Vinícius Godoy Cerezer

**Caracterização fenotípica e filogenética de isolados
nosocomiais e linhagens clínicas de *Stenotrophomonas
maltophilia***

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Pediatria

Orientador: Carlos Alberto Moreira-Filho

São Paulo

2013

Vinícius Godoy Cerezer

**Caracterização fenotípica e filogenética de isolados
nosocomiais e linhagens clínicas de *Stenotrophomonas
maltophilia***

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Pediatria

Orientador: Carlos Alberto Moreira-Filho

São Paulo

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Cerezer, Vinícius Godoy

Caracterização fenotípica e filogenética de isolados nosocomiais e linhagens clínicas de *Stenotrophomonas maltophilia* / Vinícius Godoy Cerezer. -- São Paulo, 2013.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Pediatria.

Orientador: Carlos Alberto Moreira-Filho.

Descritores: 1.*Stenotrophomonas maltophilia* 2.Tipagem de sequência multilocus 3.Filogenia

USP/FM/DBD-135/13

Dedico este trabalho aos meus pais, Sônia e Lino, pelo apoio, carinho, amor e, principalmente pelo exemplo de vida que me deram e me dão até hoje.

À minha avó Durçúlina (*in memorian*) pelo carinho, por todos os dias que cuidou de mim durante minha infância e pela sua fé, pedindo a Deus por mim todos os dias.

Aos meus irmãos, Cláudia e Renan, pelo incentivo e ombro amigo sempre que precisei.

À minha namorada, Bárbara, pelo amor, apoio e compreensão que teve comigo durante o meu curso de pós-graduação.

Aos amigos Maysa Miceno, Bruno Motta e Henrique Kurosaki, pelo incentivo e animo que me deram durante os últimos três anos.

À Patricia Locosque Ramos, pelos conselhos e pela amizade desde minha iniciação científica até os dias de hoje.

Aos amigos do LIM 36 e do Grupo de Citogenômica que animaram meus dias, dando-me força para trabalhar.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Carlos A. Moreira-Filho, pela orientação deste trabalho de mestrado e por ter me recebido em seu laboratório, inicialmente como bolsista de iniciação científica e depois como pós-graduando.

A Dra. Silvia Yumi Bando, pesquisadora do Laboratório de Genômica Pediátrica, Departamento de Pediatria da FMUSP, pela co-orientação deste trabalho e pelo auxílio na utilização de metodologias relativas aos estudos de caracterização molecular de bactérias.

À Dra. Patrícia Locosque Ramos, atualmente pós-doutoranda no Departamento de Biofísica da UNIFESP, com quem iniciei os estudos de caracterização molecular de bactérias.

À Dra. Márcia R. Franzolin, pesquisadora do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan, pela colaboração nos testes de fenotipagem das amostras de *S. maltophilia* utilizadas neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Waldir Elias Jr., Chefe do Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan, pelo apoio na realização deste trabalho.

Aos Profs. Dr. José Gregório C. Gomes e Heloísa Ramos Barbosa, do Departamento de Microbiologia do ICB-USP, e aos pós-doutorandos Rafael C. Santos Rocha (Departamento de Biofísica, UNIFESP) e Roberta C. R. Martins (ICB-USP), pelo auxílio nos testes de fixação de nitrogênio utilizados neste trabalho.

À Dra. Cecília Abe pela colaboração nos testes de adesão de *S. maltophilia* a células humanas.

Ao Sr. Leandro Rodrigues Ferreira, técnico do Laboratório de Genômica Pediátrica, pelo auxílio no sequenciamento das amostras de DNA utilizadas nos estudos filogenéticos.

À Thais Scudelletti, secretária do Laboratório de Investigação Médica em Pediatria Clínica, LIM-36, HC-FMUSP, pelo apoio administrativo durante a realização deste trabalho.

À Fernanda A. M. da Fonseca, biomédica do LIM-36, pelo apoio técnico na realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, pela concessão de bolsa de mestrado (processo nº 2010/04115-9).

Normatização Adotada

Esta dissertação está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação.

Referências: adaptação de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Araújo, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª Ed. São Paulo: Divisão de Bibliotecas e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Resumo

Cerezer, VG. Caracterização fenotípica e filogenética de isolados nosocomiais e linhagens clínicas de *S. maltophilia* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo; 2012.

O gênero *Stenotrophomonas* inclui doze espécies de bactérias Gram-negativas, não fermentadoras, que podem ser encontradas no ambiente. Até o presente, *S. maltophilia* é a única espécie com linhagens que são patógenos oportunistas em seres humanos. Essa espécie tem ganhado importância clínica por estar envolvida em um crescente número de infecções em pacientes imunodeprimidos e em UTI neonatais, apresentando altas taxas de morbimortalidade. Isolados ambientais e clínicos de *S. maltophilia* compartilham 85% de homologia genômica, podendo ser a diferença uma consequência da adaptação da bactéria aos diferentes nichos ecológicos em que é encontrada. Embora infecções e/ou colonizações por *S. maltophilia* aconteçam principalmente em ambiente nosocomial, diversos estudos têm mostrado um aumento do número de infecções de origem comunitária.

Neste estudo, isolados nosocomiais e linhagens clínicas de *S. maltophilia* foram fenotipados e comparados quanto ao seu perfil filogenético por *Multilocus Sequence Typing* (MLST). Na análise por MLST utilizaram-se os genes *atpD*, *gapA*, *guaA*, *nuoD*, *ppsA*, *recA* e *rpoA*, por serem genes constitutivos. O perfil filogenético mostrou alta variabilidade clonal, provavelmente refletindo o processo de adaptação de *S. maltophilia* ambientais a outros habitats. Verificou-se que dois subgrupos de isolados clínicos de *S. maltophilia* com grande homogeneidade filogenética apresentam recombinação intergrupos, indicando alta permissividade à transferência horizontal de informação genética, envolvida na resistência a antibióticos e na expressão de fatores de virulência. Mais ainda, para a maioria das amostras clínicas aqui estudadas, inferências filogenéticas podem ser feitas apenas com o uso do gene *ppsA*. Portanto, o

sequenciamento de apenas um fragmento específico para esse gene seria suficiente, em muitos casos, para determinar se a infecção por *S. maltophilia* foi causada por cepa já presente no ambiente nosocomial ou por bactérias de origem comunitária introduzidas nesse ambiente pela circulação de pessoas e materiais. Finalmente, foi possível mostrar que até mesmo isolados e linhagens clínicas filogeneticamente próximos não compartilham similaridade de perfil metabólico, o que indica sua origem comunitária.

Descritores: *Stenotrophomonas maltophilia*, Tipagem de Sequências Multilocus, filogenia.

Abstract

Cerezer, VG. Caracterização fenotípica e filogenética de isolados nosocomiais e linhagens clínicas de *S. maltophilia* [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo; 2012.

The genus *Stenotrophomonas* comprises twelve species of Gram-negative and non-fermentative bacteria, which can be found in the environment. The species *S. maltophilia* is the only one, until the present, that includes opportunistic pathogenic strains in humans. *S. maltophilia* gained clinical importance by being involved in an increasing number of infections in immunocompromised patients and in NICUs, with high rates of morbidity and mortality. Environmental and clinical isolates of *S. maltophilia* share around 85% of genomic homology and this difference may be a consequence of adaptation to the different ecological niches where *S. maltophilia* can be found. Although infection and/or colonization by *S. maltophilia* occur mainly in the nosocomial environment, several studies have shown a growing number of community-acquired infections.

In this study, nosocomial isolates and clinical strains of *S. maltophilia* were phenotyped and their phylogenetic profiles compared by using Multilocus Sequence Typing (MLST). In order to accomplish the MLST analysis the constitutive genes *atpD*, *gapA*, *guaA*, *nuoD*, *ppsA*, *recA* and *rpoA* were used. The resultant global phylogenetic profile showed high clonal variability, what correlates with the adaptability process of environmental *S. maltophilia* to other habitats. It was found that two clinical isolates subgroups of *S. maltophilia* with great phylogenetic homogeneity present intergroup recombination indicating the high permissibility to horizontal gene transfer, a mechanism involved in the acquisition of antibiotic resistance and expression of virulence factors. Moreover, for most of the clinical samples studied here, phylogenetic inferences can be made with the use of the gene *ppsA* only. Therefore, the sequencing of just one specific fragment of this gene would allow, in many cases, to determine whether the infection with *S. maltophilia*

was caused by a strain already present in the nosocomial environment, or by bacteria introduced from the community in this environment through the movement of people and materials. Finally, phenotyping data showed that even closely phylogenetic related nosocomial isolates and clinical strains do not share the same metabolic profile, thus indicating their community-acquired origin.

Descriptors: *Stenotrophomonas maltophilia*, Multilocus Sequence Typing, phylogeny.

SUMÁRIO

Resumo

Abstract

I) Introdução	13
I.1) O gênero <i>Stenotrophomonas</i>	13
I.2) <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> : um patógeno emergente e oportunista	14
I.3) Métodos moleculares para caracterização de isolados e linhagens de bactérias patogênicas	21
I.4) Caracterização molecular e filogenética de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	26
II) Objetivos	28
III) Material e Métodos	29
III.1) Isolados bacterianos, linhagens clínicas e linhagens de referência	29
III.2) Fenotipagem	31
III.3) Estudos filogenéticos	35
IV) Resultados	43
IV.1) Testes bioquímicos	43
IV.2) Resistência a antibióticos	43
IV.3) Detecção de gene <i>nifH</i>	46
IV.4) Análise filogenética por 16S rRNA	46
IV.5) Análise filogenética por MLST	48

IV.6) Análise filogenética incluindo linhagens ambientais de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	49
V) Discussão e conclusões.....	55
V.1) Análise filogenética.....	55
V.2) Background genético dos subgrupos B.I e B.III.....	56
V.3) Identificação molecular de isolados clínicos utilizando o gene <i>ppsA</i>	58
V.4) A investigação de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> como patógeno emergente.....	59
V.5) Perspectiva de trabalho futuro.....	59
VI) Anexos.....	61
VII) Referências Bibliográficas.....	106

I) INTRODUÇÃO

Stenotrophomonas maltophilia é um patógeno oportunista, multirresistente a drogas, de distribuição ubíqua, considerado não altamente virulento (Denton e Kerr, 1998; Pathmanathan e Waterer, 2005). No entanto, nas últimas décadas tem sido associado a infecções da corrente sanguínea e a infecções respiratórias em pacientes imunocomprometidos, com estudos reportando taxas brutas de mortalidade entre 14% e 69%, e de 26% em casos de bacteremia (Garcia Paez et al., 2008). Infecções causadas por *S. maltophilia* têm grande importância em hospitais pediátricos por causarem morbimortalidade elevada (taxas brutas de mortalidade ao redor de 40%) em crianças internadas em UTI e/ou imunodeprimidas (Wu et al., 2006). O tratamento dessas infecções é bastante difícil por essa bactéria ser resistente a um grande número de antibióticos comumente utilizados (Al-Jasser, 2006). Por outro lado, o tratamento de outras infecções com o uso inadequado de antibióticos carbapenêmicos ou aminoglicosídicos pode contribuir para subseqüentes infecções por *S. maltophilia* (Nyč e Matějková, 2010; Mutlu et al., 2011).

I.1) O gênero *Stenotrophomonas* – O gênero *Stenotrophomonas* foi proposto por Palleroni e Bradbury (1993) para acomodar linhagens patogênicas da espécie *Xanthomonas maltophilia*. Os autores verificaram que essas linhagens diferiam de outras do gênero *Xanthomonas* quanto a importantes características fenotípicas, tais como: tipo de flagelo, presença de fímbrias, natureza dos polissacarídeos extracelulares, capacidade de reduzir nitrato, resistência a antibióticos e associação com infecções em seres humanos. Essas diferenças deveriam se traduzir também em diferenças genômicas, certamente maiores do que a diversidade genômica compreendida por um gênero.

Atualmente o gênero *Stenotrophomonas* compreende 12 espécies: *S. maltophilia*, *S. nitritireducens*, *S. rhizophila*, *S. acidaminiphila*, *S. koreensis*, *S. terrae*, *S. humi*, *S. chelatiphaga* (Ryan et al., 2009), *S. ginsengilosi* (Kim et

al., 2010), *S. panachihumi* (Yi et al., 2010), *S. daejeonensis* (Lee et al., 2010) e *S. pavanii* (Ramos et al., 2011). Estudos fenotípicos e filogenéticos, além de análises da ecologia e do perfil metabólico deste gênero têm revelado mais diferenças ao nível de espécies (Ryan et al., 2009), levando a um aumento no número de espécies de *Stenotrophomonas* validamente descritas de 8 em 2009 para as 12 atuais.

