mediana foi calculada para cada isolado. Os isolados escolhidos a partir desse experimento para os testes quantitativos de frequência de mutação foram os isolados em coloração vermelha: 26, 48, 49 e 572. Todos os isolados foram comparados com a cepa ATCC, que está destacada em preto. Os isolados em amarelo (591, 593, 600, 618 e 620) foram os cinco isolados que obtiveram os maiores valores no mesmo teste de disco-difusão com o antibiótico fosfomicina. A linha tracejada representa a mediana dos resultados de todos os isolados que é igual a 1,06 colônias/cm<sup>2</sup>.



A diferença entre o isolado que apresentou maior valor ( $48 = 8,68$  colônias Rif<sup>R</sup>/cm<sup>2</sup>) e a mediana da população ( $1,06$  colônias Rif<sup>R</sup>/cm<sup>2</sup>) mostra um aumento de cerca de 8 vezes no surgimento de mutantes nesse experimento qualitativo. Considerando que para todos os isolados o número de colônias satélite é baixo, não esperávamos que fossem encontrados mutadores para este antibiótico. Em pesquisas já publicadas, a variação do número de colônias no halo em de disco-difusão, é similar à variação encontrada nos testes quantitativos de frequência de mutação. Nenhuma cepa de nossa coleção teve um aumento de pelo menos 10 vezes nestes valores nas contagens em disco de rifampicina, que é considerado um aumento significativo para detecção de mutantes (ELLINGTON et al., 2006).

Para a fosfomicina, inicialmente se deve ressaltar que o manual do CLSI indica que cepas que apresentem o diâmetro do halo maior que 1,6 cm podem ser consideradas sensíveis a fosfomicina, ou seja, estas apresentam CIM menor ou igual a 64 µg/mL, e todas as cepas da coleção apresentaram halos com diâmetros maiores que 1,6 cm, sendo todas suscetíveis à fosfomicina.

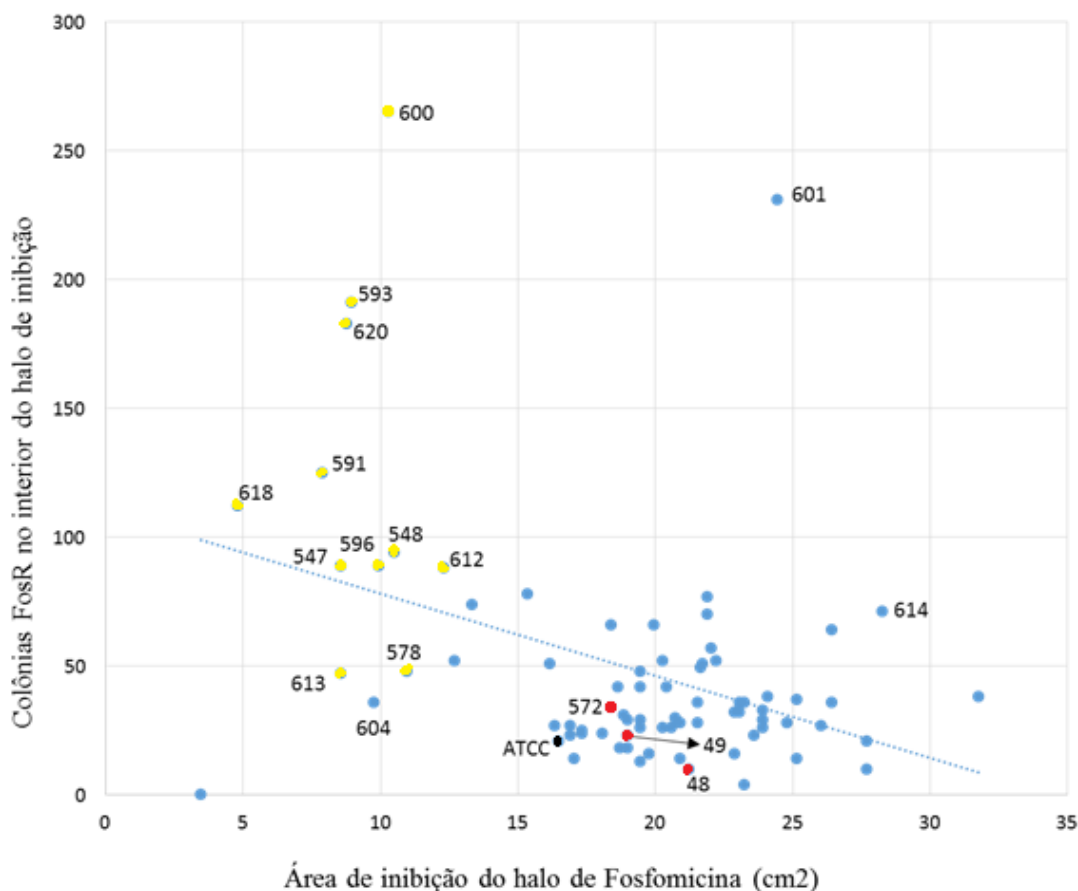
Para o experimento feito com discos de fosfomicina, selecionamos inicialmente os isolados com valores mais altos, 591, 593, 600, 618, 620 e posteriormente os isolados com valores intermediários que incluíam 43, 547, 548, 570, 578, 596, 601, 612 e 613. Os resultados podem ser observados na Figura 7.



**Figura 7** – Resultado do experimento de contagem de colônias satélite formadas no interior do halo de inibição de testes de disco-difusão com fosfomicina (200 µg). O número de colônias foi dividido pela área do halo e a mediana foi calculada para cada isolado. Nesse experimento, selecionamos para iniciar os experimentos de frequência de mutação os isolados 43, 547, 548, 570, 578, 591, 593, 596, 600, 612, 613, 618 e 620. Estão ainda destacados em amarelo os isolados que tiveram as maiores contagens na rifampicina (26, 48, 49 e 572) além da cepa ATCC, em preto. A linha tracejada representa o valor da mediana dos resultados de todos os isolados da coleção que foi igual a 1,64 colônias Fos<sup>R</sup>/cm<sup>2</sup>.

Ao observar que a diferença do diâmetro médio do halo de inibição de Fosfomicina variava em até 3 cm entre os isolados de menores e de maiores halos, decidimos analisar os resultados obtidos após a contagem de colônias Fos<sup>R</sup> e diâmetros dos halos, em um gráfico onde pudéssemos analisar uma possível relação entre menores halos, ou seja, maior CIM, com o surgimento de mutantes Fos<sup>R</sup>, como vemos na Figura 8.

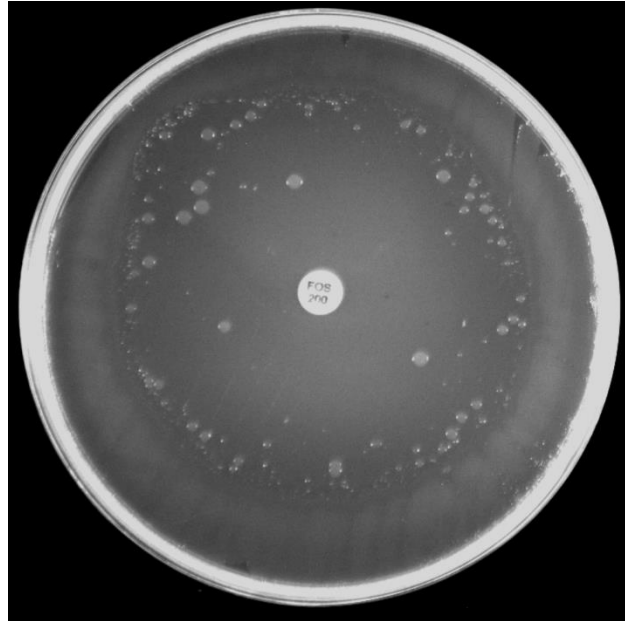
### Relação entre o número de colônias no interior do halo e a área do halo de inibição



**Figura 8** – Gráfico de relação entre a média do número de colônias no interior do halo de inibição da fosfomicina e a área do halo em cm<sup>2</sup>. A linha tracejada indica uma tendência de maior surgimento de mutantes Fos<sup>R</sup> em cepas com menores halos (maiores CIMs).

Observamos a partir da Figura 8 que existe uma relação entre maior CIM (menor halo) e maior frequência de surgimento de colônias mutantes resistentes à fosfomicina em isolados clínicos, como indica a linha de tendência.

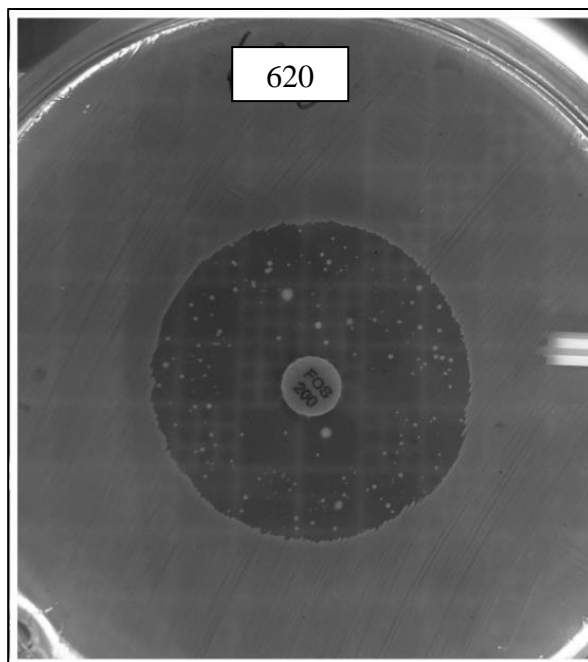
O isolado 601 é aquele que mais destoa da tendência apresentada pelo gráfico. Como pode ser observado na Figura 9 em uma placa representativa do experimento, o isolado 601 apresenta a formação de colônias resistentes na área periférica do halo de inibição, que ocupa uma grande área na placa.



**Figura 9** – Fotografia mostrando a formação de colônias no interior do halo de Fosfomicina no isolado 601. O isolado apresenta halo de sensibilidade a Fosfomicina com 5,58 cm.

Como é proposto por El-Halfawy e Valvano, 2015, isolados heteroresistente apresentam subpopulações com CIMs diferentes. Isso pode estar acontecendo com o isolado 601, onde é possível identificar colônias variantes resistentes à uma concentração do antibiótico em uma faixa definida, ao contrario da cepa 620, que como mostrado na Figura 10, tem colônias mutantes resistentes espalhadas por toda a área do halo de inibição formado pela ação da fosfomicina.

No caso do isolado 601, a possível heteroresistência evidenciaria uma faixa de CIM com valores baixos, sendo todas as subpopulações ainda bastante sensíveis ao antibiótico em questão. Cepas com esse perfil são menos relevantes para o uso clínico do antibiótico, como discutem El-Halfawy e Valvano (2015).



**Figura 10** – Resultados do experimento de disco difusão de fosfomicina com o isolado 620. O isolado apresenta um grande número de colônias no interior de um halo de inibição com cerca de 3,3 cm de diâmetro.

#### 4.1.2 CIM de rifampicina e fosfomicina dos isolados selecionados

Para dar continuidade à investigação da ocorrência de fenótipo mutador, o CIM de cada isolado selecionado foi determinado para que fossem decididas as concentrações dos antibióticos a serem utilizadas durante o experimento de frequência de mutantes. Essa informação é especialmente importante para os testes com fosfomicina. Em nossos experimentos de disco-difusão com fosfomicina, o menor diâmetro de halo encontrado em nossos resultados foi de 2 cm, já o diâmetro que define resistência (CIM = 64  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) é de 1,6 cm. Sabendo disto, vimos que seria necessário avaliar o CIM de cada um dos isolados selecionados para que nenhum isolado com CIM superior a 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  fosse avaliado quanto à frequência de mutantes com essa concentração de fosfomicina.

O valor do CIM de rifampicina nos isolados selecionados foi o mesmo para todos os isolados testados, 6,25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de antibiótico. Definimos então a concentração do experimento de frequência de mutação para 24  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de ágar MacConkey, equivalente a 4 vezes o valor do CIM dos isolados. Apenas o isolado 547 se mostrou resistente à rifampicina.

Já para fosfomicina, os valores encontrados foram variados e difíceis de serem determinados para parte dos isolados selecionados, o que pode ser interferência de uma alta frequência de mutação, onde mesmo na concentração de  $10^4$  células/mL, equivalente a 0,5 na escala de MacFarland, já estão presentes mutantes. Outra possibilidade é a de estarmos observando um fenômeno de heteroresistência em que se observa a existência de subpopulações com CIMs diferentes em um mesmo isolado.

Como mostra a Tabela 6, a maioria dos isolados não cresceu em concentrações de 15  $\mu\text{g/mL}$ , ou mais de Fosfomicina. Outros dois isolados cresceram em alguns testes em 15  $\mu\text{g/mL}$  mas não em 30  $\mu\text{g/mL}$ . E apenas dois isolados (600 e 618) cresceram até a concentração de 60  $\mu\text{g/mL}$ , e foram excluídos dos experimentos de frequência de mutação com 30  $\mu\text{g/mL}$ , mas serão testados com concentrações maiores em outros trabalhos.