O gênero *Stenotrophomonas* engloba bactérias Gram-negativas, não fermentadoras (Berg et al., 2005). Todas as espécies desse gênero podem ser encontradas no ambiente (principalmente em meio aquoso ou em associação com vegetais), sendo *S. maltophilia* frequentemente um membro dominante na comunidade microbiana encontrada em rizosfera ou nos tecidos internos de um grande número de plantas (Juhnke e des Jardin, 1989; Denton e Kerr, 1998; Berg et al., 1999; Berg et al., 2010), desempenhando papel importante na promoção do crescimento, controle de fitopatógenos (Dunne e Slater, 1998; Berg et al., 2005) e na fixação biológica de Nitrogênio (Park et al., 2005). Além da importância ambiental, *S. maltophilia* tem ganhado importância clínica nas últimas décadas, sendo a única espécie do gênero *Stenotrophomonas* encontrada no ambiente e como patógeno oportunista em seres humanos (Coenye et al., 2004; Ryan et al., 2009; Brooke, 2012).

De acordo com Ryan et al. (2009), os genomas de isolados ambientais e clínicos de *S. maltophilia* apresentam cerca de 85% de homologia genômica e têm a mesma organização estrutural, indicando que a diferença genômica pode refletir a adaptação de diferentes isolados a nichos específicos.

I.2) *Stenotrophomonas maltophilia*: um patógeno emergente e oportunista – *S. maltophilia* é um organismo de origem ambiental, encontrado em ambientes não clínicos, com multirresistência a drogas, cuja prevalência vem aumentando tanto em infecções de origem comunitária como nosocomiais, sendo comumente associado a infecções respiratórias (Brooke, 2012).

Nas últimas duas décadas, a espécie *S. maltophilia* tem sido crescentemente associada a infecções em pacientes imunocomprometidos (principalmente pacientes com câncer), em pacientes submetidos à ventilação mecânica, a antibioticoterapia de amplo espectro, a procedimentos invasivos, além de pacientes com doenças respiratórias, principalmente fibrose cística (Elting e Bodey, 1990; Denton e Kerr, 1998; Lai et al., 2004; de Vrankrijker et al., 2010; Czosnowski et al., 2011; Mutlu et al., 2011; Broke, 2012). As infecções por *S. maltophilia* têm grande importância em pacientes com pneumonia, causando cerca de 4,5% dos casos de pneumonia em pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) e 6,0% dos casos de pneumonia em pacientes com respiração assistida (Webber et al., 2007).

Diversos estudos mostram que a prevalência de infecções por *S. maltophilia* tem aumentado em pacientes com fibrose cística (FC). Com efeito, essa bactéria foi detectada em 11% dos pacientes do Centro Regional de Fibrose Cística em Nápoles, Itália, entre os anos de 2002 e 2004 (Lambiase et al., 2006) e em 7% dos pacientes com FC do Hospital Universitário de Catania, Itália, entre os anos 2004 e 2006 (Spicuzza et al., 2009). Situação similar foi verificada no Centro de Fibrose Cística de Utrecht (de Vrankrijker et al., 2010), onde a prevalência de infecções por *S. maltophilia* cresceu de 1,4% em 2002 para 10% em 2007.

Em um estudo sobre pneumonia com 217 pacientes que receberam transplantes de órgãos sólidos (rim, fígado, pâncreas), Bonatti et al. (2009) verificaram infecções por *S. maltophilia* em cerca de 7% dos casos. A infecção de vias respiratórias baixas é uma das principais causas de morte em pacientes transplantados. Na Universidade de Zheijang (China), verificou-se que *S. maltophilia* causou bacteremia em 48 dentre 323 pacientes submetidos a transplante de fígado entre 2003 e 2006 (Shi et al., 2009).

Finalmente, infecções oportunistas causadas por *S. maltophilia* têm grande importância em hospitais pediátricos por causarem morbimortalidade elevada (taxa bruta de mortalidade ao redor de 40%) em crianças internadas

em UTI e/ou imunodeprimidas (Wu et al., 2006). Nesses casos, o risco aumentado de infecção por *S. maltophilia* tem sido associado a procedimentos invasivos, hospitalização prolongada e antibioticoterapia de amplo espectro (Mutlu et al., 2011).

Infecções nosocomiais e comunitárias – Embora infecções e/ou colonizações por *S. maltophilia* aconteçam principalmente em ambiente nosocomial (Looney et al., 2009), diversos estudos têm mostrado um aumento do número de infecções de origem comunitária (Falagas et al., 2009). Em ambos os casos, os pacientes infectados por *S. maltophilia* são pessoas que apresentam algum grau de imunocomprometimento (Tseng et al., 2009). Consideram-se como os três principais fatores de predisposição para infecções por *S. maltophilia*: forte debilitação e/ou neutropenia, o uso de aparelhos de ventilação mecânica ou de cateter venoso central por tempo prolongado e o uso de antibióticos de amplo espectro (Lai et al., 2004; Ansari et al., 2007; Cheong et al., 2008).

S. maltophilia pode ser encontrada principalmente em meios aquosos ou úmidos. Assim, em ambientes hospitalares, ou de outros serviços de saúde (clínicas, centro de diagnósticos, etc.), este patógeno tem sido isolado em tubulações de sucção, cateteres, tubulações de máquinas de diálise, solução de infusão e reservatórios de água (Wilkinson e Kerr, 1998; Wang et al., 1999; Sakhnini et al., 2002; Arvanitidou et al., 2003). A capacidade de *S. maltophilia* de colonizar e multiplicar-se em superfícies abióticas (Teflon, vidro e plásticos) deve-se a sua capacidade de produzir biofilme, isto é, agregados de bactérias envolvidos por uma matriz extracelular (Denton et al., 1998; O'Donnell et al., 2005; Lai et al., 2006; Metan et al., 2006). Essa característica será discutida em maior detalhe no item “Mecanismos moleculares de patogenicidade”, adiante neste texto.

No meio ambiente *S. maltophilia* pode estar em diversos nichos, principalmente na rizosfera, folhas e caule de diversas plantas e em reservatórios e fontes de água potável e não potável (Ryan et al., 2009). A partir desses nichos a bactéria pode causar infecções comunitárias,

principalmente em pacientes imunocomprometidos (Hoefel et al., 2005; Falagas et al., 2009).

Por último, é preciso considerar que *S. maltophilia* pode ser encontrada em infecções associada a outros organismos. Em pacientes com FC, por exemplo, é comum a associação com *P. aeruginosa* e *B. cepacea* (LiPuma, 2000; Goss et al., 2002; LiPuma, 2003). Foi mostrado nesses pacientes que a infecção por *S. maltophilia* predispõe a infecções por *S. aureus*, embora sem impacto significativo na sobrevivência (Goss et al., 2002). No entanto, ainda são necessários mais estudos sobre essas coinfeções para um melhor entendimento das interações entre *S. maltophilia* e outros patógenos (Brooke, 2012).

Mecanismos de persistência e sobrevivência – Os mecanismos de persistência e sobrevivência de *S. maltophilia* incluem a capacidade de sobreviver em meios extremamente pobres em nutrientes, a tolerância a biocidas e a resistência a metais com propriedades antimicrobianas.

S. maltophilia é capaz de sobreviver em meios com poucos nutrientes – tais como, água potável, água ultrapura e água tratada – por meio da redução do custo energético do metabolismo formando ultra-microcélulas (Silbaq, 2009). Ultra-microcélulas (UMC) são formas reduzidas das células bacterianas, com níveis baixos de metabolismo, constituindo um mecanismo de sobrevivência durante períodos de estresse nutricional (Torrella e Morita, 1981; Bakken e Olsen, 1987). As UMC, assim como biofilmes bacterianos, podem passar através de filtros de água, o que permite a disseminação de *S. maltophilia* por meio de tubulações e reservatórios de água, tanto no ambiente comunitário como no nosocomial (Feazel et al., 2009).

S. maltophilia apresenta tolerância a diversos biocidas e soluções antissépticas, tais como SDS (dodecil sulfato de sódio) e triclosan (Ledder et al., 2006), além de soluções de assepsia para lentes de contato (Fuhurata et al., 2010). A bactéria também é capaz de apresentar tolerância a compostos quaternários de amônio graças a fatores de resistência integrados a seu genoma (Wang et al., 2008).

S. maltophilia também apresenta resistência a metais, principalmente compostos de prata, prata/platina, sulfadiazina de prata/clorexidina utilizados em cateteres centrais venosos e nitrato de prata, utilizado no tratamento de água potável (Raad et al., 2008; Hussain et al., 2009). O genoma de *S. maltophilia* tem grupos de genes que permitem que a bactéria absorva, estoque e excrete esses metais (Crossman et al., 2008).

Mecanismos moleculares de patogenicidade – Os mecanismos moleculares de patogenicidade de *S. maltophilia* envolvem a produção de biofilmes, multirresistência a antibióticos, produção de enzimas hidrolíticas, presença de lipopolissacarídeos na membrana externa e mecanismos para adesão e invasão da célula hospedeira.

Os biofilmes são constituídos por um agregado de bactérias aderidas uma as outras, as quais se encontram envolvidas por uma matriz extracelular composta por polissacarídeos e proteínas (Costerton et al., 1995; Donlan, 2002). Em *S. maltophilia* a produção de biofilme está associada à produção de uma fímbria específica, denominada Fímbria 1 (SMF-1). Na ausência da expressão de SMF-1, a adesão da bactéria a superfícies abióticas é muito comprometida (De Oliveira-Garcia et al., 2003).

A produção de biofilmes é um importante mecanismo de patogenicidade de um grande número de bactérias, sendo associada à cerca de 65% das infecções hospitalares (Potera, 1999). Fouhy et al. (2007) mostraram que em *S. maltophilia* a produção de biofilme é dependente de um fator de sinalização difusível célula-a-célula (*diffusion signal factor*, ou DSF). O uso de bloqueadores de DSF leva a diminuição da formação de biofilme. A produção de biofilme está associada aos processos de resistência a fagocitose e a antibióticos (Prince, 2002).

A multirresistência a antibióticos envolve mecanismos intrínsecos e adquiridos pela bactéria através da transferência genética horizontal de plasmídeos, integrons e transposons (Barbolla et al., 2004; Nyč e Matějková, 2010; Hu et al., 2011). Os mecanismos de resistência a antibióticos envolvem a produção de betalactamases, alteração na permeabilidade da membrana externa, sistemas de bombeamento de drogas (Nyč e Matějková,

2010) que são adquiridas principalmente via transferência horizontal de material genético, que contém genes de resistência a drogas. A facilidade com que *S. maltophilia* pode adquirir elementos genéticos de resistência a antibióticos e biocidas, mostra a relevância de se conduzirem estudos filogenéticos e do perfil de resistência em isolados clínicos, visando à identificação das origens da transmissão genética horizontal (ambiente ou hospital) e dos isolados com maior potencial patogênico (Brooke, 2012).

Diversos estudos têm mostrado que isolados clínicos de *S. maltophilia* apresentam atividade citotóxica contra células humanas e animais em cultura. A exposição de diferentes tipos de células (Vero, HeLa e HEp-2) a sobrenadantes de cultura de *S. maltophilia* resultou em endocitose, agregação celular e efeitos citotóxicos, incluindo perda de junções intracelular, *blebbing* de membrana e, finalmente morte celular (Figueirêdo et al., 2006). Além da capacidade hemolítica e citotóxica, alguns isolados de *S. maltophilia* apresentaram outros fatores de virulência incluindo atividade de protease, lipase e lecitinase (Figueirêdo et al., 2006). Essa capacidade de produzir fatores citotóxicos parece ser importante para a bactéria sobreviver no ambiente, principalmente na rizosfera e em tecidos vegetais (Huang et al., 2009). É interessante notar que a produção de elastase por *S. maltophilia* é um fator que exacerba a infecção pelo vírus da Influenza A em seres humanos e animais domésticos (Mancini et al., 2005). Isolados clínicos capazes de produzir elastase têm sido associados à infecção persistente em pacientes com FC (Di Bonaventura et al., 2007).

S. maltophilia produz lipopolissacarídeos (LPS) que participam da adesão da bactéria a paredes celulares e, também a superfícies abióticas. Alterações em LPS, em bactérias artificialmente mutadas, podem modificar a susceptibilidade da célula bacteriana a compostos antimicrobianos, tais como peptídeos catiônicos e aminoglicosídeos (McKay et al., 2003). Isso significa que o LPS participa dos mecanismos de resistência da bactéria a diferentes drogas. Essa resistência mediada por LPS é mais intensa a 30°C e diminui a 37°C, o que tem importância para o tratamento antimicrobiano (Rahmati-Bahram et al., 1997).

Finalmente, é preciso considerar que a aderência e invasão de células hospedeiras por *S. maltophilia* depende da formação de biofilmes e também da ação de flagelos, que auxiliam, por exemplo, na ligação ao muco traqueal (Di Bonaventura et al., 2007; Pompilio et al., 2010). Com efeito, a exposição da bactéria a anticorpos anti-flagelo diminui fortemente a adesão ao muco e esse efeito é dependente da concentração dos anticorpos (Zgair e Chhibber, 2011). Mutantes de *S. maltophilia* deficientes em flagelo mostram reduzida aderência a células bronquiais humanas (Pompilio et al., 2010).

Variabilidade genética – *S. maltophilia* é um patógeno oportunista com alta capacidade de resistência a estresses ambientais e com distribuição ubíqua. Essas capacidades estão ligadas a variabilidade genética apresentada por essa bactéria, que permite sua adaptação a diferentes nichos ambientais e a adesão e/ou invasão de tecidos de plantas, animais e seres humanos (Looney et al., 2009; Ryan et al., 2009). É sabido que *S. maltophilia* tem capacidade de adquirir fatores de resistência e virulência de outras bactérias ambientais (Sanchez et al., 2009; Brooke, 2012). Essa aquisição se dá por mecanismo de transferência genética horizontal (TGH), envolvendo tanto o genoma principal (*core genome*) como o genoma acessório da bactéria (Feng et al., 2007; Turner e Feil, 2007). Além da variação causada por esse tipo de recombinação genética, há também a variação clonal verificada em isolados clínicos e ambientais (Kaiser et al., 2009). Essa variação clonal detectada por técnicas baseadas na análise comparativa de polimorfismos de sequências nucleotídicas (tais como polimorfismos de fragmentos de restrição, RFLP; *Multilocus Sequence Typing*, MLST, discutidas na seção seguinte), mostra que a estrutura das populações de *S. maltophilia* inclui um grande número de grupos clonais, sendo possível distinguir, por meio do estudo da variabilidade nucleotídica, isolados ambientais e clínicos (Kaiser et al., 2009).

Para a identificação precisa de grupos clonais e seu papel nas infecções causadas por *S. maltophilia* é, portanto, necessário utilizar-se de técnicas de biologia molecular e de análise genômica. Algumas dessas

técnicas, por serem mais utilizadas em microbiologia clínica e estudos filogenéticos, serão descritas e comentadas a seguir.

I.3) Métodos moleculares para caracterização de isolados e linhagens de bactérias patogênicas – Antes do advento das técnicas moleculares para a classificação de microrganismos, a identificação de espécies e a diferenciação de linhagens e isolados de patógenos dependia da comparação criteriosa de características morfológicas e fenotípicas das amostras sob teste com as informações sobre as linhagens-tipo de diferentes bactérias encontradas em manuais de identificação bacteriológica (Clarridge, 2004). Com o avanço da biologia molecular, diversas técnicas foram desenvolvidas para a identificação e caracterização de microrganismos. Em geral, essas técnicas baseiam-se em polimorfismos enzimáticos ou de restrição, ou então na análise comparativa de sequências nucleotídicas.

Multilocus Enzyme Electrophoresis (MLEE) – Por meio dessa técnica é possível analisar variações polimórficas de diversas enzimas através de seus perfis eletroforéticos. Os isolados são caracterizados pela mobilidade eletroforética relativa de um grande número de enzimas celulares solúveis em água. A migração de cada proteína durante a eletroforese é determinada pela sua composição de aminoácidos. As variantes de mobilidade de uma enzima (alozimas) são diretamente relacionadas às variantes alélicas no gene estrutural correspondente a essa enzima. Isso permite que a MLEE detecte um número razoável de substituições de aminoácidos, que correspondem a variantes alélicas. No entanto, nem todas as substituições promovem mudanças de mobilidade eletroforética e, portanto, essa técnica não detecta todos os polimorfismos no DNA que diferenciam um conjunto de amostras sob estudo (Selander et al., 1986). Por essa razão, técnicas baseadas na detecção de diferenças nucleotídicas (ver adiante) acabaram por substituir a MLEE como metodologia de estudo de populações bacterianas.

Análise de sequência do gene 16S rRNA – Essa técnica baseia-se na análise comparativa de sequências nucleotídicas do gene 16S rRNA (Woese, 1987). Esse gene foi escolhido para estudos filogenéticos e de evolução em bactéria por: i) ser universal em bactéria; ii) abrigar regiões muito conservadas e outras mais variáveis, onde a taxa de variação nucleotídica pode ser estatisticamente correlacionada com a distância genética entre gêneros e espécies (Clarridge, 2004) e, em alguns casos, até mesmo entre variantes patogênicas e não-patogênicas de uma espécie (Berg et al., 1999); iii) servir para correlação com fenótipos de resistência a antibióticos, uma vez que o gene 16S rRNA é alvo de diversos antibióticos (Gould et al., 2006). As sequências de 16S rRNA já foram determinadas para um número muito grande de linhagens bacterianas e estão, em sua maioria, depositadas no GenBank® (Clarridge, 2004; Benson et al., 2012). Isso significa que se pode utilizar sequências previamente depositadas para a comparação com a sequência de um isolado não identificado.

Usualmente, sequências de 1500 pares de bases nucleotídicas (pb) são utilizados em comparações filogenéticas. No entanto, sequências mais curtas (500 pb) podem muitas vezes fornecer informações comparáveis. Para a geração de dendogramas e comparação de sequências existem diversos pacotes de *software* disponíveis (MEGA, Phylip, entre outros). Os métodos comumente utilizados para a construção de dendogramas são: NJ (*neighbor-joining method*), UPGMA (*unweighted pair group method with arithmetic averages*) e WPGMA (*weighted pair group method with arithmetic averages*) (Saitou e Nei, 1987; Waterman, 1995).

Embora análises de 16S rRNA tenham sido utilizadas para estudos taxonômicos e de identificação de bactérias, seu uso para propósitos epidemiológicos, ou de detecção de linhagens patogênicas com uma determinada característica de virulência, é inadequado. Como toda a variabilidade é medida para apenas um gene, não há variabilidade suficiente para estudos de caracterização de linhagens dentro de uma mesma espécie (Clarridge, 2004; Maiden, 2006; Kaiser et al., 2009).

Técnicas baseadas em amplificação aleatória de polimorfismos de DNA – Essas técnicas são conhecidas com RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*) e baseiam-se no uso de moldes com sequências randômicas de aproximadamente 10 bases nucleotídicas, os quais são utilizados para amplificar um grande número de sítios no genoma. Como diferentes amostras frequentemente diferem no número de sítios de inserção de um determinado iniciador randômico em seu genoma, o RAPD gera uma espécie de código de barras que caracteriza cada uma das amostras sob teste. Em nosso laboratório, essa técnica foi utilizada, entre outras aplicações, para diferenciar linhagens de *Shigella* e *E. coli* enteroinvasivas (Bando et al., 1998) e para estudar a relação genética de patótipos de *E. coli* diarreiogênica dentro do sorogrupo O de *E. coli* enteropatogênicas (Bando et al., 2007). Nazik et. al. (2007) lograram tipar por RAPD isolados de *P. aeruginosa* e *S. maltophilia* recuperados de pacientes com FC e correlacionar os padrões de RAPD com sensibilidade dessas bactérias a antibióticos. A principal limitação para aplicação da técnica RAPD em estudos epidemiológicos é a variabilidade dos resultados entre laboratórios (Meunier e Grimont, 1993; Lin et al., 1995).

Técnicas baseadas em polimorfismos de restrição – Essas técnicas são baseadas na detecção de polimorfismos de restrição, ou seja, sítios no DNA que, conforme sua sequência nucleotídica, são cortados ou não por determinadas enzimas de restrição. As principais técnicas utilizadas para a identificação de linhagens e isolados bacterianos são: i) análise do polimorfismo de tamanho do fragmento de restrição, ou RFLP (*restriction length fragment polymorphism*); ii) análise do polimorfismo de tamanho de fragmentos amplificados, ou AFLP (*amplified length fragment polymorphism*) e iii) eletroforese em campo pulsado, ou PFGE (*pulse field gel electrophoresis*).

A técnica de RFLP (Saiki et al. 1985) baseia-se na digestão do DNA genômico bacteriano das amostras a serem estudadas com enzimas de restrição. Os fragmentos resultantes dessa digestão são separados em gel de eletroforese e transferidos (técnica de *Southern blot*) para uma

membrana de nylon ou nitrocelulose. A membrana é então hibridizada com sondas de DNA derivadas de uma amostra tipo, gerando perfis de tamanhos de fragmentos resultantes da digestão, geralmente característicos de cada amostra sob estudo. Um polimorfismo de restrição é detectado quando há diferenças no tamanho do fragmento produzido pela restrição de duas amostras. Cada perfil de RFLP é considerado um perfil alélico e pode ser usado para análises genéticas. Essa técnica foi utilizada para identificar grupos genômicos no gênero *Stenotrophomonas* (Coenye et al., 2004).

A técnica de AFLP (Vos et al., 1995) combina os princípios da análise por RFLP com amplificação específica por PCR (*polimerase chain reaction*). O DNA genômico é usualmente cortado utilizando-se duas enzimas de restrição diferentes: uma delas com frequência média de corte e a outra com alta frequência de corte. Adaptadores para fita dupla são ligados aos terminos dos fragmentos de DNA gerando moldes para amplificação. As sequências dos adaptadores e dos sítios adjacentes de restrição servem como sítios de ligação nos moldes para subsequente amplificação dos fragmentos de restrição. Nucleotídeos seletivos são incluídos nos terminos 3' dos moldes de PCR, de tal forma que estes podem promover a síntese de DNA apenas a partir de um subconjunto de sítios de restrição. Serão amplificados apenas os segmentos de restrição nos quais os nucleotídeos que flanqueiam o sítio de restrição correspondem aos nucleotídeos seletivos. Variações entre diferentes isolados são detectadas por diferenças no número e localização do sítio de restrição no genoma de cada isolado. Essa técnica foi utilizada por Hauben et al. (1999) para estudar a diversidade genômica do gênero *Stenotrophomonas*.

A técnica de PFGE é usada para a separação e estudo comparativo de grandes fragmentos de DNA (de 50kb a 2Mb) obtidos por digestão com enzimas de restrição que possuem relativamente poucos sítios de corte no genoma e produzem fragmentos de grande tamanho. Os fragmentos são separados em gel de agarose que é pulsado por correntes elétricas que mudam de direção a intervalos constantes, fazendo com que os fragmentos de DNA se desloquem no gel (Schwartz et al., 1983). Essa técnica é

utilizada para fenotipagem e é considerada o padrão ouro para caracterização de isolados bacterianos dentro das metodologias de *fingerprinting* (Maiden, 2006).

Embora as técnicas baseadas em perfil de restrição permitam uma fina separação entre isolados bacterianos, elas exigem o uso de grandes quantidades de DNA, são bastante trabalhosas e dependem da identificação visual dos polimorfismos. Assim, elas servem para caracterizar um número reduzido de isolados (10 a 20), mas não são utilizáveis em estudos de larga escala. Para esses estudos também são necessários *softwares* para identificação de padrões, o que é muito custoso (Maiden, 2006). Outra limitação das técnicas baseadas na detecção de polimorfismos de restrição, ou de amplificação, visualizados por eletroforese é a baixa reprodutibilidade entre laboratórios (Maiden, 2006; Brooke, 2012).

A técnica de MLST – A técnica MLST (Maiden et al., 1998; Maiden, 2006) baseia-se na análise comparativa de sequências de fragmentos de genes constitutivos. Esses genes, por possuírem menor variabilidade nucleotídica, uma vez que controlam funções essenciais da célula, são verdadeiros relógios biológicos que servem para medir a distância genética entre espécies bacterianas (e de outros microrganismos) e entre isolados e linhagens de uma mesma espécie, permitindo inclusive a identificação de clones e grupos clonais (Turner e Feil, 2007; Kaiser et al., 2009).

A técnica de MLST apresenta grande uniformidade de resultados entre laboratórios por utilizar dados de sequenciamento de DNA. O poder discriminatório aumenta com o número de genes utilizados. Geralmente com sete genes já é possível obter-se a identificação de linhagens, permitindo estudos sobre estrutura de populações (clonalidade, transferência horizontal de genes) de microrganismos (Feil e Enright, 2004). Outra vantagem é que as sequências de nucleotídeos utilizadas em análises de MLST são depositadas em bancos públicos de sequência nucleotídicas e disponibilizados para acesso livre via *Web* (ver site PubMLST – <http://www.pubmlst.org>). Isso permite que sequências depositadas possam

ser acessadas e utilizadas para comparação com as sequências das amostras que estão sendo estudadas.

Para análise por MLST, fragmentos específicos para cada um dos genes constitutivos selecionados são amplificados e sequenciados para todos os isolados sob estudo. A partir dos dados obtidos através de sequenciamento utilizam-se programas computacionais para: i) obter as sequências consenso relativas aos fragmentos de cada amostra; e ii) alinhar e comparar as sequências para posterior construção de árvores filogenéticas para cada um dos genes (Saitou e Nei, 1987; Zhang e Sun, 2008). Para aumentar o poder discriminatório dessa análise, uma nova árvore filética é elaborada a partir da concatenação das sequências de todos os genes estudados. A partir da análise da topologia destas árvores são feitas inferências sobre a filogenia do grupo de isolados (Maiden et al., 1998; Maiden 2006; Kaiser et al., 2009).