A concentração escolhida foi de 30 $\mu\text{g/mL}$ , já que esta é capaz de inibir o crescimento de todos os isolados selecionados, e é a concentração usada em diversos estudos, por ser aproximadamente a concentração estimada que seja alcançada no sistema urinário do organismo durante um tratamento de infecções (MICHALOPOULOS; LIVADITIS; GOUGOUTAS, 2011).

**Tabela 6** – Concentração inibitória mínima de rifampicina e fosfomicina de cada isolado que foi selecionado pelo teste de disco-difusão com possibilidade de ter um fenótipo mutador. Os experimentos para a determinação dos valores de CIM foram feitos de acordo com o manual CLSI.

Isolado	Concentração inibitória mínima ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	Rifampicina	Fosfomicina	Suspeita de fenótipo mutador
<b>HI4320</b>	6	1,8	X
<b>ATCC</b>	6	1,8	X
<b>26</b>	6	1,8	Rifampicina
<b>43</b>	6	3,7	Fosfomicina
<b>48</b>	6	1,8	Rifampicina
<b>49</b>	6	1,8	Rifampicina
<b>547</b>	Resistente	7,5	Fosfomicina
<b>548</b>	6	30	Fosfomicina
<b>570</b>	6	7,5	Fosfomicina

<b>572</b>	6	1,8	Rifampicina
<b>578</b>	6	30	Fosfomicina
<b>591</b>	6	15	Fosfomicina
<b>593</b>	6	15	Fosfomicina
<b>596</b>	6	7,5	Fosfomicina
<b>600</b>	6	60	Fosfomicina
<b>601</b>	6	1,8	Fosfomicina
<b>612</b>	6	15	Fosfomicina
<b>613</b>	6	15	Fosfomicina
<b>618</b>	6	60	Fosfomicina
<b>620</b>	6	30	Fosfomicina

#### 4.1.3 Determinação da frequência de mutantes dos isolados selecionados

Após a seleção inicial de isolados, foram feitos os experimentos para definir quantitativamente a frequência de mutantes dos isolados selecionados. Os resultados se encontram nas Tabelas 7 e 8 a seguir.

**Tabela 7** – Resultados dos experimentos de frequência de mutantes espontâneos Rif<sup>R</sup> realizados com os isolados que obtiveram maiores números de colônias satélite durante os dois testes de disco-difusão.

<b>Frequência de mutantes Rif<sup>R</sup> (por 10<sup>8</sup> células)</b>		
<b>Isolados</b>	<b>Média de mutantes Rif<sup>R</sup></b>	<b>Erro</b>
<b>HI4320</b>	7,23	1,58
<b>ATCC</b>	3,44	1,10
<b>26</b>	10,30	4,80
<b>43</b>	5,39	2,20
<b>48</b>	2,90	0,98
<b>49</b>	5,51	0,18
<b>548</b>	4,05	1,59
<b>570</b>	2,75	1,24
<b>572</b>	2,16	0,35
<b>578</b>	11,35	1,48

<b>591</b>	11,56	7,23
<b>593</b>	17,25	8,78
<b>596</b>	4,35	0,62
<b>600</b>	2,71	0,77
<b>601</b>	7,06	3,20
<b>612</b>	5,16	1,50
<b>613</b>	4,27	1,16
<b>618</b>	4,12	1,07
<b>620</b>	5,68	2,15

**Tabela 8** – Resultados dos experimentos de frequência de mutação espontânea Fos<sup>R</sup> realizados com os isolados que obtiveram maiores números de mutantes por halo durante os testes de disco-difusão.

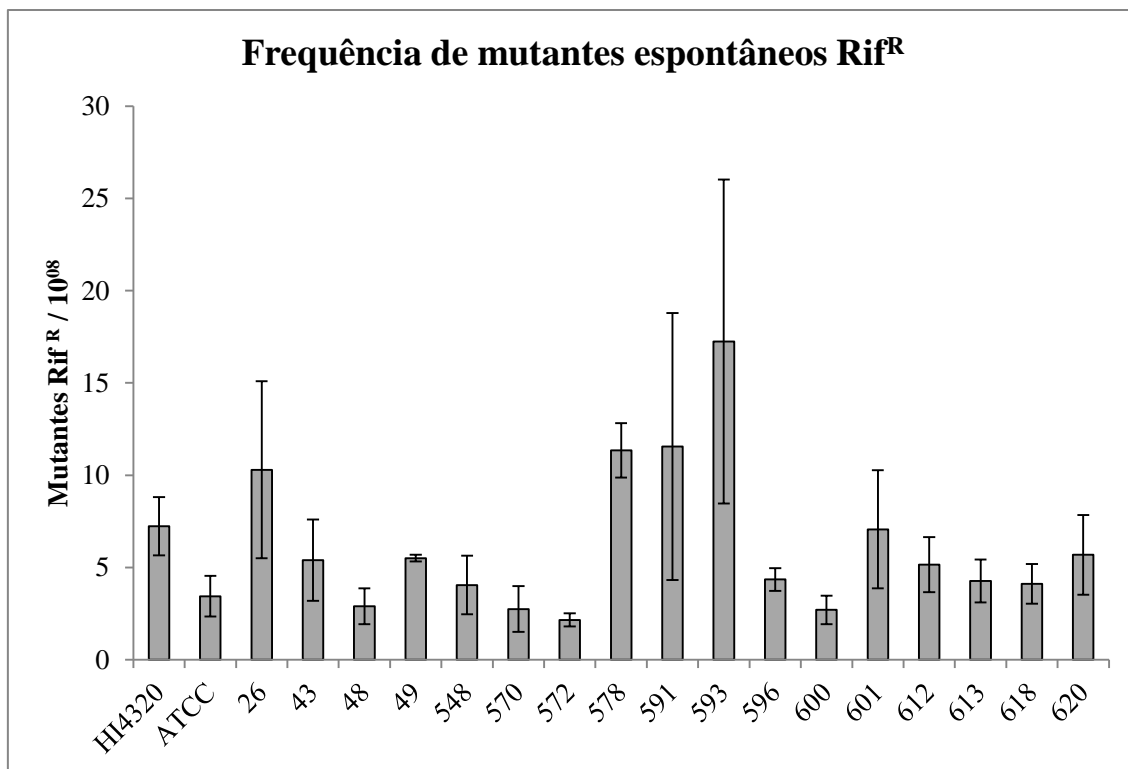
<b>Frequência de mutantes Fos<sup>R</sup> (por 10<sup>8</sup> células)</b>		
<b>Isolados</b>	<b>Média de mutantes Fos<sup>R</sup></b>	<b>Erro</b>
<b>HI4320</b>	<b>5,34</b>	<b>0,71</b>
<b>ATCC</b>	4,19	1,46
<b>26</b>	13,28	8,91
<b>43</b>	78,10	41,24
<b>48</b>	20,33	11,01
<b>49</b>	12,61	4,60
<b>547</b>	471,14	273,35
<b>548</b>	355,75	230,11
<b>570</b>	68,01	29,86
<b>572</b>	13,86	4,07
<b>578</b>	162,95	34,63
<b>591</b>	1689,15	835,51
<b>593</b>	462,30	171,72
<b>596</b>	763,65	432,23
<b>601</b>	8,97	4,64
<b>612</b>	238,93	54,87
<b>613</b>	411,73	111,71
<b>620</b>	1688,89	111,71



Em posse desses resultados desenhamos gráficos onde fosse possível visualizar a diferença dos valores obtidos para cada isolado testado em relação às cepas referência.

Primeiramente, é interessante observar que não há diferença de pelo menos 10 vezes entre os valores encontrados para a cepa ATCC e para a cepa HI4320. A cepa ATCC, apesar de não apresentar genoma sequenciado, não apresentou *amplicon* que evidenciasse nenhum dos genes exclusivos de ICEs SXT/R391. Já a cepa HI4320, que possui genoma sequenciado (PEARSON et al., 2008), apresenta um elemento ICE SXT/R391 sem interrupção dos gene *rumB* por inserção de sequências exógenas, como é eventualmente encontrado nessa família de elementos genéticos. A cepa HI4320 apresentou *amplicon* nos experimentos de PCR em todos os genes do ICE, *int*, *rumA* e *rumB*, como esperado. Esse dado, por si só, mostra que não deve existir relação entre a presença de ICEs e uma maior taxa de mutação. Considerando essas observações, estamos realizando experimentos para observar os níveis de expressão dos genes *rumA* e *rumB* na cepa HI4320 por PCR em tempo real, sendo comparadas condições normais com condições indutoras de dano no DNA, que teoricamente induzem a expressão destes genes (BEABER; HOCHHUT; WALDOR, 2004; POULIN-LAPRADE; BURRUS, 2015).

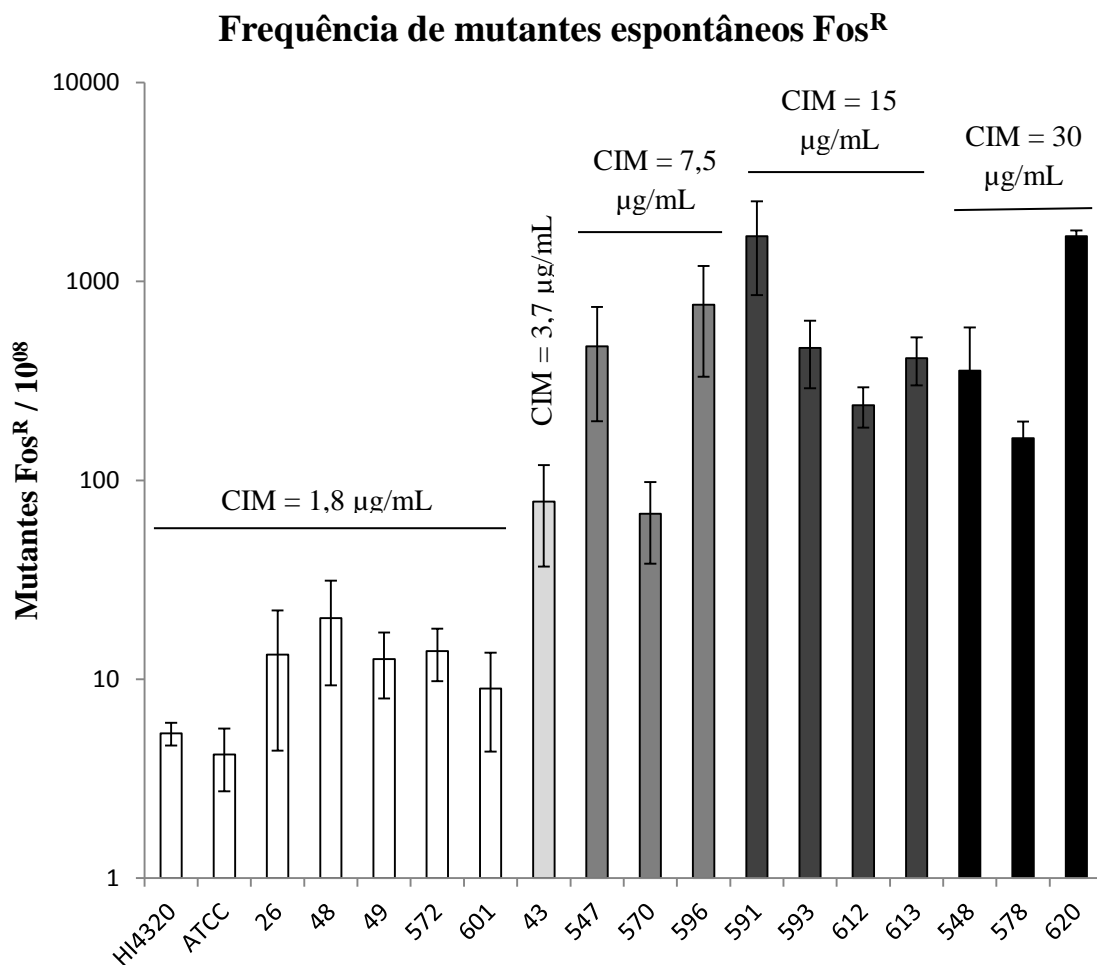
Nos testes com rifampicina, nenhum isolado teve variação expressiva em relação aos valores obtidos para a cepa ATCC e HI4320. Para serem considerados mutadores, os isolados deveriam apresentar uma variação de pelo menos 10 vezes em relação aos demais isolados testados. Estranhamente, os isolados com maiores frequências de mutantes não foram os com maior número de colônias no interior do halo de inibição de rifampicina, apenas o isolado 26, selecionado nesse antibiótico, apresentou maior frequência de mutantes em relação ao valor obtido para cepa ATCC, como é visto na Figura 11. Alguns dos isolados selecionados em discos de fosfomicina, 578, 591 e 593 apresentaram um pequeno aumento da frequência de mutantes no marcador de mutagênese rifampicina, como também pode ser observado na Figura 11. No entanto, como as variações são baixas e não categorizam os isolados como mutadores em rifampicina, não existem motivos para questionar a seleção de mutadores no teste de discos com este antibiótico.



**Figura 11** – Média da frequência de mutantes espontâneos de isolados clínicos selecionados para resistência ao antibiótico Rifampicina. Os isolados HI4320, 578, 591 e 618 apresentam genes exclusivos da família de ICEs SXT/R391. A barra de erros representa o valor do erro padrão dos valores encontrados.

Nenhum isolado obteve frequências de mutantes com alterações de 10 a 1.000 vezes nos experimentos com rifampicina, como é característico de cepas *mutS*<sup>-</sup>. Não existe descrição da frequência de mutantes esperada de uma cepa *mutS*<sup>-</sup> da espécie *P. mirabilis*, mas caso esta se comporte como cepas de *E. coli* e outras bactérias com esse genótipo, deveríamos observar frequências de mutantes mais altas para este antibiótico (DENAMUR et al., 2002; NILSSON et al., 2003).

Os resultados de frequência de mutantes em fosfomicina estão representados na Figura 12, nesse caso o gráfico foi feito em escala logarítmica já que encontramos uma grande variação dos valores obtidos para cada cepa.



**Figura 12** – Média da frequência de mutantes espontâneos resistentes a fosfomicina. É evidenciado na imagem o CIM de cada isolado. Os isolados HI4320, 578 e 591 apresentam genes exclusivos da família de ICES SXT/R391 como será apresentado adiante neste trabalho. A barra de erros indicada na figura representa o valor do erro padrão dos valores encontrados.

Nos resultados de surgimento de mutantes resistentes à fosfomicina, vemos frequências de mutação condizentes com fenótipos de hiper-mutadores (Figura 12). Deve-se observar que enquanto mutações que causam resistência à rifampicina são exclusivamente mutações de substituições de bases nitrogenadas em pontos específicos do gene *rpoB*, a aquisição de resistência à fosfomicina pode envolver mutações diferentes, como deleções e inserções de tamanhos variados que inativem genes inteiros – *glpT* e *uhpT* (ELLINGTON et al., 2006; GARIBYAN et al., 2003; MICHALOPOULOS; LIVADITIS; GOUGOUTAS, 2011; RODRÍGUEZ-ROJAS et al., 2010). Desta forma, é possível que estes isolados apresentem um fenótipo mutador onde inserções/deleções predominem, explicando assim a diferença entre os resultados obtidos com os dois antibióticos.

Uma frequência de mutantes com pequenas variações em relação ao encontrado para a população poderia ser compatível com a hipótese de uma alteração na frequência de mutação ligada à presença de genes envolvidos em mecanismos moleculares de tolerância de erros de replicação de DNA como os genes *rumAB* geralmente encontrados em ICEs da família SXT/R391, no entanto apenas 2 cepas com elevação na frequência de mutantes Fos<sup>R</sup> apresentam os ICEs. Chegamos então à conclusão de que os dois eventos não se correlacionam, sendo a presença de um ICE SXT/R391 independente de um fenótipo onde se observem altas frequências de mutações Fos<sup>R</sup> espontâneas. Resultados como os encontrados em nossos experimentos não são inéditos nem raros. Eventos como este já foram observados para o antibiótico em questão em outras espécies de bactérias (ENGEL et al., 2013; WALSH et al., 2015).

Para que os nossos isolados fossem categorizados como heteroresistentes, não deveríamos observar o surgimento de mutantes em concentrações altas de fosfomicina. Por isso, decidimos investigar essa hipótese. A definição de heteroresistência é obscura e parece não levar em consideração a possibilidade de uma alteração nas taxas de mutação. Classificar os isolados com as características observadas em nosso estudo como heteroresistentes não explica as bases moleculares que possibilitam os acontecimentos, mas podem ser definições úteis na clínica, principalmente considerando o uso do antibiótico fosfomicina em casos de infecções urinárias (ENGEL et al., 2013; EL-HALFAWY; VALVANO, 2015; MICHALOPOULOS; LIVADITIS; GOUGOUTAS, 2011).

Cepas heteroresistentes podem não ter um valor único de CIM definido, mas uma faixa de valores, o que explicaria a dificuldade de definir o CIM de fosfomicina para os isolados em questão. Na Figura 12 separamos os isolados com maiores frequências de mutantes pelos seus CIMs; a figura confirma a nossa observação anterior de que existe uma relação entre a frequência de mutantes e um maior CIM.

Para garantir que a contagem do experimento de frequência de mutantes foi feita com mutantes reais, ou seja, que realmente seriam categorizados como resistentes à fosfomicina após adquirirem mutações que os fazem resistentes a altas quantidades do antibiótico, fizemos a passagem de colônias que foram selecionadas à 30 µg/mL no experimento, para placas contendo 256 µg/mL de fosfomicina + 25 µg/mL de glicose-6-fosfato (Concentração definida pelo CLSI para CIM que categoriza isolados como

resistentes). 12 colônias isoladas provenientes de diferentes placas de *petri* de cada isolado foram semeadas nas placas contendo a maior concentração de fosfomicina e apenas nos isolados ATCC, 49, 578 e 596 uma dessas 12 colônias não cresceu na nova concentração. Inclusive a cepa 601, que apesar de não apresentar uma alta frequência de mutantes, como mostrado na Figura 9, apresentou um alto número de colônias satélite no teste de disco difusão, todas as colônias Fos<sup>R</sup> selecionadas em 30 µg/mL, cresceram em placas contendo 256 µg/mL de fosfomicina.

Este último resultado não corrobora com a hipótese de heteroresistência. Caso a observação fosse de isolados heteroresistentes, estes não deveriam crescer em concentrações tão distantes do CIM inicial da cepa, considerando que o surgimento de subpopulações deveria limitar uma faixa de CIM menos ampla, como consta na definição de heteroresistência (EL-HALFAWY; VALVANO, 2015).

Para obter mais informações que pudessem esclarecer os dados observados em fosfomicina, consideramos a possibilidade da espécie *P. mirabilis*, assim como *Pseudomonas aeruginosa*, realizar o transporte de fosfomicina através de um único transportador. Nesse caso, alterações em um único gene poderiam garantir a resistência adquirida pelos mutantes observados em nossos experimentos, o que seria um evento mais provável do que mutações em dois genes distintos, como acontece em *E. coli*. Em *P. aeruginosa*, mutações Fos<sup>R</sup> são mais frequentes do que em *E. coli* (CASTAÑEDA-GARCÍA et al., 2009).

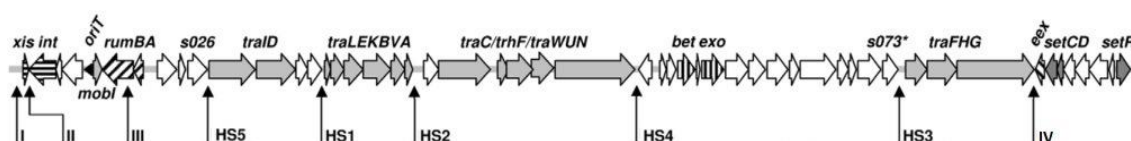
As proteínas que realizam o transporte de fosfomicina em *E. coli*, UhpT e GlpT, pertencem a uma superfamília de proteínas facilitadoras e apresentam homologia à outras proteínas de transporte, no entanto apenas estas são capazes de transportar a fosfomicina para o meio intracelular (LEMIEUX; HUANG; WANG, 2005). Realizamos o BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) das proteínas descritas de *E. coli*, UhpT e GlpT, e ambas as proteínas obtiveram combinações correspondentes de alta homologia no genoma de *P. mirabilis* HI4320, mostrando que a cepa apresenta dois ou mais transportadores similares com os transportadores capazes de transportar fosfomicina. É importante ressaltar, que o BLAST foi feito com a cepa HI4320, que não apresentou uma alta frequência de mutantes Fos<sup>R</sup>, e os resultados podem ser diferentes se viessem a serem feitos com as cepas que apresentaram a alta frequência de mutantes, o que explicaria as observações encontradas.

Uma cepa com apenas um transportador, ao ter este inativado por uma mutação aleatória, já resultaria no surgimento de mutantes Fos<sup>R</sup>, enquanto cepas com dois transportadores, precisem de dois eventos de mutação para que haja o surgimento de um mutante Fos<sup>R</sup>. Os resultados do BLAST podem ser encontrados no anexo II.

## 4.2 Estudos com ICEs SXT/R391

### 4.2.1 Avaliação da presença de ICEs

Verificamos por PCR a presença de genes exclusivos da família de ICEs SXT/R391. Escolhemos 3 genes para essa avaliação, o gene que codifica a enzima integrase, responsável pela integração do ICE no cromossomo bacteriano, e que diferencia famílias de ICEs, e os genes que codificam a polimerase da família Y, *rumA* e *rumB*. Os iniciadores para a verificação da integrase foram obtidos de acordo com a publicação de Mata et al., 2011. Já os iniciadores para os genes *rumA* e *rumB* foram desenhados de acordo com o genoma da cepa HI4320; considerando que o gene *rumB* pode ser interrompido por inserções de grandes sequências (ponto de inserção III na Figura 13), esperamos que ICEs onde este esteja interrompido não apresentem produto de PCR obtido com o respectivo par de iniciadores.



**Figura 13** – Esquema da organização de genes essenciais e genes comumente encontrados em ICEs da família SXT/R391; as setas indicam 5 hotspots (indicados de HS1 a HS5) e 4 zonas de inserção (marcadas em algarismos romanos) onde variações de sequências podem ser encontradas (WOZNIAK et al., 2009).

Foram encontrados 9 dentre os 77 isolados clínicos onde pelo menos dos um genes exclusivos dos ICEs SXT/R391 testados foi positivo (Tabela 9). Considerando esses resultados, temos uma prevalência de 11,69% de isolados de *P. mirabilis* carregando um ICE da família SXT/R391 em seu cromossomo.

**Tabela 9** – Identificação e características dos isolados que foram classificados como portadores de ICEs da família SXT/R391 em nossa coleção.

<b>Cepas que apresentam ICEs da família SXT/R391</b>			
<b>Isolado</b>	<b>Mateiral de origem</b>	<b>Local de coleta</b>	<b>Genes identificados por PCR</b>
<b>HI4320</b>	Urina	EUA - Mobley <i>et. al.</i> 2008	<i>int; rumA; rumB</i>
<b>19</b>	Urina	Maringá	<i>int</i>
<b>578</b>	Sangue	São Paulo – SP	<i>Int</i>
<b>591</b>	Urina	São Paulo – SP	<i>int; rumA; rumB</i>
<b>595</b>	Urina	São Paulo – SP	<i>int; rumA</i>
<b>603</b>	Escarra	São Paulo – SP	<i>int; rumA; rumB</i>
<b>607</b>	Urina	São Paulo – SP	<i>int; rumA; rumB</i>
<b>614</b>	Urina	São Paulo – SP	<i>int; rumA; rumB</i>
<b>618</b>	Urina	São Paulo – SP	<i>int; rumA; rumB</i>
<b>619</b>	Urina	São Paulo – SP	<i>int; rumB</i>

Incluindo a cepa HI4320, dos isolados que apresentam ICEs em seus cromossomos, apenas 3 mostraram resultados elevados nos testes de frequência de mutantes, 578, 591 e 618, sendo este último não testado em Fosfomicina por apresentar um MIC maior que 30 µg/mL. Desta forma, a hipótese inicial de nosso trabalho, onde propusemos que a presença de ICE poderia estar relacionada a altas frequências de mutação observadas por estudos anteriores em isolados clínicos de *P. mirabilis*, não foi confirmada.

Sabendo que os genes relacionados à replicação e reparo de DNA presentes no ICE são regulados pelo sistema SOS, sendo, portanto induzidos apenas em caso de dano no DNA, possivelmente estes podem apenas vir a modificar a frequência de mutação de uma cepa na presença de agentes capazes de danificar o DNA, o que pode explicar o resultado obtido em nosso estudo (BEABER; HOCHHUT; WALDOR, 2004; WOZNIAK; WALDOR, 2010). Mesmo assim, essa hipótese não corrobora com os estudos que nos levaram a questionar essa possível relação, já que nestes as cepas que apresentavam a descrita ‘instabilidade genética’ não passavam por tratamentos

indutores de mutagênese (COSTA, 1978; NEWTON; COSTA, 1994).

#### 4.2.2 Perfil de resistência das cepas portadoras de ICEs

O perfil de resistência estabelecido pelo antibiograma feito se encontra na Tabela 10.