Os genes escolhidos para análise por MLST fornecem um “panorama populacional” onde isolados que exibam genótipos MLST similares ou idênticos (agrupados em um único *cluster* em uma árvore filogenética) são considerados proximamente relacionados, ou seja, compartilham descendência recente de um ancestral comum. Isso não significa que linhagens ou isolados que exibam similaridade fenotípica, como resistência a drogas ou virulência, estejam na mesma situação, uma vez que essas características podem ser transferidas horizontalmente entre linhagens ou isolados não relacionados através de recombinação homóloga ou disseminação de elementos móveis no genoma (Turner e Feil, 2007). Como será visto nesse trabalho, é possível, em certas situações identificar por MLST grupos clonais que sofreram transferência horizontal de material genético.

I.4) Caracterização molecular e filogenética de *Stenotrophomonas maltophilia* – Estudos conduzidos por nosso grupo, no Centro de Pesquisas em Biotecnologia da USP e no Laboratório de Genômica Pediátrica do Departamento de Pediatria e LIM-36/HC-FMUSP,

mostraram que amostras ambientais e clínicas de *S. maltophilia* diferem pelo perfil de sequenciamento de nucleotídeos do gene 16rRNA. Além disso, verificou-se que as amostras clínicas não possuíam em seu genoma o gene *nifH*, importante para fixação biológica de Nitrogênio e comumente encontrado nas amostras ambientais (Cerezer et al., 2009).

A partir desses dados, foi iniciado um estudo para melhor caracterização dos isolados nosocomiais provenientes do HIAE. Estes isolados, todos provenientes de um mesmo hospital, sendo que 14 deles isolados em UTI, foram analisados comparativamente a linhagens clínicas de *S. maltophilia* de distintas fontes geográficas, quanto ao perfil genotípico de MLST, visando à identificação da variabilidade clonal existente entre amostras clínicas de *S. maltophilia*, e ao perfil metabólico utilizando-se de testes bioquímicos e de resistência a antibióticos, os resultados destas análises são apresentados no presente estudo. Também foram iniciados testes para a investigação de mecanismos associados à patogenicidade destas amostras, tais como teste de adesão a células em cultura, formação de biofilmes em superfícies abióticas e presença de possíveis fatores de virulência, em colaboração com o Laboratório de Bacteriologia do Instituto Butantan.

II) **OBJETIVOS**

O presente estudo teve como objetivos:

1. Caracterização filogenética de isolados nosocomiais e linhagens clínicas de *Stenotrophomonas* por meio da técnica de MLST;
2. Caracterização bioquímica e da resistência a antibióticos nesses isolados e linhagens;
3. Análise das relações de clonalidade entre os isolados e linhagens sob estudo e sua correlação com dados fenotípicos.

III) MATERIAL E MÉTODOS

III.1) Isolados bacterianos, linhagens clínicas e linhagens de referência – Foram realizadas as análises fenotípicas e filogenética de 29 isolados nosocomiais, 13 linhagens clínicas e de 5 linhagens-tipo do gênero *Stenotrophomonas* (**Tabela 1**). Os isolados nosocomiais foram obtidos de pacientes do Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE, São Paulo, Brasil, amostras gentilmente cedidas pelo Dr. Jacyr Pasternak), e destes, 14 foram provenientes de pacientes internados na Unidade de Terapia Intensiva. As linhagens clínicas são provenientes da coleção de cultura belga *Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms/ Laboratorium voor Microbiologie of Universiteit Gent* (BCCM/LMG, Gent, Bélgica, <http://bccm.belspo.be/index.php>), foram coletadas entre os anos de 1976 e 1995 e têm diferentes origens geográficas. Das 5 linhagens-tipo do gênero *Stenotrophomonas*, uma é proveniente da coleção de cultura alemã *Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* (DSMZ, Braunschweig, Alemanha) e 4 são provenientes da coleção de cultura BCCM/LMG.

Tabela 1 – Nomenclatura e origem dos isolados e linhagens estudados

Linhagem/isolado	Origem	Data de Isolamento
LMG 957	cultura de sangue humano	
LMG 10851	cultura de sangue humano	
LMG 10853*	secreção traqueal	
LMG 10857*	cultura de sangue humano	
LMG 10874*	cultura de sangue humano	
LMG 10877*	paciente com sinusite	
LMG 10989	bílis	
LMG 10991*	membro inferior infeccionado	
LMG 10992	secreção pulmonar	
LMG 11002	infecção mamária	
LMG 11004	urina	
LMG 11114	cultura de sangue humano	
LMG 22072	fluido cefalorraquidiano	
HIAE 1911	secreção traqueal	22/08/2005 ^U
HIAE 1990	secreção traqueal	29/08/2005 ^U
HIAE 1998	secreção traqueal	30/08/2005 ^U

HIAE 2229	secreção de dreno	24/09/2005
HIAE 2336	secreção traqueal	04/10/2005 ^U
HIAE 2425	secreção traqueal	17/10/2005 ^U
HIAE 2505	secreção de dreno	27/10/2005
HIAE 2737	secreção traqueal	21/11/2005 ^U
HIAE 2947	secreção traqueal	07/12/2005
HIAE 3182	secreção traqueal	29/12/2005
HIAE 3338	secreção traqueal	16/01/2006 ^U
HIAE 3369	cultura de sangue humano	19/01/2006
HIAE 3576	secreção traqueal	05/02/2006
HIAE 3673	lavado brônquico	15/02/2006
HIAE 3730	secreção traqueal	20/02/2006 ^U
HIAE 3808	secreção traqueal	06/03/2006 ^U
HIAE 4003	secreção traqueal	16/03/2006
HIAE 4249	secreção traqueal	03/04/2006
HIAE 4471	secreção traqueal	24/04/2006 ^U
HIAE 4500	secreção traqueal	28/04/2006 ^U
HIAE 4600	secreção traqueal	06/05/2006
HIAE 4638	secreção traqueal	10/05/2006
HIAE 4800	secreção traqueal	21/05/2006
HIAE 4920	secreção traqueal	29/05/2006 ^U
HIAE 4948	secreção traqueal	29/05/2006
HIAE 5124	secreção traqueal	12/06/2006 ^U
HIAE 5180	lesão no membro inferior	13/06/2006
HIAE 5188	secreção ocular	14/06/2006
HIAE 5399	secreção traqueal	03/07/2006 ^U
LMG 958 ^I <i>S. maltophilia</i>	necrose renal	
LMG 22073 ^I <i>S. acidaminiphila</i>	reator UASB	
LMG 22074 ^I <i>S. nitritireducens</i> *	biofiltro	
LMG 25348 ^I <i>S. pavanii</i>	cana-de-açúcar	
DSMZ 17805 ^I <i>S. koreensis</i> *	composto (palha + esterco)	

* Para o estudo por MLST destas amostras foram utilizadas algumas sequências gênicas depositadas no GenBank® (Benson et al., 2012) juntamente com as sequências obtidas em nosso laboratório. ^U Amostras coletadas na UTI do Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE).

Cultivo das linhagens e isolados – As linhagens e isolados bacterianos foram cultivados em meio líquido *Tryptic Soy Broth* (TSB, cat nº 211825, Difco Laboratories, Detroit, MI). Posteriormente essas amostras foram cultivadas em meio sólido *Tryptic Soy Agar* (TSA, cat nº 236950, Difco Laboratories, Detroit, MI) para a verificação de pureza e realização de teste de Gram, sendo subsequentemente preservadas em glicerol (10%, volume/volume) a -80°C.

III.2) Fenotipagem – Nesta seção é descrita a metodologia empregada para os testes bioquímicos, de resistência a antibióticos e de fixação de Nitrogênio, utilizados na caracterização fenotípica dos isolados e linhagens incluídos neste estudo.

Testes bioquímicos – Os testes bioquímicos foram realizados com a utilização do kit API 20 NE (cat. nº 20100, BioMérieux® AS, Marcy-l'Etoile, França), de acordo com as instruções do fabricante. As bactérias foram reativadas por meio da inoculação de 10 µl do estoque em glicerol, em 3 ml de meio líquido TSB, e posteriormente incubadas a 37°C por 24 horas. Após o período de crescimento em caldo, as bactérias foram repicadas em meio Agar MacConkey (Agar MacConkey, cat nº 212123, Difco Laboratories, Detroit, MI) e incubadas a 37°C por 24 horas. Após as 24 horas, 3 a 4 colônias foram suspendidas em solução salina 0,85% para a obtenção da concentração de 0,5 *McFarland* de bactérias na suspensão, de acordo com as instruções do kit *McFarland Standards* (cat. nº 70900, BioMérieux® AS, Marcy-l'Etoile, França). Essa suspensão foi utilizada para a inoculação dos testes API 20 NE.

A galeria do kit API 20 NE é composta por 19 cúpulas que contêm meios e/ou substratos desidratados de cada teste bioquímico, além de uma tira para teste de oxidase (**Tabela 2**). Os testes bioquímicos foram inoculados com a suspensão bacteriana salina que reconstituiu os meios. As reações que foram produzidas durante a incubação se traduzem em variações de coloração espontâneas ou reveladas mediante a adição de reativos.

Os 12 testes de assimilação (ver **Tabela 2**) foram inoculados com um meio mínimo onde as bactérias se multiplicam somente se forem capazes de utilizar o substrato correspondente. A leitura destas reações foi feita utilizando a Tabela de Leitura (**Tabela 2**) e a identificação do gênero/espécie foi realizada com o auxílio do programa de identificação api/web (<http://apiweb.biomerieux.com>). Na **Figura 1**, é mostrado o resultado final esperado para uma amostra pertencente à espécie *S. maltophilia*.

Tabela 2 – Tabela de leitura do teste API 20 NE.

TESTE	COMPONENTES ATIVOS/SUBSTRATOS	REAÇÕES/ENZIMAS	RESULTADOS	
			NEGATIVO	POSITIVO
NO3	Nitrato de Potássio	redução de Nitrato a Nitrito	<u>NIT 1 + NIT 2 / 5min</u>	
			incolor	rosa-vermelho
		redução de Nitrato a Azoto	<u>Zn / 5min</u>	
			rosa	Incolor
TRP	L-triptofano	formação de indol (triptofano)	<u>JAMES / imediato</u>	
			incolor/ verde claro / amarelo	Rosa
<u>GLU</u>	D-glucose	Fermentação (glucose)	azul / verde	Amarelo
<u>ADH</u>	L-arginina	arginina DiHidroxilase	amarelo	laranja/ rosa/ vermelho
<u>URE</u>	Ureia	Urease	amarelo	laranja/ rosa/ vermelho
ESC	Esculina citrato de ferro	hidrólise (β -glucosidase esculina)	não há difusão do pigmento	difusão do pigmento negro
GEL	Gelatina (origem bovina)	hidrólise (protease gelatina)	incolor	Amarelo
PNPG	4-nitrofenil- β D-galactopiranosido	β -galactosidase (para-nitrofenil β D-galactopiranosidase)	incolor	Amarelo
<u>GLU</u>	D-glucose	assimilação (glucose)	transparência	Turvo
<u>ARA</u>	L-arabinose	assimilação (arabinose)	transparência	Turvo
<u>MNE</u>	D-manose	assimilação (manose)	transparência	Turvo
<u>MAN</u>	D-manitol	assimilação (manitol)	transparência	Turvo
<u>NAG</u>	N-acetil-glucosamina	assimilação (N-acetil-glucosamida)	transparência	Turvo
<u>MAL</u>	D-maltose	assimilação (maltose)	transparência	Turvo
<u>GNT</u>	potássio gluconato	assimilação (potássio gluconato)	transparência	Turvo
<u>CAP</u>	ácido caprato	Assimilação (ácido caprato)	transparência	Turvo
<u>ADI</u>	ácido adipato	Assimilação (ácido adipato)	transparência	Turvo
<u>MLT</u>	ácido malato	assimilação (ácido malato)	transparência	Turvo
<u>CIT</u>	citrato de trissódio	assimilação (citrato de trissódio)	transparência	Turvo
<u>PAC</u>	ácido fenil-acetato	assimilação (ácido fenil-acetato)	transparência	Turvo
OX	citocromo-oxidase		sem alteração de cor	Roxo

Figura 1 – Padrão esperado ao final do teste API 20 NE de uma bactéria pertencente à espécie *S. maltophilia*.

Teste de fixação de Nitrogênio – A fixação de Nitrogênio foi determinada por meio do teste padrão descrito por Turner e Gibson (1980). Frascos inoculados com culturas puras foram injetados com acetileno (20% do volume do frasco) e incubados a 30°C por 24h. A redução do acetileno (ARA), que indica a fixação de Nitrogênio, foi detectada por cromatografia gasosa conforme Liba et al. (2006).