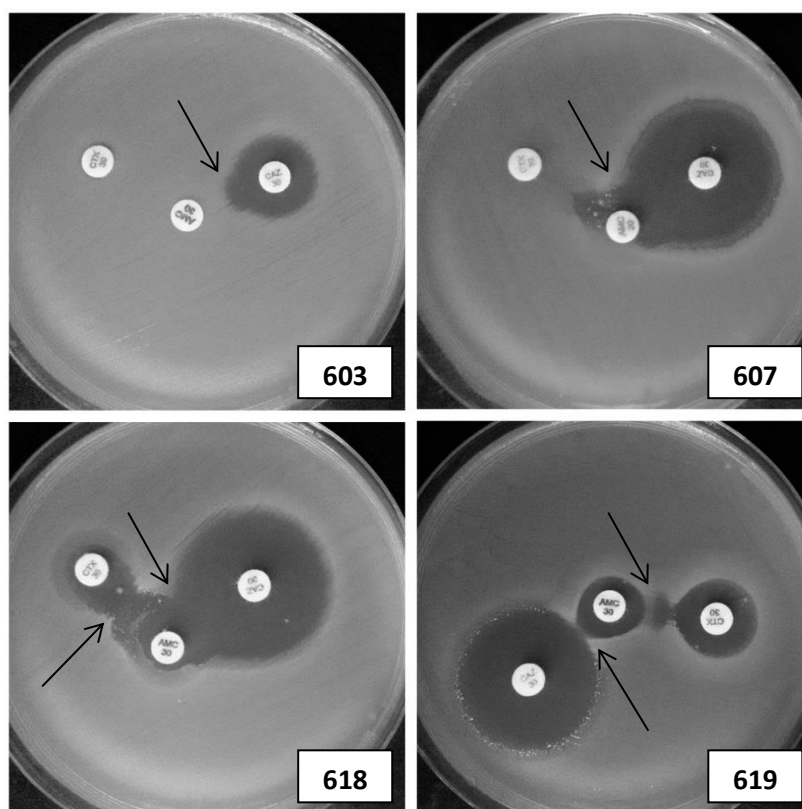
O teste para detecção de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL) foi feito com as cepas que apresentaram perfil ‘resistente’ para os antibióticos ceftazidima e cefotaxima como indicado no CLSI e os resultados estão apresentados na Figura 14.

**Tabela 10** – Antibiograma descrevendo o perfil de resistência de cada isolado portador de ICE SXT/R391 de acordo com o teste de disco-difusão padronizado pelo CLSI. S = Sensível; R = Resistente; I = Intermediário.

	19	578	591	595	603	607	614	618	619
<b>Amicacina</b>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<b>Ampicilina</b>	R	R	S	S	R	R	S	R	R
<b>Ampicilina/Sulbactam</b>		R					S	R	R
<b>Cefalotina</b>			S	S	R	R	R	R	R
<b>Cefazolina</b>	R								
<b>Cefepime</b>	S	R	S	S	R	R	S	R	R
<b>Cefoxitina</b>	S						S	R	R
<b>Cefotaxima</b>			S	S	R	R			
<b>Ceftazidima</b>	S	R	S	S	R	S	S	R	R
<b>Ceftriaxona</b>	S	R	S	S	R	R	S	R	R
<b>Cefuroxima</b>		R							
<b>Ciprofloxacina</b>	R	R	S	S	R	R	S	R	R
<b>Ertapenem</b>	S	S							
<b>Gentamicina</b>	S	S	R	S	R	R	S	R	R
<b>Imipinem</b>	S	S	S	S	I	S	S	S	S
<b>Levofloxacina</b>	I		S	S	R	R	S	R	R
<b>Meropenem</b>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<b>Nitrofurantóina</b>	R		R	R	R	R	R	R	R
<b>Norfloxacina</b>			S	S	R	R	S	R	R
<b>Piperaciclina/Tazobactan</b>	S	S	I	S	S	S	S	S	S



<b>Polimixina B</b>		R	R	R	R		
<b>Sulfametoxazol/Trimetropim</b>	R					S	R
<b>Tobramicina</b>	S						
<b>Trimetropim</b>		I	S	R	R		
<b>ESBL</b>		+		+	+	+	+



**Figura 14** – Resultado para detecção de  $\beta$ -lactamases de Espectro Ampliado feito com as quatro cepas testadas (para a cepa 578 o teste de detecção foi feito pelo Hospital Universitário da USP campus capital, onde esta foi coletada). O aumento da zona de inibição do antibiótico (indicado pelas setas) demonstra que o ácido clavulânico presente no disco central tem sinergismo com a antibiótico. O ácido clavulânico é um conhecido inibidor de  $\beta$ -lactamases e diminui a resistência de bactérias que usam  $\beta$ -lactamases como mecanismo de resistência a  $\beta$ -lactâmicos. Experimento feito pela aluna Fernanda Esposito do laboratório do Prof. Dr. Nilton Lincopan.

O teste de detecção de ESBL foi positivo para as 4 cepas inicialmente selecionadas, além da cepa 578 que teve a confirmação feita ainda no hospital. Dentre as 9 cepas de *P. mirabilis* portadoras do ICE, 5 possuem ESBL, mas ainda não se pode deduzir que o gene que codifica tal enzima esteja dentro do ICE SXT/R391. De qualquer modo, este pode contribuir com a disseminação de tal gene mesmo que esta se

encontre em outros elementos genéticos, já que ICEs SXT/R391, por apresentar toda a maquinaria de conjugação, podem eventualmente mobilizar outros elementos genéticos que não são capazes de realizar o processo de transferência sozinhos (BEABER; HOCHHUT; WALDOR, 2004; WOZNIAK; WALDOR, 2010).

#### 4.2.3 Ensaio de conjugação dos ICEs SXT/R391

O sucesso no processo de conjugação é de grande importância para que possam ser desenvolvidos experimentos de comparação entre cepas idênticas contendo e não contendo o elemento genético da família SXT/R391 para identificar que alterações ocorrem em uma cepa que apresenta uma ICE SXT/R391.

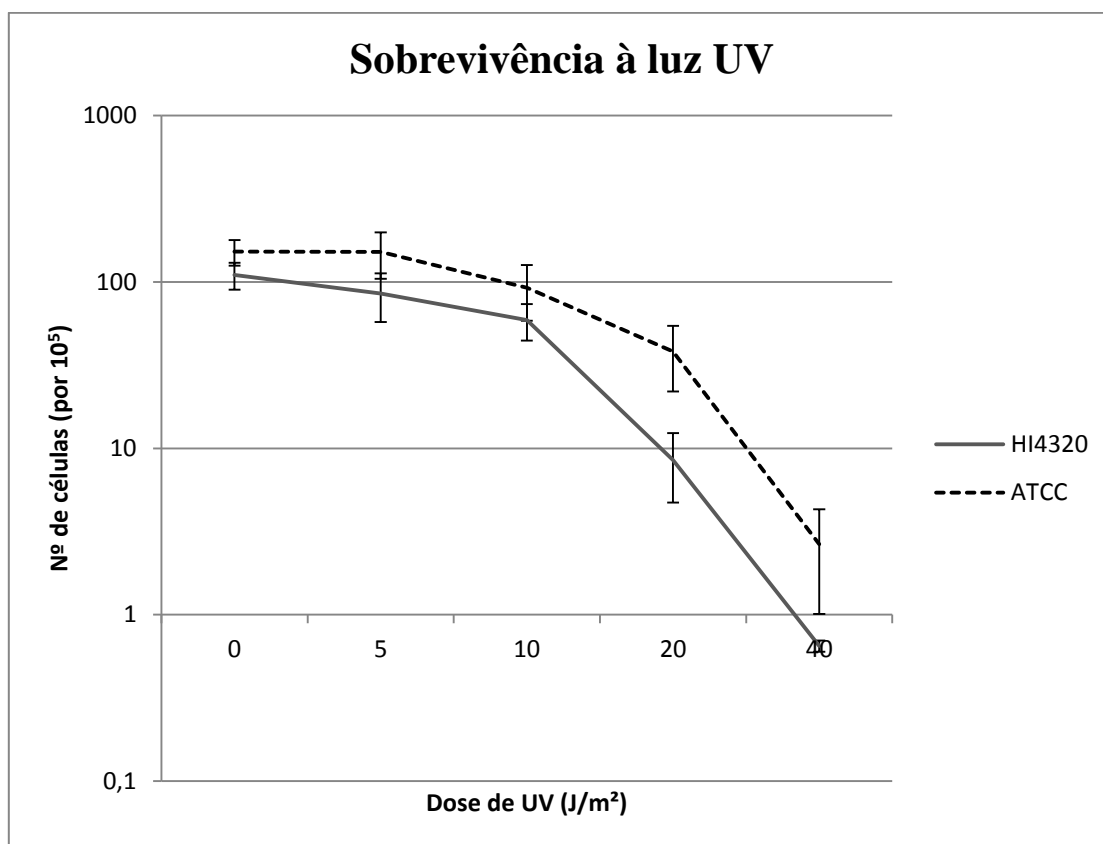
Os ensaios de conjugação foram realizados como descrito nos materiais e métodos. Durante todos os experimentos foi observado o crescimento bacteriano principalmente na seleção de transconjugantes resistentes à  $\beta$ -lactâmicos. O crescimento bacteriano apresentava a coloração correta para cepas de *E. coli* (cor-de-rosa) em ágar MacConkey, e os controles do experimento estavam corretos, em placa contendo somente rifampicina (100  $\mu\text{g/mL}$ ), colônias de *E. coli* (cor-de-rosa) eram observadas com apenas uma ou duas colônias mutantes espontâneas de *P. mirabilis*, e em placa contendo Tetraciclina (12,5  $\mu\text{g/mL}$ ), apenas colônias de *P. mirabilis* (de cor branca) eram observadas.

A posterior tentativa de isolar colônias do material bacteriano conjugado e selecionado na combinação de antibióticos mostrava que o resultado anterior era provavelmente um artefato do crescimento das duas bactérias dependendo dos mecanismos de resistência de cada antibiótico, pois não foi possível isolar uma colônia de *E. coli* proveniente da placa de seleção.

Devido ao insucesso dos experimentos de conjugação, buscamos testar a irradiação com luz UV, que sabidamente estimula a excisão e conjugação dos ICEs (BEABER; HOCHHUT; WALDOR, 2004; MCGRATH; O'HALLORAN; PEMBROKE, 2005)

Primeiramente, estabelecemos a curva de sobrevivência de *P. mirabilis* à luz UV. O resultado pode ser encontrado na Figura 15 onde a dose que permite mais de 20% de sobrevivência das linhagens de *P. mirabilis* é a de 10  $\text{J/m}^2$ , como observado na

Figura 15.



**Figura 15** – Gráfico mostrando a sobrevivência das cepas ATCC e HI4320 em resposta à exposição a diferentes doses de luz ultravioleta.

Os resultados da sobrevivência à luz UV mostram que a cepa HI4320 é mais sensível que a cepa ATCC. Na literatura, a presença do elemento genético R391 em cepas de *E. coli*, sensibiliza a bactéria em relação a exposição à luz UV, no entanto, experimentos similares ainda não foram feitos em *P. mirabilis* ou outros hospedeiros naturais de ICEs SXT/R391. No caso de *E. coli*, pesquisadores identificaram uma proteína codificada pela ORF 43 presente no ICE que tem expressão induzida após a exposição a UV, e quando expressa, a proteína age na membrana celular, rompendo-a (ARMSHAW; PEMBROKE, 2015; RYAN; ARMSHAW; PEMBROKE, 2016).

Assim como nos experimentos sem pré-exposição à luz UV, não obtivemos transconjugantes de *E. coli* contendo marcas de resistência dos diferentes isolados de *P. mirabilis*.

Outros trabalhos também indicaram que há uma dificuldade em realizar o processo de conjugação do ICE SXT/R391 (MCGRATH; O'HALLORAN; PEMBROKE, 2005).

A ausência de conjugação também pode indicar que as marcas de resistência encontradas em isolados de *P. mirabilis* portadores do ICE não estejam dentro de elementos genéticos transferíveis, como plasmídeos.

Planejamos realizar novamente os experimentos de conjugação usando um marcador diferente para a eliminação das cepas de *P. mirabilis* após o procedimento de conjugação. No momento obtivemos uma cepa de *E. coli* com marca de resistência à azida de sódio (NaN<sub>3</sub>) que age na enzima citocromo oxidase em bactérias gram-negativas.

A conjugação não pôde ser realizada a partir da cepa HI4320 portadora de ICE que apresenta genoma sequenciado e faz parte de nossa coleção, pois nesta não existe nenhuma marca de resistência a antibióticos dentro deste elemento genético (PEARSON et al., 2008). O sequenciamento dos ICEs nas linhagens brasileiras facilitaria o procedimento, pois assim saberíamos que antibióticos apresentam marcas de resistência no ICE, além de possivelmente esclarecer outros aspectos importantes da função e filogenia dos ICEs em isolados brasileiros de *P. mirabilis*.

É interessante ressaltar que os elementos genéticos móveis da família SXT/R391 não são encontrados naturalmente em isolados de *E. coli*, apesar desta espécie apresentar conservado o gene que é sítio de integração do ICE (5' terminal do gene *prfC*) como em *P. mirabilis*. De maneira intrigante, a inserção desse elemento genético no cromossomo de *E. coli* só foi observada até o momento em laboratório (POULIN-LAPRADE; CARRARO; BURRUS, 2015).

### **4.3 Análise por ERIC-PCR**

Realizamos a caracterização dos isolados através de teste com sequências ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*) por PCR. Sequências repetitivas intergênicas de enterobactérias são palíndromos imperfeitos de 127 pares de bases que são encontrados em várias cópias no genoma de enterobactérias e víbrios (WILSON; SHARP, 2006).

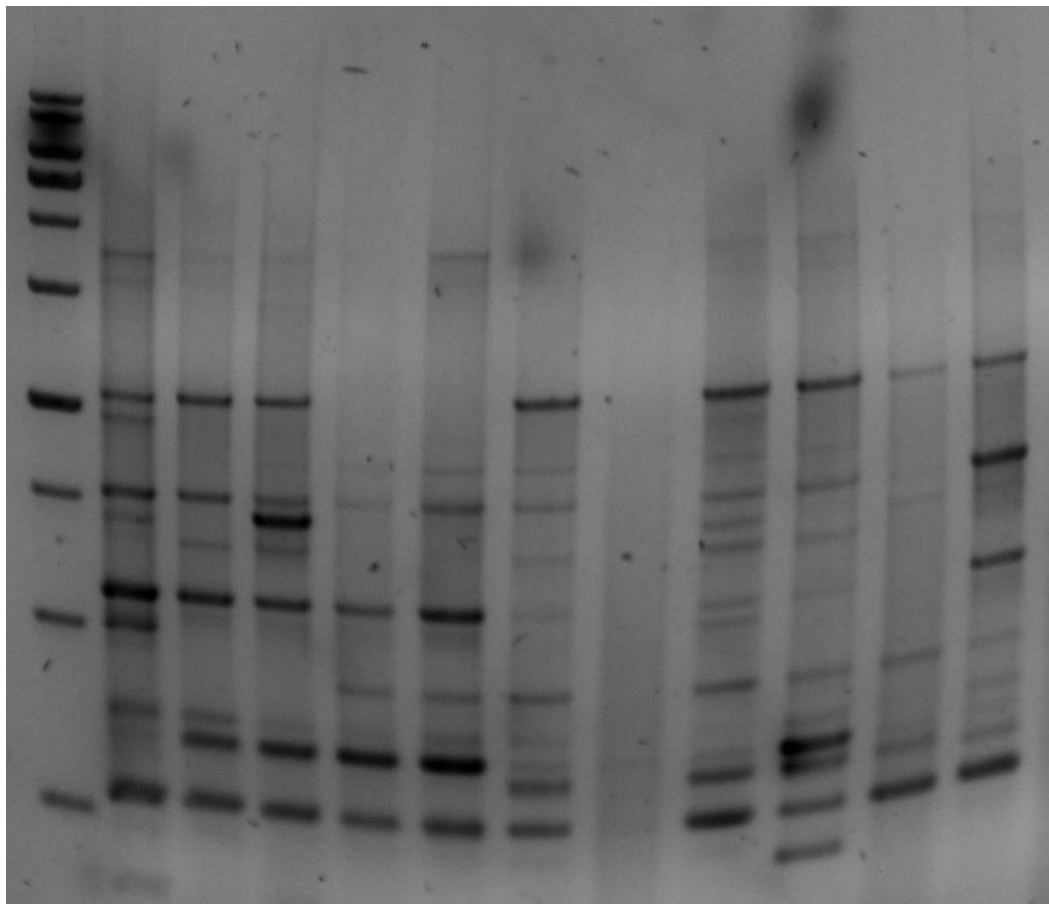
Essas sequências são encontradas apenas em regiões intergênicas e que não são transcritas, mas não se sabe ao certo como se originaram, ou quais as funções destas no genoma de bactérias. Exploram-se hipóteses, como por exemplo, a possível interferência dessas sequências em estruturas secundárias de RNA mensageiro alterando a estabilidade da molécula (BACHELLIER; CLÉMENT; HOFNUNG, 1999; LUPSKI; WEINSTOCK, 1992; NEWBURY et al., 1987; WILSON; SHARP, 2006).

As sequências ERIC são de grande interesse de estudo, não apenas para entender a existência destas, mas também por serem importantes ferramentas de *fingerprinting* de genomas bacterianos, possibilitando o estudo filogenético de grupos de isolados clínicos ou ambientais.

Em comparação com as técnicas mais laboriosas como Eletroforese em gel de campo pulsado e *ribotyping*, o ERIC-PCR se mostrou uma das melhores técnicas de *fingerprinting* baseadas em PCR para investigar a clonalidade de isolados clínicos de *P. mirabilis*, e quando em análise conjunta com a técnica de BOX-PCR, os resultados são tão confiáveis quanto nas técnicas supracitadas (MICHELIM et al., 2008).

O teste foi padronizado em PCR para distinguir sequências de enterobactérias diferenciando os isolados e evidenciando os que possam ter se originado de um mesmo clone. Em isolados clínicos de *P. mirabilis*, o teste ERIC-PCR se mostrou eficiente para determinar a disseminação de clones em uma coleção (MICHELIM et al., 2008).

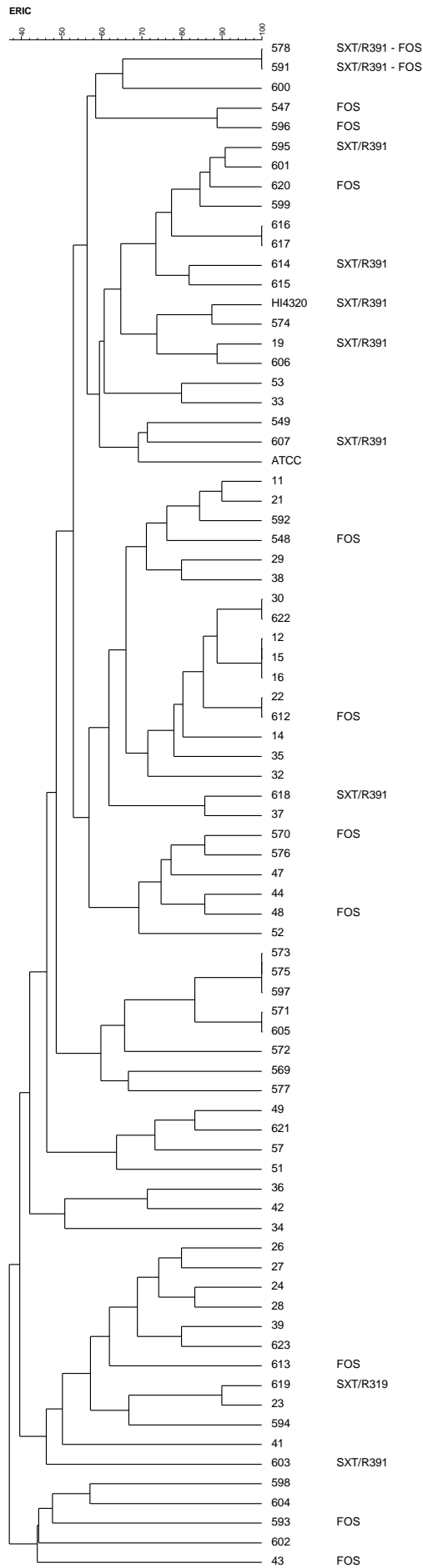
Na Figura 16, mostramos um exemplo do resultado obtido após a corrida em gel de agarose dos produtos obtidos após a amplificação por PCR.



**Figura 16** – Exemplo das fotos registradas para análise em fotodocumentador após corrida dos produtos de PCR em gel de agarose 1,5%. Na primeira coluna temos o marcador de peso molecular de 1 Kb (M1181/M1182 - Sinapse Inc).

Através do *software* BioNumerics, os géis do experimento de ERIC-PCR foram analisados pelo padrão de bandas com o coeficiente de similaridade de Jaccard e da análise de *clusters* UPGMA. O dendograma resultado da análise é encontrado na Figura 17 (MICHELIM et al., 2008).

Os resultados foram analisados em diversos aspectos, como por exemplo, entender a filogenia de ICEs no Brasil e a possibilidade dos isolados com alta frequência de mutantes Fos<sup>R</sup> fazerem parte de um mesmo grupo clonal, que deve apresentar 90% de similaridade no dendograma (MICHELIM et al., 2008; VAN BELKUM et al., 2007).



**Figura 17** – Resultado da filogenia encontrada através do teste de ERIC-PCR, obtida pelo *software* BioNumerics, usando o coeficiente de similaridade de Jaccard e a análise de *clusters* UPGMA. Foram indicados os isolados portadores de ICE (SXT/R391) e os isolados mutadores em fosfomicina (FOS).

#### 4.3.1 Filogenia de linhagens contendo ICEs SXT/R391

Avaliando as relações filogenéticas entre os isolados obtidas pelo teste de ERIC-PCR, vemos que os ICEs se distribuem de maneira característica de transferência horizontal e não vertical no dendograma obtido. Em geral, esse tipo de análise não costuma ser feita, pois os estudos sobre ICEs costumam analisar apenas as relações entre cepas contendo esse elemento, e não uma coleção geral de isolados da região. Assim, como outros pesquisadores já afirmaram, acreditamos que o sequenciamento de genoma completo de isolados clínicos de *P. mirabilis* é a melhor ferramenta para entender a distribuição dos elementos móveis em estudo, pois assim pode ser traçada uma filogenia de acordo com a sequência do elemento e confirmar a observação feita pelo nosso grupo (MAC AOGÁIN; ROGERS; CROWLEY, 2016).

De acordo com o dendograma da Figura 16, os ICEs parece se mover entre linhagens de *P. mirabilis*. É possível também que os elementos sejam eventualmente perdidos, o que explicaria a presença e a ausência destes elementos genéticos em linhagens pertencentes a um mesmo grupo.

Levando em conta que cepas com um grau de similaridade de 90% ou mais são clones (VAN BELKUM et al., 2007), é importante observar que existem linhagens com e sem ICE dentro de um mesmo grupo clonal, como é o caso das linhagens: 595, que é clone da linhagem 601, e a linhagem 619, que é clone da linhagem 23.

Como já foi dito, ensaiamos a realização da conjugação de cepas de *P. mirabilis* portadoras de ICEs da família SXT/R391 com uma cepa de *E. coli*, no entanto não obtivemos sucesso na seleção de transconjugantes, especialmente pela falta de informações moleculares que pudessem demonstrar se há uma marca de resistência no esqueleto do ICE que seja responsável pelo perfil do antibiograma dessas cepas.

Pretendemos tentar o experimento de conjugação com uma nova cepa de *E. coli*, mas tememos que a seleção continue prejudicada caso não existam marcas de resistência à antibióticos em nenhum dos ICEs detectados em nossa coleção.



Caso realmente não existam marcas que conferem resistência a antibióticos nos ICEs encontrados pelo nosso grupo no Brasil, a função e persistência de ICEs em linhagens de *P. mirabilis* devem ser pesquisadas, assim como a cepa HI4320 que apresenta um ICE SXT/R391 sem nenhuma marca de resistência. É interessante questionar a vantagem que a presença de um elemento genético de mais de 80 kb confere à célula que o carrega (PEARSON et al., 2008; WOZNIAK; WALDOR, 2010).

#### 4.3.2 Filogenia dos isolados com altas frequências de mutantes à fosfomicina

Para os isolados com altas frequências de mutantes para fosfomicina, também não observamos um agrupamento destes de forma que demonstre a descendência de uma linhagem específica que apresente a característica observada. Essa observação mostra que os eventos observados quanto a frequência de mutação em fosfomicina, não acontecem pela disseminação de uma clone com alta frequência de mutantes Fos<sup>R</sup>.

## 5 CONCLUSÕES

- Não encontramos isolados de *P. mirabilis* com fenotipo mutador clássico, caracterizado pelo aumento na frequência de mutação em dois marcadores distintos.
- Dos 18 isolados clínicos de *P. mirabilis* testados quanto à frequência de mutantes, 11 apresentaram frequências de mutantes condizentes resultados obtidos com cepas mutadoras e hiper-mutadoras, apenas para o marcador Fos<sup>R</sup>. Nenhum isolado apresentou frequência aumentada para o marcados Rif<sup>R</sup>.
- ICEs SXT/R391 foram encontrados em uma prevalência de 11,69% na coleção.
- Não foi encontrada nenhuma relação entre a presença de ICEs SXT/R391 e um aumento nas taxas de mutação dos isolados em estudo.
- De acordo com o experimento de ERIC-PCR, os ICEs da família SXT/R391 aparentemente apresentam disseminação vertical entre isolados clínicos no Brasil.
- O ERIC mostra que as linhagens com maior frequência de mutantes Fos<sup>R</sup> não apresentam um único clone.
- 5 das 9 linhagens portadoras de ICEs SXT/R391 carregam genes que codificam ESBLs.