Antibiograma – O padrão de sensibilidade dos isolados de *Stenotrophomonas* a diferentes antibióticos foi realizado através do teste de susceptibilidade com discos (Bauer et al., 1966), utilizando-se crescimento bacteriano em meio TSA e discos Cefar de antibióticos (Cefar Diagnóstica Ltda, São Paulo, Brasil) dos seguintes antimicrobianos nas concentrações correspondentes: amoxicilina + ácido clavulânico, 30 µg (AMC); aztreonama, 30 µg (ATM); ceftazidima, 30 µg (CAZ); cefotaxima, 30 µg (CTX); ciprofloxacina, 5 µg (CIP); cloranfenicol, 30 µg (CLO); cotrimoxazol (sulfametoxazol e trimetoprima), 25 µg (SUT); imipenem, 10 µg (IPM); levofloxacina, 5 µg (LVX); meropenem, 10 µg (MER); tetraciclina, 30 µg (TET) e tobramicina 30 µg (TOB).

Para esse teste, as bactérias foram reativadas por meio da inoculação de 10 µl do estoque em glicerol em 3 ml de meio líquido TSB e posterior incubação a 37°C por 24 horas. Após essa incubação, as amostras foram repicadas em meio TSA e novamente incubadas a 37°C por 24 horas. Após esse período, 3 a 4 colônias foram suspendidas em solução salina 0,85% para obtenção da concentração 0,5 *McFarland* de bactérias na suspensão de acordo com as instruções do kit *McFarland Standard*. Essa solução contendo bactérias foi repicada em placa de meio Ágar Muller-Hinton com o auxílio de uma haste com algodão na ponta. Após o repique da amostra, os

discos de antibióticos foram posicionados na placa como mostrado na **Figura 2** e as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Ao final das 24 horas os halos de inibição de crescimento foram medidos e comparados com os dados da Tabela Padrão para interpretação de halos de Inibição (**Tabela 3**).

Para validação do meio Ágar Muller-Hinton, o teste de sensibilidade a diferentes antibióticos também foi realizado com as cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Tabela 3 – Tabela Padrão para interpretação de halos de inibição, mostrando os antibióticos utilizados neste estudo.

Antibacterianos	Resistente (mm)	Intermediário (mm)	Sensível (mm)	<i>S. aureus</i> ATCC 25923 (mm)	<i>E. coli</i> ATCC 25922 (mm)	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853 (mm)
Amoxicilina + Ac. Clavulânico (AMC) (20µg /10µg)	≤ 13	14-17	≥ 18	28-36	19-25	-
Aztreonama (ATM) (30µg)	≤ 15	16-21	≥ 22	-	28-36	23-29
Cefotaxima (CTX) (30µg)	≤ 14	15-22	≥ 23	25-31	29-35	18-22
Ceftazidima (CAZ) (30µg)	≤ 14	15-17	≥ 18	16-20	25-32	22-29
Ciprofloxacina (CIP) (5µg)	≤ 15	16-20	≥ 21	22-30	30-40	25-33
Cloranfenicol (CLO) (30µg)	≤ 12	13-17	≥ 18	19-26	21-27	-
Imipenem (IPM) (10µg)	≤ 13	14-15	≥ 16	-	26-32	20-28
Meropenem (MER) (10µg)	≤ 13	14-15	≥ 16	29-37	28-34	27-33
Levofloxacina (LVX) (5µg)	≤ 13	14-16	≥ 17	25-30	29-37	19-26
Cotrimoxazol (SUT) (25µg)	≤ 10	11-15	≥ 16	24-32	24-32	-
Tobramicina (TOB) (30µg)	≤ 12	13-14	≥ 15	19-28	18-25	19-25
Tetraciclina (TET) (30µg)	≤ 11	12-14	≥ 15	24-30	18-25	18-25

Figura 2 – Placa utilizada para o teste de resistência a antibióticos com discos Cefar de antibióticos posicionados e inoculo bacteriano já aplicado. As siglas indicam os diferentes antibióticos usados no teste.

III.3) Estudos Filogenéticos

Extração do DNA genômico – Para extrair-se o DNA genômico das amostras bacterianas foi utilizado o *Wizard Genomic DNA Purification Kit*, (cat. nº A1120, Promega Corporation, Madison, WI), conforme as instruções do fabricante. A qualidade e a concentração do DNA foram verificadas por meio de eletroforese em gel de agarose 1,0%, corado com brometo de etídio e visualizado em luz UV.

Deteção do gene *nifH* – Esse teste para detecção do gene *nifH*, envolvido na fixação do nitrogênio, foi realizado para os isolados

provenientes do HIAE. As reações de amplificação para um fragmento do gene *nifH* foram realizados com o uso dos iniciadores PPf (5' GCAAGTCCACCACCTCC 3') e PPr (5' TCGCGTGGACCTTGTTG 3'), descritos em Ramos et al. (2011). O volume final da reação foi de 25 µl, contendo 1X *TaqDNA polymerase buffer*, 1,5 mM de MgCl₂, 2 U de *TaqDNA polymerase* (cat. nº 11615-010, Invitrogen, Carlsbad, CA), DNA genômico variando de 30 a 50 ng e água para ajustar o volume final. A reação de amplificação (*polymerase chain reaction* – PCR) foi realizada durante 45 ciclos com as seguintes temperaturas: desnaturação do DNA a 95°C/4 minutos, anelamento a 56°C/1 minuto e extensão a 72°C/2 minutos. Foi feita uma extensão final a 72°C/3 minutos.

Análise de sequência do gene 16S rRNA – Essa análise serviu à construção de uma árvore filogenética para identificação inicial (gênero e proximidade taxonômica) dos isolados e linhagens incluídos neste estudo (Clarridge, 2004). Primeiramente foi feita a amplificação de um fragmento de 1498 pb do gene 16S rRNA com o uso dos iniciadores universais B27F (5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3') e 1525R (5' AAGGAGGTGWTCCARCC 3'). O volume final da reação foi de 50 µl, contendo 1,5X *TaqDNA polymerase buffer*, 1,5 mM de MgCl₂, 2 U de *TaqDNA polymerase*; dNTPs (200 µl); DNA genômico (30-50 ng) e iniciadores (0,3 µM). A reação de PCR foi realizada durante 30 ciclos com as seguintes temperaturas: desnaturação do DNA a 94°C/2 minutos; anelamento a 51°C/1 minuto e extensão a 72°C/3 minutos. Foi feita uma extensão final a 72°C/10 minutos. Posteriormente, os produtos da PCR para o fragmento de 1.49 Kb do gene 16S rRNA foram purificados com o *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (cat. nº 27-9034-71, GE Healthcare, Buckinghamshire, Inglaterra), seguindo instruções do fabricante.

Subsequentemente, o produto purificado da amplificação foi sequenciado seguindo as instruções do *DYEnamic™ ET dye terminator kit MegaBACE™ 1000* (cat. nº US81090, GE Healthcare, Buckinghamshire, Inglaterra): 5 µl do produto da PCR do gene 16S rRNA purificado, 1 µl de iniciador e 4 µl do kit *DYEnamic™ ET dye terminator kit MegaBACE™ 1000*.

Foram realizadas duas reações de sequenciamento para cada amostra, uma com o iniciador B27F e outra com o iniciador 782R (5' ACCAGGGTATCTAATCCTGT 3') (Chun, 1995). As temperaturas da reação de sequenciamento foram 95°C/20 segundos, 55°C/15 segundos e 60°C/60 segundos, sendo esse ciclo repetido 30 vezes. Os dados brutos gerados tiveram sua qualidade analisada no programa Chromas Pro versão 1.45 (Technelysium Pty Ltd, <http://www.technelysium.com.au/chromas.html>), no qual foram geradas sequências consenso a partir das duas sequências obtidas para cada amostra. Após obtenção das sequências consenso para cada amostra, todas com 575 pb de tamanho, estas foram exportadas no formato FASTA, formatação utilizada para interferência filogenética a partir do programa MEGA4 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*, Tamura et al., 2007).

Com o auxílio do programa MEGA4 foi gerado um filograma para as sequências do gene 16S rRNA das amostras, utilizando-se o método de *Neighbor-joining* (Saitou e Nei, 1987; Zhang e Sun, 2008). O método de *Neighbor-joining* baseia-se na busca de pares de sequências próximas para formação de unidades taxonômicas operacionais (UTO) diminuindo o comprimento total dos ramos do filograma. As UTOs formadas são comparadas entre si para a obtenção da árvore mais parcimoniosa. Para a formação das UTOs é utilizada a distância p entre as sequências, parâmetro estatístico calculado com base no número de diferenças de bases de cada sequência ($nd/np = p$, onde nd é o número de diferenças nucleotídicas entre as duas sequências e np é o número de posições em que as duas sequências foram comparadas). Para calcular a confiabilidade da árvore foi utilizado o teste de *bootstrap* com 1000 réplicas, que consiste na construção de 1000 filogramas possíveis para essas amostras, com variações aleatórias em número e tamanho de sequência (Felsenstein, 1985). A partir destes 1000 filogramas é gerado o filograma consenso e em cada ramo deste é apresentada a porcentagem de vezes que este ramo apareceu nos 1000 filogramas iniciais.

Análise filogenética por MLST: escolha dos genes constitutivos –

Foram escolhidos sete genes constitutivos para a análise genética. Seis desses genes – *atpD*, *gapA*, *guaA*, *ppsA*, *nuoD*, *recA* – foram usados no trabalho de Kaiser et al. (2009), no qual foi padronizado o estudo de MLST para o gênero *Stenotrophomonas*. Foi também incluído o gene constitutivo *rpoA*, utilizado por Ramos et al. (2011) para o estudo do gênero *Stenotrophomonas* por meio da técnica *Multilocus Sequencing Analysis* (MLSA). As funções de cada um desses genes e os iniciadores utilizados para sua amplificação e sequenciamento são descritos na **Tabela 4**.

Amplificação de fragmentos dos genes constitutivos –

As condições iniciais de amplificação para todos os genes constitutivos foram: 1X *TaqDNA polymerase buffer*, 1,5mM de $MgCl_2$, 2 U de *TaqDNA polymerase*, 25 μM de dNTPs, 10 μM dos iniciadores *forward* e *reverse* (**Tabela 4**) e água para ajustar o volume final da reação para 50 μl . A quantidade de DNA por reação variou de 20 a 40 ng conforme o tamanho do fragmento gênico a ser amplificado. A reação de PCR foi realizada durante 40 ciclos com as seguintes temperaturas: desnaturação do DNA a 95°C/6 minutos; anelamento a 62°C/15 segundos e extensão a 72°C/1 minuto e 15 segundos. Foi feita uma extensão final a 72°C/7 minutos. Para os genes *atpD* e *nuoD* foram realizados ajustes na temperatura de anelamento (ver **Tabela 4**).

Purificação dos fragmentos de PCR –

Os produtos amplificados dos genes *atpD*, *gapA*, *guaA*, *ppsA*, *nuoD*, *recA* e *rpoA* foram purificados com *GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit*, seguindo instruções do fabricante.

Sequenciamento dos genes constitutivos –

Os produtos purificados com o *GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit* correspondentes a fragmentos dos genes *atpD*, *gapA*, *guaA*, *ppsA*, *nuoD*, *recA* e *rpoA* foram sequenciados para todos os isolados sob estudo. As reações para o sequenciamento foram realizadas seguindo o protocolo do *Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (cat. nº 4337455, Applied Biosystems, Austin, TX), seguindo as instruções do fabricante, e precipitadas

com o *Big Dye Xterminator Purification Kit* (cat. nº 4376486, Applied Biosystems, Austin, Texas), de acordo com as instruções do fabricante. Foi utilizado o sequenciador *ABI 3500 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Forest City, Califórnia). As temperaturas foram de 95°C/20 segundos; 50-55°C/15 segundos e 60°C/1 minuto. Os ciclos foram repetidos por 30 vezes.

Tabela 4 – Listas de genes e respectivos iniciadores utilizados na análise filogenética por MLST.

Gene	Função	Iniciadores	Sequência	Temperatura de Anelamento
<i>atpD</i>	setor F1 da ATP sintase ligada à membrana subunidade beta – hidrólise de ATP	atpD F	GATTCAAGGGTCTGGGTGAA	60°C
		atpD R	CTTTACGRCGKGTCATWTCAC	
<i>gapA</i>	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase – glicólise	gapA F	TGGCAATCAAGGTTGGTATCAAC	62°C
		gapA R	TTCGCTCTGTGCCTTCACTTC	
<i>guaA</i>	GMP sintase – conversão de xantosina monofostato em guanosina monofostato	guaA F	AACGAAGAAAAGCGCTGG	62°C
		guaA R	ACGGATGGCGGTAGACCAT	
<i>nuoD</i>	NADH oxirredutase – metabolismo de energia, síntese de ATP	nuoD F	TTCGCAACTACACCATGAAC	48°C
		nuoD R	CAGCGCGACTCCTTGTACTT	
<i>ppsA</i>	fosfoenolpiruvato sintase – gliconeogenese	ppsA F	CAAGGCGATCCGCATGGTGTATTC	62°C
		ppsA R	CCTTCGTAGATGAA(A/G)CCGGT(A/G)TC	
<i>recA</i>	recombinase A – reparo de DNA	recA F	ATGGACGAGAACAAGAAGCGC	62°C
		recA R	GGTGATGACCTGCTTGAACGG	
<i>rpoA</i>	RNA polimerase, subunidade alfa – transcrição gênica	rpoA F	TKAAGGATGTGGCRATCC	62°C
		rpoA R	GGCCARTTCTCCARCTTCA	

Alinhamento múltiplo das sequências – Após a reação de sequenciamento, os dados brutos foram capturados e a análise de qualidade das sequências e obtenção das sequências consenso foram realizadas utilizando o programa Chromas Pro versão 1.5 (Technelysium Pty Ltd, <http://www.technelysium.com.au/chromas.html>). Após obtenção das sequências consenso para cada amostra, estas foram exportadas em formato FASTA, formatação utilizada para inferências filogenéticas a partir do programa MEGA5 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, Tamura et al., 2011).

Análise filogenética por MLST – Todas as análises foram realizadas utilizando o programa MEGA5. As árvores filogenéticas foram construídas pelo método de *Neighbor-joining* (Saitou e Nei, 1987; Zhang e Sun, 2008), com base na distância *p* (Tamura e Nei, 1993) e *Maximum Composite Likelihood* (Tamura et al., 2004), e teste de confiança de *bootstrap* com 1000 réplicas.

Análise de variabilidade nucleotídica – A análise de diversidade de sequência de nucleotídeos entre as amostras nosocomiais de *S. maltophilia* foi realizada utilizando o programa DNAsp (*DNA Sequence Polymorphism* versão 4.10, Rozas et al., 2003) para os genes *atpD*, *gapA*, *guaA*, *ppsA*, *nuoD*, *recA* e *rpoA*. Para essa análise foi utilizado o parâmetro *Pi* (diversidade nucleotídica) que corresponde à média do número de diferenças de nucleotídeo por sítio entre duas sequências (Nei, 1987; Nei e Miller, 1990) e a sua variância de amostragem (Nei, 1987).

Análise filogenética incluindo linhagens ambientais de *S. maltophilia* – As amostras deste estudo também foram analisadas comparativamente a linhagens ambientais de *S. maltophilia* com o objetivo de verificar o grau de proximidade filogenética entre os isolados nosocomiais e as linhagens clínicas incluídas neste estudo e linhagens ambientais de *S. maltophilia*. Para isso foram coletadas no banco GenBank® as sequências dos genes *atpD*, *gapA*, *guaA*, *ppsA*, *nuoD* e *recA* de 5 amostras ambientais de *S. maltophilia* (Kaiser et al., 2009; Vasileuskaya-Schulz et al., 2011). A

lista de amostras de *S. maltophilia* ambientais utilizadas nesta análise filogenética encontra-se na **Tabela 5**.

Tabela 5 – Linhagens ambientais de *Stenotrophomonas maltophilia* utilizadas na análise filogenética.

Linhagem número	Origem
LMG 6608	rizosfera
LMG 11089	rizosfera de chicória
LMG 11090	rizosfera de chicória
LMG 11105	rizosfera de trigo
LMG 11108	rizosfera de trigo

IV) RESULTADOS

IV.1) Testes bioquímicos – Foram realizados testes bioquímicos para 42 amostras confirmando que todas pertencem ao gênero *Stenotrophomonas*. Os testes só não foram realizados para 5 amostras (HIAE 2947, HIAE 4471, LMG 10874, LMG 22074 e LMG 25348) devido à perda de viabilidade dos respectivos estoques. No **Anexo A** são mostrados os resultados dos testes bioquímicos para um conjunto de isolados que apresentou maior proximidade filogenética (ver seção **IV-6**).

IV.2) Resistência a antibióticos – As cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 utilizadas para validação do meio Ágar Muller-Hinton apresentaram perfis de sensibilidade satisfatórios (**Tabela 6**), mostrando que o meio de cultura e os discos Cefar utilizados se encontravam em condições adequadas para a realização dos antibiogramas.

Tabela 6 – Perfis de sensibilidade das cepas *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, a diferentes antimicrobianos.

Linagem	AMC	ATM	CAZ	CIP	CLO	CTX	IPM	LVX	MER	SUT	TET	TOB
<i>E. coli</i> ATCC 25922	23/S	30/S	28/S	35/S	27/S	28/S	31/S	30/S	27/S	19/S	25/S	20/S
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	33/S	-	-	28/S	24/S	32/S	40/S	28/S	33/S	26/S	27/S	22/S
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0/R	25/S	23/S	26/S	0/R	13/S	16/S	20/S	28/S	0/R	16/I	23/S

Amoxicilina* + Ácido Clavulânico (AMC), Aztreonam (ATM), Ceftazidima* (CAZ), Cefotaxima* (CTX), Ciprofloxacina (CIP), Cloranfenicol (CLO), Imipenem (IPM), Levofloxacina (LVX), Meropenem* (MER), Cotrimoxazol (SUT), Tetraciclina (TET) e Tobramicina (TOB). *beta-lactâmicos. (Perfis de resistência: R – resistente, I – Intermediário e S – sensível).

As 42 amostras identificadas através do teste de perfil bioquímico foram também submetidas ao teste de resistência a diferentes antimicrobianos. Os halos de inibição de crescimento formados ao redor dos

discos foram medidos e o valor obtido foi comparado com a Tabela Padrão para interpretação de halos de inibição (**Tabela 3**), para determinar qual o padrão de resistência de cada isolado a cada um dos antibióticos testados. Um teste típico é mostrado na **Figura 3**, onde é possível observar os diferentes tipos de halo: sensível, intermediário e resistente.

Figura 3 – Resultado do antibiograma para a amostra LMG 957. Em destaque os halos formados ao redor dos discos contendo os antibióticos Cotrimoxazol (SUT), Tetraciclina (TET) e Meropenem (MER), para os quais a amostra LMG 957 apresenta padrões de sensibilidade: sensível, intermediário e resistente, respectivamente.

Das 42 amostras testadas, 100% apresentaram sensibilidade a LVX, enquanto que frente aos outros antibióticos a porcentagem foi menor: CLO (95%), SUT (91%), CIP (86%), TET (74%), TOB (72%) e CAZ (72%). Os

isolados mostraram-se resistentes a IPM (98%), AMC (84%), ATM (84%), MER (81%) e CTX (77%) (**Tabela 7** e **Figura 4**). O resultado dos testes de resistência a antibióticos para as 42 amostras testadas encontra-se no **Anexo B**. Esse resultado mostra que todas as amostras testadas são multirresistentes a drogas, por serem muito resistentes ou resistentes (halo intermediário) a, no mínimo, 3 dos antibióticos testados neste estudo. É interessante notar que a maioria dos isolados clínicos aqui estudados apresenta resistência a diversos beta-lactâmicos, uma característica dos isolados clínicos de *S. maltophilia* (Gould e Avison, 2006; Gould et al., 2007).

Tabela 7 – Perfil de sensibilidade das amostras a diferentes antimicrobianos.

	AMC	ATM	CAZ	CIP	CLO	CTX	IPM	LVX	MER	SUT	TET	TOB
Sensível	14%	5%	72%	86%	95%	5%	2%	100%	19%	91%	74%	72%
Intermediário	2%	11%	14%	5%	0%	18%	0%	0%	0%	0%	16%	0%
Resistente	84%	84%	14%	9%	5%	77%	98%	0%	81%	9%	10%	28%

Amoxicilina + Ac. Clavulânico (AMC), Aztreonama (ATM), Ceftazidima (CAZ), Cefotaxima (CTX), Ciprofloxacina (CIP), Cloranfenicol (CLO), Imipenem (IPM), Levofloxacina (LVX), Meropenem (MER), Cotrimoxazol (SUT), Tetraciclina (TET) e Tobramicina (TOB).

Figura 4 – Perfil de sensibilidade a antimicrobianos das amostras do gênero *Stenotrophomonas*. Amoxicilina + Ac. Clavulânico (AMC), Aztreonama (ATM), Ceftazidima (CAZ), Cefotaxima (CTX), Ciprofloxacina (CIP), Cloranfenicol (CLO), Imipenem (IPM), Levofloxacina (LVX), Meropenem (MER), Cotrimoxazol (SUT), Tetraciclina (TET) e Tobramicina (TOB).

IV.3) Detecção do gene *nifH* – Nenhum dos isolados provenientes do HIAE apresentou amplificação do fragmento do gene *nifH*, indicando ausência do gene nesses isolados nosocomiais e também na linhagem-tipo de *S. maltophilia*, que é originária de um isolado clínico (Palleroni e Bradbury, 1993). Essa ausência de *nifH* foi confirmada pelo resultado negativo do teste de fixação de nitrogênio (teste de redução de acetileno).

IV.4) Análise filogenética por 16S rRNA – A análise filogenética realizada a partir do sequenciamento de um fragmento de 575 pb (sequência consenso) do gene 16S rRNA (**Figura 5**) mostra que amostras nosocomiais e ambientais do gênero *Stenotrophomonas* apresentam diferenças genéticas, sendo possível identificar dois grandes grupos: **Ambientais** (contendo apenas linhagens-tipo de diferentes espécies ambientais de *Stenotrophomonas* e o grupo externo *Xylella fastidiosa*) e **Clínicas** (contendo todas as amostras nosocomiais e a linhagem-tipo de *S. maltophilia*).

Figura 5 – Filograma construído para o gene 16S rRNA utilizando o programa Mega 4 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis), o modelo de *Neighbor-joining*, com teste de *bootstrap* em 1000 réplicas.

IV.5) Análise filogenética por MLST – Para o estudo filogenético das amostras por meio da técnica MLST foram amplificados e sequenciados fragmentos específicos dos genes *atpD*, *gapA*, *guaA*, *ppsA*, *nuoD*, *recA* e *rpoA*, utilizando-se os iniciadores listados na **Tabela 4**. As sequências desses fragmentos gênicos, com tamanho superior a 200 pb foram depositadas no banco GenBank® do NCBI (número de acesso *atpD*, KC209168 - KC209214; *recA*, KC209215 - KC209254; *ppsA*, KC209255 - KC209300; *gapA*, KC209301 - KC209345; *nuoD*, KC209346 - KC209384; *guaA*, KC209385 - KC209424). As sequências consenso foram obtidas através do programa Chromas Pro versão 1.5 e o alinhamento foi feito com o programa MEGA5, conforme descrito na seção **III.3**. Para o alinhamento das sequências gênicas de 7 dessas amostras utilizaram-se, além das sequências obtidas em nosso laboratório, sequências já depositadas no GenBank® (Kaiser et al., 2009, Vasileuskaya-Schulz et al., 2001), conforme indicado na **Tabela 1** e no **Anexo H**.

Após o alinhamento de todas as amostras foi possível considerar para as análises de diversidade nucleotídica e filogenética trechos entre 136 até 401 nucleotídeos para os genes *atpD*, *gapA*, *guaA*, *ppsA*, *nuoD*, *recA* e *rpoA* (**Tabela 8**). O gene que apresentou maior número de sítios polimórficos foi o gene *guaA* (87), e os genes *rpoA*, *ppsA* e *gapA* apresentam os maiores índices de diversidade nucleotídica (0,03904; 0,03763; 0,03749; respectivamente) (**Tabela 8**).

Tabela 8 – Análise de diversidade nucleotídica das amostras investigadas neste estudo.

Gene	Tamanho do fragmento (pb)	Sítios polimórficos	Mutações		Diversidade nucleotídica (Pi)
			Sinônimas	Não-sinônimas	
<i>atpD</i> (3)	303	24	2	22	0,02013
<i>gapA</i> (1)	314	55	48	7	0,03592
<i>guaA</i> (3)	401	87	8	79	0,02889
<i>nuoD</i> (1)	213	32	28	4	0,02742
<i>ppsA</i> (1)	257	56	46	10	0,03763
<i>recA</i> (1)	254	67	58	9	0,03749
<i>rpoA</i> (1)	136	29	17	12	0,03904

Foi construído um filograma a partir das sequências de fragmentos específicos dos genes *atpD*, *gapA*, *guaA*, *ppsA*, *nuoD*, *recA* e *rpoA* concatenados para todas as 47 amostras (**Tabela 1**) analisadas neste estudo (**Figura 6**). Esse filograma concatenado mostra a divisão das 47 amostras em dois grandes grupos: o grupo **A** contendo as linhagens-tipo de três espécies ambientais de *Stenotrophomonas* incluídas neste estudo; o grupo **B** incluindo todas as amostras nosocomiais e as linhagens-tipo de *S. maltophilia* e *S. pavanii*.

Foram também construídos filogramas para cada um dos fragmentos dos genes *atpD*, *gapA*, *guaA*, *nuoD*, *ppsA*, *recA* e *rpoA*. Os filogramas para os genes *ppsA* e *recA* são mostrados nas **Figuras 7 e 8**, respectivamente. Os demais, por serem menos discriminativos entre as diferentes amostras sob estudo, aparecem nos **Anexos C a G**.