## REFERÊNCIAS\*

- ABERKANE, S. et al. High prevalence of SXT/R391-related integrative 1 and conjugative elements carrying 2 bla<sub>CMY-2</sub> in *Proteus mirabilis* from gull isolates in the South of France. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, n. December, 2015.
- ARCA, P.; HARDISSON, C.; SUÁREZ, J. E. Purification of a glutathione S-transferase that mediates fosfomicin resistance in bacteria. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 34, n. 5, p. 844–848, maio 1990.
- ARMBRUSTER, C. E.; MOBLEY, H. L. T. Merging mythology and morphology: the multifaceted lifestyle of *Proteus mirabilis*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 11, p. 743–754, 2012.
- ARMSHAW, P.; PEMBROKE, J. T. Examination of the cell sensitizing gene orf43 of ICE R391 suggests a role in ICE transfer enhancement to recipient cells. **FEMS Microbiology Letters**, v. 362, n. 4, 2015.
- BACHELLIER, S.; CLÉMENT, J. M.; HOFNUNG, M. Short palindromic repetitive DNA elements in enterobacteria: A survey. **Research in Microbiology**, v. 150, n. 9–10, p. 627–639, 1999.
- BEABER, J. W.; HOCHHUT, B.; WALDOR, M. K. SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. **Nature**, v. 427, n. 6969, p. 72–74, 2004.
- BEN-AMI, R. et al. Heteroresistance to Fluconazole Is a Continuously Distributed Phenotype among *Candida glabrata* Clinical Strains Associated with In Vivo Persistence. **mBio**, v. 7, n. 4, 2 ago. 2016.
- BLÁZQUEZ, J. et al. Antimicrobials as promoters of genetic variation. **Current Opinion in Microbiology**, v. 15, n. 5, p. 561–569, 2012.
- CARRARO, N.; BURRUS, V. Biology of Three ICE Families: SXT/R391, ICEBs1, and ICES<sub>t1</sub>/ICES<sub>t3</sub>. **Microbiology spectrum**, v. 2, n. 6, p. 1–20, 2014.
- CASTAÑEDA-GARCÍA, A. et al. The glycerol-3-phosphate permease GlpT is the only fosfomicin transporter in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of bacteriology**, v. 191, n. 22, p. 6968–6974, 2009.
- COSTA, S. O. P. da. **Instabilidade Genética da Excreção de Protease (Gelatinase) em *Proteus mirabilis***. 238 f. Tese (Livre docência). Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo. 1978.
- DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, n. 3, p. 417–433, 2010.

\*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

- DENAMUR, E. et al. High Frequency of Mutator Strains among Human Uropathogenic *Escherichia coli* Isolates. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 2, p. 605–609, 2002.
- DENAMUR, E.; MATIC, I. Evolution of mutation rates in bacteria. **Molecular Microbiology**, v. 60, n. 4, p. 820–827, 2006.
- EL-HALFAWY, O. M.; VALVANO, M. A. Antimicrobial heteroresistance: an emerging field in need of clarity. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 1, p. 191–207, 2015.
- ELLINGTON, M. J. et al. Mutators among CTX-M B-lactamase-producing *Escherichia coli* and risk for the emergence of fosfomycin resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, n. 4, p. 848–852, 2006.
- ENGEL, H. et al. Heteroresistance to fosfomycin is predominant in *Streptococcus pneumoniae* and depends on the murA1 gene. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 6, p. 2801–2808, jun. 2013.
- FALAGAS, M. E. et al. Fosfomycin for the treatment of multidrug-resistant, including extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing, Enterobacteriaceae infections: a systematic review. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 10, p. 43–50, 2010.
- FRIEDBERG, E. C.; WALKER, G. C.; SIEDE, W. **DNA Repair and Mutagenesis**. Washington D.C., American Society for Microbiology Press, 1995. 698 p.
- FUKUI, K. DNA mismatch repair in eukaryotes and bacteria. **Journal of nucleic acids**, v. 2010, n. c, 2010.
- GARIBYAN, L. et al. Use of the *rpoB* gene to determine the specificity of base substitution mutations on the *Escherichia coli* chromosome. **DNA Repair**, v. 2, p. 593–608, 2003.
- GIRAUD, A. et al. Mutator Bacteria as a Risk Factor in Treatment of Infectious Diseases Mutator Bacteria as a Risk Factor in Treatment of Infectious Diseases †. **Society**, v. 46, n. 3, p. 13–16, 2002.
- GOODMAN, M. F.; WOODGATE, R. Translesion DNA Polymerases. **Cold Spring Harb Perspect Biol.**, v. 5, n. 10, p. 26, 2014.
- HOOTON, T. M. et al. Diagnosis, prevention, and treatment of catheter-associated urinary tract infection in adults: 2009 International Clinical Practice Guidelines from the Infectious Diseases Society of America. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 50, n. 5, p. 625–663, 2010.
- JACOBSEN, S. M. et al. Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n. 1, p. 26–59, 2008.
- JAROSZ, D. F. et al. Y-family DNA polymerases in *Escherichia coli*. **Trends in Microbiology**, v. 15, n. 2, p. 70–77, 2007.
- JOLIVET-GOUGEON, A. et al. Bacterial hypermutation: Clinical implications. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, n. 5, p. 563–573, 2011.

KARAGEORGOPOULOS, D. E. et al. Fosfomycin: evaluation of the published evidence on the emergence of antimicrobial resistance in Gram-negative pathogens. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 67, n. 2, p. 255–268, 2012.

KIMURA, M.; OHTA, T. Mutation and evolution at the molecular level. **Genetics**, v. 73, p. Suppl 73:19-35, abr. 1973.

KREUZER, K. N. DNA damage responses in prokaryotes: regulating gene expression, modulating growth patterns, and manipulating replication forks. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 5, n. 11, p. 1-23, 1 nov. 2013.

KULAEVA, O. I. et al. Characterization of the *umu*-complementing operon from R391. **Journal of bacteriology**, v. 177, n. 10, p. 2737–2743, 1995.

LECLERC, J. E. et al. High Mutation Frequencies Among *Escherichia coli* and *Salmonella* Pathogens. **Science**, v. 274, p. 1208–1211, 1996.

LEMIEUX, M. J.; HUANG, Y.; WANG, D. N. Crystal structure and mechanism of GlpT, the glycerol-3-phosphate transporter from *E. coli*. **Journal of Electron Microscopy**, v. 54, n. SUPPL. 1, p. 43–46, 2005.

LI, B. et al. Molecular analysis of mutS expression and mutation in natural isolates of pathogenic *Escherichia coli*. **Microbiology**, v. 149, p. 1323–1331, 2003.

LUPSKI, J. R.; WEINSTOCK, G. M. Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. **Journal of bacteriology**, v. 174, n. 14, p. 4525–4529, jul. 1992.

MAC AOGÁIN, M.; ROGERS, T. R.; CROWLEY, B. Identification of emergent bla<sub>CMY-2</sub>-carrying *Proteus mirabilis* lineages by whole-genome sequencing. **New Microbes and New Infections**, n. November 2013, p. 58–62, 2016.

MANDSBERG, L. F. et al. Antibiotic Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Strains with Increased Mutation Frequency Due to Inactivation of the DNA Oxidative Repair System. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 2483–2491, 1 jun. 2009.

MAO, E. F. et al. Proliferation of mutators in a cell population. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 2, p. 417–422, 1997.

MATA, C. et al. Prevalence of SXT/R391-like integrative and conjugative elements carrying bla<sub>C</sub> MY-2 in *Proteus mirabilis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. July, p. 2266–2270, 2011.

MATIC, I. et al. Highly variable mutation rates in commensal and pathogenic *Escherichia coli*. **Science (New York, N.Y.)**, v. 277, n. 5333, p. 1833–1834, 1997.

MCGRATH, B. M.; O'HALLORAN, J. A.; PEMBROKE, J. T. Pre-exposure to UV irradiation increases the transfer frequency of the IncJ conjugative transposon-like elements R391, R392, R705, R706, R997 and pMERPH and is *recA*<sup>+</sup> dependent. **FEMS Microbiology Letters**, v. 243, n. 2, p. 461–465, 2005.

MEAD, S. et al. Characterization of polVR391: A Y-family polymerase encoded by *rumA'B* from the IncJ conjugative transposon, R391. **Molecular Microbiology**, v. 63, n. January, p. 797–810, 2007.

- MICHAELS, M. L.; MILLER, J. H. The GO system protects organisms from the mutagenic effect of the spontaneous lesion 8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine). **Journal of bacteriology**, v. 174, n. 20, p. 6321–6325, out. 1992.
- MICHALOPOULOS, A. S.; LIVADITIS, I. G.; GOUGOUTAS, V. The revival of fosfomicin. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 11, p. 732-739, 2011.
- MICHELIM, L. et al. Comparison of PCR-based molecular markers for the characterization of *Proteus mirabilis* clinical isolates. **The Brazilian journal of infectious diseases**, v. 12, n. 5, p. 423–429, 2008.
- NEWBURY, S. F. et al. Stabilization of translationally active mRNA by prokaryotic REP sequences. **Cell**, v. 48, n. 2, p. 297–310, 30 jan. 1987.
- NEWTON, S. M. C.; COSTA, S. O. P. DA. High frequency of auxotrophy in clinical isolates of *Proteus mirabilis* harboring an R plasmid. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 17, n. 4, p. 358–364, 1994.
- NILSSON, A. I. et al. Biological Costs and Mechanisms of Fosfomicin Resistance in *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 9, p. 2850–2858, 2003.
- PEARSON, M. M. et al. Complete genome sequence of uropathogenic *Proteus mirabilis*, a master of both adherence and motility. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 11, p. 4027–4037, 2008.
- PICARD, B. et al. Mutator Natural *Escherichia coli* Isolates Have an Unusual Virulence Phenotype. **Infection and immunity**, v. 69, n. 1, p. 9–14, 2001.
- POULIN-LAPRADE, D.; BURRUS, V. A  $\lambda$  Cro-like repressor is essential for the induction of conjugative transfer of SXT/R391 elements in response to DNA damage. **Journal of Bacteriology**, n. October, p. JB.00638-15, 2015.
- POULIN-LAPRADE, D.; CARRARO, N.; BURRUS, V. The extended regulatory networks of SXT/R391 integrative and conjugative elements and IncA/C conjugative plasmids. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 837, jan. 2015.
- PUTNAM, C. D. Evolution of the methyl directed mismatch repair system in *Escherichia coli*. **DNA Repair**, v. 38, p. 32–41, 2016.
- RODRÍGUEZ-ROJAS, A. et al. Assessing the emergence of resistance: the absence of biological cost in vivo may compromise fosfomicin treatments for *P. aeruginosa* infections. **PloS one**, v. 5, n. 4, 2010.
- RYAN, M. P.; ARMSHAW, P.; PEMBROKE, J. T. SXT/R391 Integrative and Conjugative Elements (ICEs) Encode a Novel “Trap-Door” Strategy for Mobile Element Escape. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 829, 2016.
- SEDGWICK, S. G.; HO, C.; WOODGATE, R. Mutagenic DNA repair in enterobacteria. **Journal of bacteriology**, v. 173, n. 18, p. 5604–5611, set. 1991.
- SULLIVAN, N. L. et al. The Complete Genome Sequence of *Proteus mirabilis* Strain BB2000 Reveals Differences from the *P. mirabilis* Reference Strain. **Genome**

**announcements**, v. 1, n. 5, p. 643–644, 2013.

TENAILLON, O. et al. Mutators, population size, adaptive landscape and the adaptation of asexual populations of bacteria. **Genetics**, v. 152, n. i, p. 485–493, 1999.

TURRIENTES, M. C. et al. Normal Mutation Rate Variants Arise in a Mutator (Mut S) *Escherichia coli* Population. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, 2013.

VAN BELKUM, A. et al. Guideline for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. **Clinical Microbiology Infection**, v. 13, n. 3, p. 1–46, 2007.

WALSH, C. C. et al. In vitro pharmacodynamics of fosfomicin against clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 70, n. 11, p. 3042–3050, nov. 2015.

WENNER, J. J.; RETTGER, L. F. A Systematic Study of the Proteus Group of Bacteria. **Journal of bacteriology**, v. 4, n. 1889, p. 331–353, 1919.

WEN-PING, C.; TSONG-TEH, K. A simple and rapid method for the preparation of gram- negative bacterial genomic DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 21, n. 9, 1993.

WILSON, L. A.; SHARP, P. M. Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) sequences in *Escherichia coli*: Evolution and implications for ERIC-PCR. **Molecular Biology and Evolution**, v. 23, n. 6, p. 1156–1168, jun. 2006.

WOZNIAK, R. A. F.; WALDOR, M. K. Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. **Nature reviews. Microbiology**, v. 8, n. 8, p. 552–563, 2010.

WOZNIAK, R. A F. et al. Comparative ICE genomics: Insights into the evolution of the SXT/R391 family of ICEs. **PLoS Genetics**, v. 5, n. 12, 2009.