É interessante notar que o grupo **B** (ver **Figura 6**) divide-se em três subgrupos: **B.I** e **B.II** que apresentam maior homogeneidade filogenética e **B.III**, que possui três agrupamentos de amostras, indicando aí a provável ocorrência de recombinação intergrupos. Esse cenário é claramente mostrado nas **Figuras 7** (filograma para o gene *ppsA*) e **8** (filograma para o gene *recA*). Os grupos **B.I** e **B.III** são também os que abrigam isolados e linhagens com maior grau de resistência a antibióticos (ver **Anexo B**).

IV.6) Análise filogenética incluindo linhagens ambientais de *S. maltophilia*

A partir das sequências concatenadas dos genes *atpD*, *gapA*, *guaA*, *ppsA*, *nuoD* e *recA* das 47 amostras da **Tabela 1** e de mais 5 linhagens ambientais de *S. maltophilia* descritas na **Tabela 5**, foi construído um filograma para análise da proximidade genética entre isolados clínicos e ambientais do gênero *Stenotrophomonas* (**Figura 9**) no qual foi possível verificar a formação de alguns grupos de amostras com maior proximidade filogenética: **A**, contendo três linhagens-tipo de espécies ambientais do gênero *Stenotrophomonas*; **B**, contendo todas as amostras nosocomiais, as linhagens ambientais da espécie *S. maltophilia* e as linhagens-tipo de *S.*

maltophilia e *S. pavanii*; **B.I**, **B.II**, **B.III** e **B.IV** como subgrupos de **B**, sendo que **B.I** engloba as 5 linhagens ambientais de *S. maltophilia* e 4 linhagens nosocomiais, **B.II** contém a linhagem-tipo de *S. maltophilia* e 12 amostras nosocomiais, **B.III** reúne 7 amostras nosocomiais provenientes do HIAE e **B.IV** que contém a linhagem-tipo de *S. pavanii* e 14 amostras nosocomiais. Pode-se verificar também uma subdivisão de **B.IV** em três pequenos grupos; **B.IV.1** e **B.IV.2** englobando amostras nosocomiais e **B.IV.3** contendo a linhagem-tipo de *S. pavanii* e amostras nosocomiais.

É ainda importante notar que nesse filograma os grupos **B.II**, **B.III**, **B.IV.1**, **B.IV.2** e **B.IV.3** têm alta similaridade filogenética (valores de *bootstrap* entre 99 e 100, ver Kaiser et al., 2009). Por outro lado, as amostras integrantes dos grupos **B.II**, **B.III**, **B.IV.2** e **B.IV.3** apresentam algumas diferenças metabólicas intra-grupo, enquanto que as amostras agrupadas em **B.IV.1** apresentam o mesmo perfil bioquímico (ver **Anexo A**). Essa divergência fenotípica entre linhagens e isolados pertencentes a um mesmo grupo filogenético indica multiplicidade de origem, como será discutido posteriormente. Finalmente, esse filograma também evidencia que a maioria dos isolados nosocomiais e das linhagens clínicas é filogeneticamente distinta das linhagens ambientais de *S. maltophilia*.

Figura 6 – Filograma construído com base nos fragmentos concatenados dos genes *atpD*, *guaA*, *gapA*, *nuoD*, *ppsA*, *recA* e *rpoA* utilizando o programa MEGA5, o método de *Neighbor-joining*, parâmetro distância p e com teste de *bootstrap* em 1000 réplicas. Grupos formados por proximidade filogenética estão indicados por A, B, B.I, B.II, B.III, B.III.1, B.III.2 e B.III.3. Os números junto aos nós indicam valores de *bootstrap* ≥ 50 .

Figura 7 – Filograma construído para o gene *ppsA* utilizando o programa MEGA5, o método de *Neighbor-joining*, parâmetro distância p e com teste de *bootstrap* em 1000 réplicas. A, B, B.I, B.II, B.III, B.III.1, B.III.2 e B.III.3 indicam grupos com maior proximidade filogenética de acordo com o filograma construído a partir da sequência concatenada dos genes *atpD*, *gapA*, *guaA*, *nuoD*, *ppsA*, *recA* e *rpoA*, que aparece na Figura 6.

Figura 8 – Filograma construído para o gene *recA* utilizando o programa MEGA5, o método de *Neighbor-joining*, parâmetro distância p e com teste de *bootstrap* em 1000 réplicas. A, B, B.I, B.II, B.III, B.III.1, B.III.2 e B.III.3 indicam com maior proximidade filogenética de acordo com o filograma construído a partir da sequência concatenada dos genes *atpD*, *gapA*, *guaA*, *nuoD*, *ppsA*, *recA* e *rpoA*, que aparece na Figura 6.

Figura 9 – Filograma construído a partir da concatenação dos genes *atpD*, *guaA*, *gapA*, *nuoD*, *ppsA* e *recA* utilizando o programa MEGA5, método de *Neighbor-joining*, parâmetro distância p e com teste do *bootstrap* em 1000 réplicas. Grupos formados por proximidade filogenética estão indicados por A, B, B.I, B.II, B.III, B.IV, B.IV.1, B.IV.2 e B.IV.3. Os números junto aos nós indicam valores de *bootstrap* ≥ 50 .

V) **Discussão e Conclusões**

No presente trabalho foi adotada uma abordagem filogenética – baseada nas análises de nucleotídeos de 16S rRNA e de sequências nucleotídicas de fragmentos específicos de genes constitutivos por MLST (*Multilocus Sequencing Typing*) – para investigar a variabilidade clonal de isolados nosocomiais e linhagens clínicas de *S. maltophilia*, os quais foram também caracterizados quanto ao perfil bioquímico e padrão de resistência a antibióticos. Essa abordagem permitiu correlacionar os perfis filogenéticos e fenotípicos das linhagens e isolados sob estudo com um padrão de origem multiclonal, refletindo assim o processo de adaptabilidade de *S. maltophilia* a diferentes habitats. As implicações biológicas, clínicas e laboratoriais deste trabalho são discutidas nas seções seguintes.

V.1) Análise filogenética

A análise de sequências de DNA do gene 16S rRNA aqui realizada evidenciou a nítida separação entre os isolados nosocomiais e as linhagens-tipo de espécies exclusivamente ambientais de *Stenotrophomonas*. Esse resultado está de acordo com as observações pioneiras de Berg et al. (1999) e Minkwitz e Berg (2001), que lograram discriminar isolados clínicos e ambientais de *S. maltophilia* com base em sequências de DNA 16S ribossomal. Foi também mostrado que nenhum dos isolados e linhagens clínicas de *S. maltophilia* possui o gene *nifH* em seu genoma, ao contrário das linhagens ambientais, o que pode indicar um mecanismo adaptativo.

A análise filogenética por MLST mostrou claramente que os isolados e linhagens clínicas de *S. maltophilia* aqui estudados possuem múltiplas origens clonais e se agrupam separadamente das linhagens ambientais (excetuando-se *S. pavanii*). O padrão observado é o de complexos clonais: grupos proximamente relacionados, mas não idênticos, com provável origem em um ancestral comum relativamente recente (Maiden, 2006; Turner e Feil, 2007; Kaiser et al., 2009).

Os grupos e subgrupos formados por proximidade filogenéticas (ver **Figuras 6 e 9**) apresentam valores altos (superiores a 80) de *bootstrap* (Kaiser et al., 2009), indicando que a similaridade genética encontrada é suficiente para uma definição de 5 grupos clonais entre as amostras clínicas incluídas neste estudo. É importante destacar que as 29 amostras clínicas isoladas de pacientes do HIAE (sendo 14 de pacientes internados na UTI) entre agosto de 2005 e julho de 2006 e as 13 linhagens clínicas do LMG, isoladas em diferentes épocas (entre os anos de 1976 e 1995) e com distintas origens geográficas, ocupam posições imbricadas nos subgrupos **B.II** e **B.IV** identificados nos filogramas. Esse resultado da análise filogenética é compatível com um cenário de infecções de origem comunitária (água, plantas, alimentos, animais, homem).

A origem multiclonal das linhagens e isolados clínicos aqui estudados é concordante com as características de patógeno emergente e oportunista descritas para *S. maltophilia* (Brooke, 2012). Mais ainda, essa caracterização é corroborada pela multirresistência a antibióticos que foi detectada em todos esses isolados e linhagens e que é uma propriedade distintiva de patógenos oportunistas de origem ambiental (Ryan et al., 2009; Brooke, 2012). No caso deste estudo, cabe ainda ressaltar que a maioria dos isolados clínicos mostrou resistência a beta-lactâmicos, o que é típico de isolados clínicos de *S. maltophilia* (Gould e Avison, 2006; Gould et al., 2006).

É também interessante notar que alguns isolados e linhagens clínicas com grande proximidade filogenética, apresentando valores de *bootstrap* entre 99 e 100 (ver **Figura 9 e Anexo A**), que poderiam ser considerados como pertencentes a um mesmo grupo clonal, não compartilham total identidade de perfil metabólico, o que indica a origem comunitária desses isolados e a plasticidade adaptativa de seu genoma.

V.2) Background genético dos subgrupos B.I e B.III

A análise filogenética mostra ocorrência de recombinação genética intergrupos envolvendo o subgrupo **B.III**: há separação nítida entre os subgrupos **B.I** e **B.III** na árvore gerada a partir de sequências do gene *ppsA*

(árvore *ppsA*), mas se verifica uma superposição parcial das amostras dos subgrupos **B.III.2** e **B.III.3** com subgrupo **B.I** na árvore *recA* (ver **Figuras 7 e 8**). Esse resultado indica a ocorrência de um mecanismo de transferência horizontal de material genético, que pode ocorrer pela inserção de fagos, plasmídeos, ação de transposons, etc. (Feil et al., 2001; Turner e Feil, 2007).

A transferência genética horizontal (TGH) é um mecanismo evolutivo importante: gera diversidade bacteriana e adaptação a novos nichos ecológicos (Wiedenbeck e Cohan, 2011). A TGH é um mecanismo importante para a aquisição de fatores de resistência a drogas em bactérias (Gordo et al., 2011). A TGH pode ocorrer tanto no genoma principal (*core genome*) – o conjunto de genes comuns a todas as linhagens de um patógeno – como no genoma acessório – a porção do genoma de conteúdo variável entre linhagens individuais, que usualmente abriga ilhas genômicas, ilhas de patogenicidade, profagos, plasmídeos integrados e transposons, que estão comumente ligados a fatores de virulência e de resistência a drogas (Turner e Feil, 2007; Feng et al., 2007). Está bem estabelecido que através da TGH, *S. maltophilia* pode adquirir de outras bactérias ambientais genes envolvidos nos mecanismos de resistência a agentes microbicidas e a antibióticos (Sanchez et al., 2009; Brooke, 2012).

Eventos de TGH podem alterar a composição de grupos clonais tal como evidenciado por estudos de MLST (Maiden, 2006; Turner e Feil, 2007; Kaiser et al., 2009; Wiedenbeck e Cohan, 2011). Esse é precisamente o caso dos isolados deste estudo que integram os subgrupos **B.I** e **B.III** (**Figuras 7 e 8**). Esse dado da análise por MLST indica que o genoma do subgrupo **B.III** seria permissivo a ganhos de novos fatores de virulência e de resistência a agentes antimicrobianos. De fato, as amostras de **B.I** e **B.III** estão entre as mais multirresistentes a antibióticos (ver **Anexo B**). O grupo **B.II**, de maior homogeneidade filogenética, abriga os isolados com menor número de marcas de resistência.

A permissividade a TGH é uma característica genômica que varia entre as linhagens de um patógeno. Em nosso laboratório esse fenômeno foi descrito para grupos clonais de *E. coli* enteropatogênica atípica (aEPEC)

que diferem na sua permissividade à aquisição de fatores de virulência derivados de patótipos não-EPEC (Bando et al., 2009). Mecanismos similares já haviam sido descritos para linhagens de *S. aureus* derivadas de infecções de origem comunitária (Feng et al., 2007) e para isolados de *N. meningitidis* com diferentes graus de invasividade (Turner e Feil, 2007). Assim, a identificação por MLST de processos de TGH, como feita neste trabalho, é um recurso importante para a epidemiologia molecular de *S. maltophilia* e, em combinação com outras técnicas de caracterização genética, para o monitoramento de grupos clonais com maior potencial de virulência e/ou resistência a drogas.