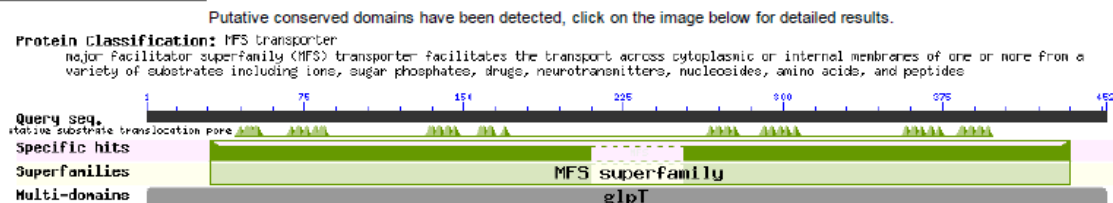
## ANEXOS

### A - BLAST

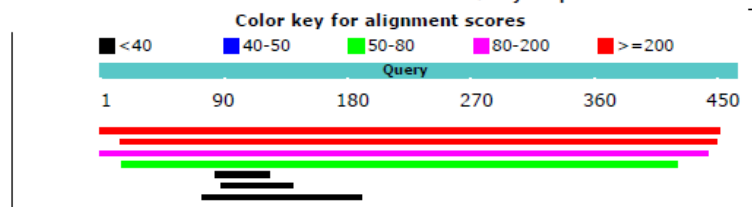
Para levantar hipóteses sobre a aquisição de resistência à Fosfomicina em *P. mirabilis*, realizamos BLAST dos genes que quando mutados ou inativados levam à resistência a fosfomicina para tentar supor se *P. mirabilis* realmente contem homólogos das duas proteínas que possibilitam o transporte de fosfomicina como visto em *E. coli* ou, como *Pseudomonas aeruginosa*, um desses transportadores é distinto e não realiza o transporte de fosfomicina para o interior da bactéria (CASTAÑEDA-GARCÍA et al., 2009; MICHALOPOULOS; LIVADITIS; GOUGOUTAS, 2011).

### GlpT:

#### Graphic Summary



#### Distribution of 7 Blast Hits on the Query Sequence



#### Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
MULTISPECIES: MFS transporter [Proteus]	777	777	99%	0.0	87%	<a href="#">WP_004245406.1</a>
MULTISPECIES: regulatory protein UhpC [Proteus]	229	229	95%	2e-71	32%	<a href="#">WP_012367500.1</a>
MULTISPECIES: MFS transporter [Proteus]	174	174	97%	2e-50	31%	<a href="#">WP_004245631.1</a>
MFS transporter [Proteus mirabilis]	51.6	51.6	88%	4e-08	23%	<a href="#">WP_004244297.1</a>
MULTISPECIES: aconitate hydratase [Proteus]	31.6	31.6	8%	0.11	41%	<a href="#">WP_004248112.1</a>
flagellar biosynthesis protein FlhA [Proteus mirabilis]	28.5	28.5	10%	1.0	37%	<a href="#">WP_004243546.1</a>
MULTISPECIES: multidrug transporter EmrD [Proteus]	28.1	28.1	25%	1.4	28%	<a href="#">WP_004246423.1</a>



## Alignments

MULTISPECIES: MFS transporter [Proteus]

Sequence ID: WP\_004245406.1 Length: 450 Number of Matches: 1

See 1 more title(s)

Range 1: 1 to 448

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
777 bits(2006)	0.0()	Compositional matrix adjust.	389/448(87%)	422/448(94%)	0/448(0%)	
Features:						
Query	1	MLSIKFPAPHKARLPAAEIDPTYRRLRWQIFLGIFFGYAAYLVLRKNFALAMPYLVVEQGF				60
Sbjct	1	MLS+FPAPHKARLP +IDP YRRLRWQIF+GIFFGYAAYLVLRKNFALAMPYLVVE+GF				60
Query	61	SRGDLGFALSGISIAYGFSKFIMGVSDRSNPRVFLPAGLILAAAVMLFMGFVPWATSSI				120
Sbjct	61	S+GDLGFALSGISIAYGFSKFIMGVSDRSNPRVFLPAGLILAAAVMLFMGFVPWATSSI				120
Query	121	AVMFVLLFLCGWFGMGWPPCGRTMVHWSQKERGGIVSVNCAHNVGGGIPPLFLLLGM				180
Sbjct	121	+MFVLLFLCGWFGMGWPPCGRTMVHWSQKERGGIVSVNCAHNVGGG+PPLFLLLGM				180
Query	181	AMFNDWHAALYMPAFCAILVALFAFAMMRDTPQSCGLPIIEEYKNDYPPDYNEKAEQELT				240
Sbjct	181	AMFNDW AALYMPAF AILVA+ AFA+MRDTPQSCGLPIIEEYKNDYPPDYNEKAEQELT				240
Query	241	AKQIFMQYVLPNKLWYIAIANVFVYLLRYGILDWSPYTLKEVKHFALDKSSWAYFLYEY				300
Sbjct	241	AK+IFM+YV PNKLLW IAIANVFVYLLRYG+LDWSPYTL+EVK FA+DKSSWAYFLYEY				300
Query	301	AGIPGTLGCGMMSDKVFRGNRGATGVFFMTLVTIATIVYWMNPAGNPTVDMICMIVIGFL				360
Sbjct	301	AGIPGTLGCGMMSDKVFGNRRGATGVFFMTLVTIATIVYWMNPAGNPTVDMICMIVIGFL				360
Query	361	IYGPVMLIGLHALELAPKKAAGTAAGFTGLFGYLGGSVAASAIVGYTVDFGWDGGFMVM				420
Sbjct	361	IYGPVMLIGLHALELAPKKAAGTAAGFTGLFGYLGGSVAASAIVGYTVDFGWDGGFMVM				420
Query	421	IGGSILAVILLIVVMIGEKRRHEQLLQE	448			
Sbjct	421	IGGS+L+V+LL++VMI E + ++ Q+				448

MULTISPECIES: regulatory protein UhpC [Proteus]

Sequence ID: WP\_012367500.1 Length: 445 Number of Matches: 1

See 1 more title(s)

Range 1: 6 to 431

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
229 bits(584)	2e-71()	Compositional matrix adjust.	139/435(32%)	220/435(50%)	13/435(2%)	
Features:						
Query	16	AAEIDPTYRRLRWQIFLGIFFGYAAYLVLRKNFALAMPYL-VEQGFSRGDLGFALSGISI				74
Sbjct	6	+A I+ TY R + L + GYA +YL RK+ MP + E +GD+G+ S +				65
Query	75	AYGFSKFIMGVSDRSNPRVFLPAGLILAAAVMLFMGFVPWATSSIAVMFVLLFLCGWFO				134
Sbjct	66	YG SKF+ G D+ R F+ AGL++ + + + S + ++ L G+FO				121
Query	135	GMGWPPCGRTMVHWSQKERGGIVSVNCAHNVGGGIPPLFLLLGMAWVN---DWHAALY				191
Sbjct	122	G GWPPC R + HW+S+ ERG +WN + N+GG PLL AW W AL				177
Query	192	MPAFCAILVALFAFAMMRDTPQSCGLPIIEEYKNDYPPDYNEKAEQELTAKQIFMQYVLP				251
Sbjct	178	+P I++ L+ ++ TP GLP + ++ D + E+ I + +L				237
Query	252	NKLLWYIAIANVFVYLLRYGILDWSPYTLKEVKHFALDKSSWAYFLYEYAGIPGTLGCGM				311
Sbjct	238	N+++W + + + +YLR I DW +L E L ++ L+E G+ G L GW				297
Query	312	MSDKVFRGNRGATGVFFMTLVTIATIVYWMNPAGNPTVDMICMIVIGFLIYGPVMLIGLH				371
Sbjct	298	SD +FRG R + F + IA W+ P + + C IGF ++GP MLIGL				357
Query	372	ALELAPKKAAGTAAGFTGLFGYLGGSVAASAIVGYTVDFGWDGGFMVMIGGSILAVILL				431
Sbjct	358	A E K AAGT G+ GL+ YLG ++A + + +GW G F+++ + L +LL				416
Query	432	IVVMIGEKRRHEQLL	446			
Sbjct	417	+ ++I + + E L+				431

## MULTISPECIES: MFS transporter [Proteus]

Sequence ID: WP\_004245631.1 Length: 445 Number of Matches: 1

See 1 more title(s)

Range 1: 1 to 441

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
174 bits(441)	2e-50()	Compositional matrix adjust.	140/454(31%)	225/454(49%)	28/454(6%)	
Features:						
Query 1	MLSIFKPAPHKARLPAA--EIDPTYRRLRWQIFLGIFFGYAAYLVLRKNFALAMPYLVEQ	58				
Sbjct 1	MLS FK + A+ +I Y++ +W0+FLG+ GYA +Y+VR + +++	60				
Query 59	GF-SRGLDGFALSGISIAYGFSKFIMGSVSDRSNPRVFLPAGLILAAAVMLFMGFVPWAT	117				
Sbjct 61	GIVTTAELGLMGSAFFFTYAFGKFSNGFLSDYANIGRFMSISLIASSFVICFMGM-----	115				
Query 118	SSIAVMFVLLF-LCGWFGMGWPPCGRTMVHWSQKERRGGIVSVNCAHNVGGGIPPLLF	176				
Sbjct 116	S+ ++ F+LL+ + GWFQ +G P ++ W+S K+RG + S+W + N+G I +L	175				
Query 177	LLGMANFNDWHAALYMPAFCAILVALFAMMRDTPQSCGLPPIEYKNDYPDDYNEKAE	236				
Sbjct 176	+++F W A I + +++D P++ GLP + +	234				
Query 237	QELTAKQIFMQYVLPNKLLWYIAIANVFYLLRYGILDWSPTYLKEVKHFALDKSSWAYF	296				
Sbjct 235	+E Q+F VL +W IA A +Y+ RY I W+ YL+ K +L + +A	291				
Query 297	LYEYAGIPGTLGCGMMSDKVFRGNRGA-TGVFFMTLVTIATIVYVMNPAGNPTVDMICMI	355				
Sbjct 292	Y AG G +L G SDK+F NR I ++ + + +++W P +D I +	349				
Query 356	VIGFLIYGPMV-LIGHLALELAPKKAAGTGLFGYLGGS----VAASAI-VGYTVD	409				
Sbjct 350	+IGF + G V+ L GL A +L PK A G GF GLF Y+ S V+AS I V D	409				
Query 410	FFGWDGGFMV----IGGSILAVILLIVMIGEK 439					
Sbjct 410	+D F + IG +I+++IL +V +K	441				

## MFS transporter [Proteus mirabilis]

Sequence ID: WP\_004244297.1 Length: 414 Number of Matches: 1

See 1 more title(s)

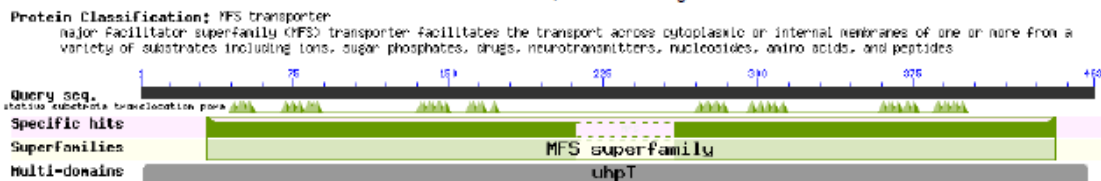
Range 1: 4 to 387

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
51.6 bits(122)	4e-08()	Compositional matrix adjust.	95/418(23%)	169/418(40%)	51/418(12%)	
Features:						
Query 17	AEIDPTYRRLRWQIFLGI--FFGYAAYLVLRKNFALAMPYLVEQG----FSRGLDGFALS	70				
Sbjct 4	A+++ + ++ + +L I FFG+ A Y R A+ P +V G ++ LG +S	60				
Query 71	GISIAYGFSKFIMGSVSDRSNPRVFLPAGLILAAAVMLFMGFVPWATSSIAVMFVLLFLC	130				
Sbjct 61	I Y G +D + L G++L + G +P + + MF + +	116				
Query 131	GWFGMGWPPCGRTMVHWSQKERRGGIVSVNCAHNVGGGIPPLLFLLGMWAFN-DWHAA	189				
Sbjct 117	G FOG + P + + N G I + + + W A	176				
Query 190	LYMPAFCAILVALFAMMRDTPQSCGLPPIEYKNDYPDDYNEKAEQELTAKQIFMQYV	249				
Sbjct 177	Y+ I++ L +++D P++ + + P+ K + +L K +F	226				
Query 250	LPNKLLWYIAIANVFYLLRYG--ILDWSPTYLKEVKHFALDKSSWAYFLYEYAGIPGT	306				
Sbjct 227	-----NINLAYITIFCSIYGFVLVTLPPYLETERTGITGTQISTIASLMPWFAIPGS	279				
Query 307	LLCGMMSDKVFRGNRGTGVFFMTLVTIATIVYVMNPAGNPTVDMICMIVIGFLIYGPMV	366				
Sbjct 280	LL W SDK+ R + ++LV I + P D + +++ ++YG V	330				
Query 367	LIGHLALELA-----PKKAAGTAAAGTGLFGYLGGSVAASAIVGYTVDFFG-WDGGF	417				
Sbjct 331	I + + +A P+ A GT+ G G L GSV A + G+ D G D GF	387				

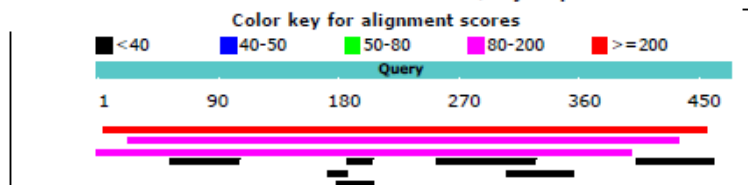
## UhpT:

### Graphic Summary

Putative conserved domains have been detected, click on the image below for detailed results.



Distribution of 10 Blast Hits on the Query Sequence



### Descriptions

Sequences producing significant alignments:

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
MULTISPECIES: MFS transporter [Proteus]	203	203	96%	1e-63	32%	<a href="#">WP_004245406.1</a>
MULTISPECIES: regulatory protein UhpC [Proteus]	160	160	88%	9e-48	31%	<a href="#">WP_012367500.1</a>
MULTISPECIES: MFS transporter [Proteus]	121	121	85%	2e-33	30%	<a href="#">WP_004245631.1</a>
NADH:ubiquinone reductase (Na(+)-transporting) subunit A [Proteus mirabilis]	26.9	26.9	15%	0.009	25%	<a href="#">WP_004244804.1</a>
MFS transporter [Proteus mirabilis]	24.3	24.3	10%	0.063	37%	<a href="#">WP_012367580.1</a>
MULTISPECIES: Na+/H+ antiporter NhaB [Proteus]	23.1	23.1	10%	0.15	28%	<a href="#">WP_004243275.1</a>
MULTISPECIES: beta-hydroxyacyl-ACP dehydratase [Proteus]	21.2	21.2	3%	0.41	44%	<a href="#">WP_004245462.1</a>
minor fimbrial subunit pmfE [Proteus mirabilis]	20.8	20.8	3%	0.73	50%	<a href="#">WP_004248451.1</a>
MULTISPECIES: Iron ABC transporter [Proteus]	17.7	17.7	5%	7.7	36%	<a href="#">WP_004248185.1</a>
MULTISPECIES: MFS transporter [Proteus]	17.7	17.7	12%	8.3	34%	<a href="#">WP_012367924.1</a>

### Alignments

MULTISPECIES: MFS transporter [Proteus]

Sequence ID: [WP\\_004245406.1](#) Length: 450 Number of Matches: 1

See 1 more title(s)

range 1: 10 to 444

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
203 bits(517)	1e-63()	Compositional matrix adjust.	145/454(32%)	227/454(50%)	24/454(5%)	
Features:						
Query	6	NQVRKPTLDLPLEVRRKMMFKPFMQSYLVVFIGYLTMYLRKRNFNIAQNDMISTYGLSMT	65			
Sbjct	10	++ R P + RR W Q ++ +F GY YL+RKNF +A ++ G S HKARLPKEQIDPVYRRLRW----QIFMGIFFGYAYYLVRKNFALAMPYLVEE-GFSKG	63			
Query	66	QLGMIGLGFSTITYGVGKTLVSYADGKNTKQFLPFMLLSAICML--GFSASMGSGSVSL	123			
Sbjct	64	LG G SI YG K++ ++D N + FLP LIL++I ML GF S S+ DLGFALSGISIAYGFSKIFMGFSFSDRANPRYFLPAGLILASIVMLIMGFVPWATS---SI	120			
Query	124	FLMIAFYALSGFFQSTGGSCSYSTITKWTPRRKRGTFLGFHNIHNLGGAGAAGVALFGA	183			
Sbjct	121	+M L G+FO G T+ W +++RG + MN +HN+GG + L G MIMFVLLFLCGWFQGMGWPPCGRTMVHWSQKERGGIVSIWNCANVGGGLPPLFLG	180			
Query	184	NYLFDGHVIGMFIFFPSIIALIVGFIGLRYGSDSPESYGLGKAEELFGEEISEEDKETEST	243			
Sbjct	181	+ D P+ A++V I D+P+S GL EE + + + KET+ AWFNWKK--AALYMPAFAAAILVAMIAFALMRDTPQSCGLPPIEE-YKNDYPPDYKETDEQ	237			
Query	244	DMTKKQIFVEYVVKNKVIWLLCFANIFLYVVRIGIDQWSTVYAFQELKLSKAVAIQGFSL	303			
Sbjct	238	++T +IF++YV NK++W++ AN+F+Y++R G+ WS Y + + + + L ELTAKEIFMKYVFPNKLWMIANVVFYLLRYGLVDWSPTYLREVKDFAMDKSSWAYFL	297			
Query	304	FEAGALVGTLLWGLSD-LANGRRGLVACIALALI-IATLGVYQH-ASNEYIYLASLAFAL	360			
Sbjct	298	+E + GTLL GN+SD + G RG + L+ IAT+ + + A N I +A + + YEYAGIPGTLLCGNMSDKVFKGNRGATGVFFMTLVTIATIVFWMNPAGNPINIDMACMLII	357			
Query	361	GFLVFGPQLLIGVAAVGVFPKKAIGAADGIKGTFAYLIGDSFAKLGLGMIADGTPVFGLT	420			
Sbjct	358	GFL++GP +LIG+ A+ PKKA G A G G F YL G A +G D GFLIYGPVMLIGLHALELAPKKAAGTAAGFTGLFGYLGGSVAASAIVGYTVD-----YF	411			
Query	421	GWAGTFAALDIAAIGCICLMAIVAVMEERIRRE	454			
Sbjct	412	GW G F + I + + + + + E K +RE GMDGGFMVM-IGGSVLSVLLIIVMINETKHKRE	444			

MULTISPECIES: regulatory protein UhpC [Proteus]

Sequence ID: WP\_012367500.1 Length: 445 Number of Matches: 1

See 1 more title(s)  
Range 1: 16 to 409

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
160 bits(406)	9e-48()	Compositional matrix adjust.	129/413(31%)	197/413(47%)	22/413(5%)	
Features:						
Query	24	WFKPFMQSYLVVFIGYLTMYLIRKNFNIAQNDMISTYGLSMTQLGMIGLGFSTITYGVGKT	83			
Sbjct	16	WRKNLMLS---MIIGYATFYLRKSVNFVMPVMTLHLDKGDIGWIASLFYLYGLSKF	72			
Query	84	LVSYYADGKNTKQFLPFMLILSAICMLGFSASMGSGSVSLFLMIAFYALSGFFQSTGGSC	143			
Sbjct	73	LSGIFHDQYGYRWFMGAGLVMTGVMNIIIFAYCL-----SFPALLLVWALNGFFQGWGWP	127			
Query	144	SYSTITKWTPRRKRGTFLGFWNISHNLGGAGAAGVALFGANYLFDGHVIGMFIFFPSIAL	203			
Sbjct	128	CARLLTHWYSRNERGFNMGWLNISINLGGMSIPLLTAWLATH-FSQI--ALVIPGLIGI	184			
Query	204	IVGFIGLRYGSDSPESYGLKAEELFGEIIEEDKETESTDMTKWQIFVEYVLKKNVIWL	263			
Sbjct	185	VMGLWLCMLKGTPAEEGL-PTVGWRRDIFELRQEQVSPSTPMLTKESILFNRMWIL	243			
Query	264	LCFANIFLYVVRIGIDQWSTVYAFQELKLSKAVAIQGFTLFEAGALVGTLLWGLSOLA-	322			
Sbjct	244	LGFSYLIYLRMAINDWGNWILSETHGANLLSANAILSLFEMGGLGALCSGWSGLLF	303			
Query	323	NGRRG-LVACIALALIIATLGVYQHASNEYIYLAS-LFALGFLVFGPQLLIGVAAGVFP	380			
Sbjct	304	RGQRAPMILLFSLGLFIAVTALWLMPIHHYALLAACFFSIGFFVFGPQLIGLAATEYCH	363			
Query	381	KKAIGAADGKGTFAYLIGDSFAKLGGLMIADGTPVFGTLGWAGTFAALDIAA	433			
Sbjct	364	KNAAGTVTYGLGLYAYL-GAAIAGWPL-----SQVMAHYGWTGMFVLLTSA	409			

MULTISPECIES: MFS transporter [Proteus]

Sequence ID: WP\_004245631.1 Length: 445 Number of Matches: 1

See 1 more title(s)  
Range 1: 1 to 389

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
121 bits(303)	2e-33()	Compositional matrix adjust.	126/423(30%)	196/423(46%)	60/423(14%)	
Features:						
Query	1	MLAFLNQVRKPTLDLPL-----EVRRKMWFKPFMQSYLVVFIGYLTMYLIRKNFNIAQN	55			
Sbjct	1	MLSFF-KTRK---DLPLIEASNEKIRSIYKKYQWQVFLGLVLGYAMFYVVRMALGVVKKP	56			
Query	56	MISTYGLSMTQLGMIGLGFSTITYGVGKTLVSYYADGKNTKQFLPFMLILSA-ICMLGFS	114			
Sbjct	57	MLDAGIVTTAELGLMGSAFFFTYAFGKFSNGFLSDYANIGRFMSISLIASSFVCIF----	112			
Query	115	SMGSGSVSLFLMIAFYALSGFFQSTGGSCSYSTITKWTPRRKRGTFLGFWNISHNLGGA-	173			
Sbjct	113	-MGMSASLFFIL-LWINGWFSVGSAPSCVSIQWFSKQKRGTVYSIWGGSRNIGAI	170			
Query	174	----GAAGVALFGANYLFDGHVIGMFIFFPSIALIVGFIGLRYGSDSPESYGLKAEELF	229			
Sbjct	171	TWILTATIVSFFGWRAFAGIAGIAAGIILLML-----KDRPRTYGLPDPASAY	222			
Query	230	GEEIIEEDKETESTDMTKWQIFVEYVLKKNVIWLLCFANIFLYVVRIGIDQWSTVYAFQE	289			
Sbjct	223	GEE-SEAVKSSDPKETRAQLFV---LKQPTVMIIAAACAAMYISRYAISWAVLY----	274			
Query	290	LKLSKAVAIQGFTLFEAG-----ALVGTLLWGLSD-LANRRGLVACIALALIIA	339			
Sbjct	275	LQGSK-----GYSLIDAGFAMSTYPIAGFFGAILAGMASDKLFNANRHIPTLIYGIANIA	329			
Query	340	TLGVY----QHASNEYIYLASL-FALGFLVFGPQLLIGVAAGVFPKKAIGAADGKGT	394			
Sbjct	330	GFALMFWGQSRVMDAIALSMIGFAMGGLV---FLAGLTACDLMKNAVGAVKGFIFGLF	386			
Query	395	AYL 397				
Sbjct	387	AYI 389				

**B - Miniprep de DNA cromossomal de bactérias gram-negativas**

Nucleic Acid Res. (1993), 21(9):2260

1. Inocular uma colônia da bactéria em 2 mL de meio de cultura apropriado e incubar *overnight*.
2. Transferir 1,5 mL da cultura para um microtubo e centrifugar por 3 minutos a 12.000 rpm.
3. Desprezar o sobrenadante e ressuspender o *pellet* em 400 µL de tampão de lise\* pipetando vigorosamente.
4. Adicionar 132 µL de uma solução de NaCl 5 M e vortexar (este procedimento permite a remoção de proteínas e debris celulares, a mistura fica viscosa).
5. Centrifugar por 10 minutos a 12.000 rpm a 4 °C.
6. Transferir o sobrenadante para um novo microtubo e adicionar volume de clorofórmio igual ao transferido.
7. Inverter o microtubo gentilmente pelo menos 50 vezes até a mistura ficar leitosa, sem separação de fases.
8. Centrifugar por 3 minutos a 12.000 rpm a 4 °C e transferir o sobrenadante para outro microtubo.
9. Adicionar volume igual ao transferido de uma solução fenol:clorofórmio (1:1) e vortexar.
10. Centrifugar por 3 minutos a 12.000 rpm a 4 °C e transferir o sobrenadante para outro microtubo.
11. Adicionar 1 mL de etanol 100% gelado, inverter o microtubo gentilmente.
12. Centrifugar por 10 minutos a 12.000 rpm a 4 °C e desprezar o sobrenadante.
13. Lavar o *pellet* com etanol 70% por duas vezes contrifugando por 5 minutos a 12.000 rpm e a 4 °C.
14. Desprezar o sobrenadante e secar o *pellet*.
15. Ressuspender o *pellet* em 50 µL de TE + RNase.
16. Estocar o DNA a -20 °C.

\*Tampão de lise: Tris-acetato 40 mM pH 7,8; Acetato de sódio 20 mM; EDTA 1 mM; SDS 1%.