V.3) Identificação molecular de isolados clínicos utilizando o gene *ppsA*

Os genes constitutivos *gapA*, *guaA*, *ppsA* e *rpoA* apresentaram os maiores valores de variabilidade nucleotídica dentre os sete genes selecionados para a análise filogenética por MLST (**Tabela 8**). Utilizando dados de sequenciamento de fragmentos específicos desses genes foi possível construir quatro filogramas, aqui denominados árvores *ppsA* (**Figura 7**), *gapA*, *guaA* e *rpoA* (**Anexos D, E e G**, respectivamente). Essas árvores mostraram graus diferentes de discriminação filogenética das linhagens e isolados aqui estudados. A árvore *ppsA* foi a que apresentou discriminação de grupos clonais mais próxima à da árvore concatenada das amostras clínicas mostrada na **Figura 6**. Esse resultado tem interesse prático, uma vez que indica que o sequenciamento de um fragmento de 257 pb do gene *ppsA* serve à discriminação de grupos clonais e de isolados de *S. maltophilia*. Esse esquema simplificado pode ser empregado em laboratório clínico para verificar se há ou não um surto – provocado por um determinado grupo clonal – em um ambiente nosocomial. Serve também para vigilância epidemiológica permitindo verificar a origem de isolados e monitorar no tempo o aparecimento de grupos clonais potencialmente perigosos (Turner e Feil, 2007; Kaiser et al., 2009).

V.4) A investigação de *S. maltophilia* como patógeno emergente

Os resultados deste trabalho mostram que a análise filogenética por MLST é uma ferramenta importante para a investigação de *S. maltophilia* como patógeno emergente. Com efeito, essa análise é adequada para identificar a origem comunitária ou nosocomial de infecções, servindo à detecção de surtos e permitindo um estudo da estrutura populacional do patógeno, importante para a epidemiologia molecular (Maiden, 2006; Turner e Feil, 2007; Kaiser et al., 2009). Mais ainda, estudos utilizando MLST são úteis para investigar a origem de infecções comunitárias por *S. maltophilia* e identificar hospedeiros intermediários, uma área que permanece ainda pouco esclarecida (Brooke, 2012). Conforme ressaltado por Maiden (2006), “MLST fornece meios rápidos e universais para a identificação de complexos clonais correspondentes a linhagens hiperinvasivas enquanto elas estão se espelhando globalmente”. O fato dessas bactérias serem promíscuas e adquirirem genes de resistência de outras espécies ambientais (Brooke, 2012), mostra que o acoplamento de MLST a novas tecnologias, como MALDI-TOF (Croxatto et al., 2012) e o emprego de MLST de alto desempenho (*High-throughput multilocus sequence typing*, ou HiMLST, Boers et al., 2012), pode ampliar muito a utilidade dessa metodologia filogenética na investigação de *S. maltophilia* e de outros patógenos emergentes com características similares.

V.5) Perspectivas de trabalho futuro

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Genômica Pediátrica do Departamento de Pediatria da FMUSP e no Laboratório de Investigação Médica 36 (LIM-36) do Instituto da Criança do HC-FMUSP, onde estão sendo desenvolvidos diversos estudos na área de caracterização molecular de patógenos, utilizando principalmente abordagens genômicas e de biologia celular. No presente estudo de *S. maltophilia*, foi estabelecida uma colaboração com o Laboratório de Microbiologia do Instituto Butantan (IB) para a fenotipagem de linhagens e isolados clínicos. Parte dos resultados dessa colaboração – testes de resistência a antibióticos realizados com a

colaboração da pesquisadora Márcia R. Franzolin – foi incluída neste trabalho.

Presentemente, em colaboração com os pesquisadores do IB, Cecília Abe e Waldir Elias Jr., estão sendo iniciados estudos sobre a adesão de *S. maltophilia* a superfícies celulares (célula humana da linhagem HEp-2). Essa adesão pode ser mediada por estruturas fimbriais, já tendo sido demonstrado que estruturas fimbriais produzidas por *S. maltophilia* cultivadas a 37°C também estão envolvidas na formação de biofilmes e são semelhantes às fimbrias produzidas por linhagens patogênicas de *E. coli* (De Oliveira-Garcia et al., 2003). A formação de biofilmes está associada a 65% das infecções hospitalares (Potera, 1999) e é um processo fundamental para a patogenicidade de *S. maltophilia*, determinando sua adesão tanto a superfícies abióticas como a mucosas (Pompilio et al., 2010; Nyč e Matějková, 2010).

Nossos resultados preliminares mostram que linhagens clínicas de *S. maltophilia* aderem mais rapidamente a células HEp-2 após 3 horas de incubação, enquanto que isolados ambientais, nesse intervalo, aderem preferencialmente à superfície abiótica nos espaços entre as células humanas aderidas. Com a inclusão de mais linhagens e isolados, ambientais e clínicos, será possível obter uma melhor caracterização desse processo, etapa necessária à condução de estudos funcionais sobre o mecanismo de formação de biofilmes de *S. maltophilia*. Esses estudos serão complementados por estudos de genômica funcional e de caracterização filogenética de isolados clínicos e ambientais de *S. maltophilia*, com o objetivo de obter-se uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares e genômicos que contribuem para a patogenicidade dessa bactéria.

ANEXO A – Testes bioquímicos API 20 NE para cinco grupos de amostras filogeneticamente próximos conforme o filograma da Figura 1.

GRUPO FILOGENÉTICO	AMOSTRAS	COMPONENTES ATIVOS																				
		NO3	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNPG	GLU	ARA	MNE	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	ADI	MLT	CIT	PAC	OX
B.IV.3	HIAE 1998	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
	LMG 25348																					
	HIAE 2229	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
	HIAE 2425	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
	LMG 11114	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
B.IV.2	HIAE 3673	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
	LMG 11002	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
	HIAE 3730	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
	HIAE 4003	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
B.IV.3	HIAE 5124	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
	HIAE 3369	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
	LMG 957	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
	LMG 10853	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
	HIAE 2336	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
	HIAE 2947																					
B.III	HIAE 3338	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
	HIAE 3576	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
	HIAE 4600	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
	HIAE 4500	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
	HIAE 4800	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
	HIAE 3808	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
	HIAE 5399	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-

B.II	HIAE 4920	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
	HIAE 4249	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
	HIAE 1911	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
	HIAE 4948	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
	HIAE 3182	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
	HIAE 1990	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
	LMG 958	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
	HIAE 5188	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
	LMG 10992	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
	HIAE 4638	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
	HIAE 4471																					
	HIAE 2505	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
	HAIE 2737	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-

ANEXO B – Teste de resistência a antibióticos

Amostras	Data de Isolamento	ORIGEM	Antibióticos testados: diâmetro dos halos de não-crescimento em mm / nível de resistência												MR
			AMC	ATM	CAZ	CIP	CLO	CTX	IPM	LVX	MER	SUT	TET	TOB	
HIAE 2229	24/09/2005	secreção de dreno	0 / R	0 / R	22 / S	22 / S	26 / S	11 / R	0 / R	30 / S	0 / R	29 / S	22 / S	15 / S	+
HIAE 2425	17/10/2005	secreção traqueal	0 / R	0 / R	25 / S	29 / S	29 / S	12 / R	0 / R	33 / S	0 / R	25 / S	18 / I	15 / S	+
HIAE 1998	30/08/2005	secreção traqueal	0 / R	0 / R	17 / I	17 / I	22 / S	0 / R	0 / R	20 / S	0 / R	23 / S	19 / S	0 / R	+
LMG 11114		cultura de sangue humano	0 / R	0 / R	25 / S	28 / S	29 / S	15 / I	0 / R	33 / S	0 / R	21 / S	21 / S	0 / R	+
LMG 25348 <i>S. pavanii</i>		cana de açúcar	Não foram realizados testes de resistência para essa amostra												
HIAE 3673	15/02/2006	lavado brônquico	0 / R	0 / R	22 / S	23 / S	20 / S	9 / R	0 / R	30 / S	0 / R	26 / S	20 / S	23 / S	+
LMG 11002		infecção mamária	30 / S	0 / R	36 / S	32 / S	34 / S	18 / I	0 / R	28 / S	28 / S	34 / S	20 / S	28 / S	+
HIAE 3730	20/02/2006	secreção traqueal	0 / R	0 / R	16 / I	27 / S	30 / S	0 / R	0 / R	33 / S	0 / R	27 / S	17 / I	15 / S	+
HIAE 4003	16/03/2006	secreção traqueal	0 / R	0 / R	27 / S	29 / S	28 / S	15 / I	0 / R	33 / S	0 / R	31 / S	25 / S	25 / S	+
HIAE 5124	12/06/2006	secreção traqueal	10 / R	0 / R	28 / S	36 / S	26 / S	16 / I	8 / R	36 / S	13 / R	30 / S	24 / S	26 / S	+
HIAE 3369	19/01/2006	cultura de sangue humano	12 / R	0 / R	30 / S	31 / S	28 / S	19 / I	0 / R	35 / S	13 / R	24 / S	16 / I	23 / S	+
LMG 957		cultura de sangue humano	11 / R	0 / R	32 / S	31 / S	21 / S	20 / S	0 / R	28 / S	10 / R	34 / S	17 / I	21 / S	+
LMG 10853		secreção traqueal	18 / S	0 / R	40 / S	30 / S	32 / S	21 / I	0 / R	33 / S	20 / S	27 / S	26 / S	22 / S	+
HIAE 2336	04/10/2005	secreção traqueal	10 / R	0 / R	16 / I	15 / R	22 / S	0 / R	0 / R	21 / S	0 / R	20 / S	0 / R	25 / S	+
HIAE 2947	07/12/2005	secreção traqueal	Não foram realizados testes de resistência para essa amostra												
HIAE 3576	05/02/2006	secreção traqueal	10 / R	16 / I	25 / S	28 / S	26 / S	17 / I	0 / R	29 / S	22 / S	17 / S	17 / I	23 / S	+
HIAE 4600	06/05/2006	secreção traqueal	12 / R	23 / S	26 / S	30 / S	32 / S	0 / R	0 / R	33 / S	11 / R	24 / S	21 / S	22 / S	+
HIAE 3338	16/01/2006	secreção traqueal	11 / R	22 / S	28 / S	27 / S	29 / S	12 / R	0 / R	32 / S	12 / R	28 / S	20 / S	24 / S	+
HIAE 4500	28/04/2006	secreção traqueal	0 / R	0 / R	17 / I	27 / S	27 / S	0 / R	0 / R	33 / S	0 / R	29 / S	25 / S	20 / S	+
HIAE 3808	06/03/2006	secreção traqueal	9 / R	0 / R	20 / S	28 / S	28 / S	0 / R	0 / R	29 / S	0 / R	24 / S	22 / S	18 / S	+
HIAE 4800	21/05/2006	secreção traqueal	0 / R	0 / R	31 / S	28 / S	21 / S	0 / R	0 / R	31 / S	0 / R	27 / S	28 / S	20 / S	+
HIAE 5399	03/07/2006	secreção traqueal	0 / R	0 / R	17 / I	29 / S	36 / S	0 / R	0 / R	30 / S	0 / R	25 / S	23 / S	22 / S	+
LMG 10874		cultura de sangue humano	Não foram realizados testes de resistência para essa amostra												
LMG 22072		fluido cefalorraquidiano	0 / R	12 / R	0 / R	23 / S	23 / S	10 / R	0 / R	26 / S	0 / R	25 / S	19 / S	16 / S	+
HIAE 5180	13/06/2006	lesão no membro inferior esquerdo	0 / R	0 / R	31 / S	23 / S	34 / S	12 / R	0 / R	33 / S	0 / R	31 / S	33 / S	12 / R	+
HIAE 4920	29/05/2006	secreção traqueal	11 / R	0 / R	0 / R	0 / R	31 / S	0 / R	0 / R	31 / S	0 / R	21 / S	19 / S	25 / S	+
HIAE 4249	03/04/2006	secreção traqueal	10 / R	0 / R	21 / S	9 / R	29 / S	0 / R	0 / R	17 / S	0 / R	0 / R	13 / R	0 / R	+
HIAE 1911	22/08/2005	secreção traqueal	8 / R	0 / R	20 / S	22 / S	30 / S	0 / R	0 / R	26 / S	0 / R	17 / S	10 / R	0 / R	+

HIAE 4948	29/05/2006	secreção traqueal	0 / R	0 / R	31 / S	28 / S	21 / S	0 / R	0 / R	31 / S	0 / R	27 / S	22 / S	0 / R	+
HIAE 3182	29/12/2006	secreção traqueal	0 / R	0 / R	18 / S	20 / I	23 / S	10 / R	0 / R	17 / S	0 / R	24 / S	19 / S	0 / R	+
HIAE 1990	29/08/2006	secreção traqueal	0 / R	0 / R	10 / R	26 / S	27 / S	0 / R	0 / R	25 / S	0 / R	0 / R	13 / R	12 / R	+
LMG 958 <i>S. maltophilia</i>		necrose renal	24 / S	16 / I	29 / S	36 / S	345 / S	15 / I	0 / R	36 / S	23 / S	26 / S	27 / S	18 / S	+
HIAE 5188	14/06/2006	secreção ocular	18 / S	0 / R	28 / S	38 / S	30 / S	10 / R	0 / R	40 / S	0 / R	38 / S	26 / S	18 / S	+
LMG 10992		secreção pulmonar	0 / R	0 / R	22 / S	27 / S	31 / S	13 / R	0 / R	31 / S	0 / R	26 / S	23 / S	15 / S	+
HIAE 4638	10/05/2006	secreção traqueal	0 / R	0 / R	21 / S	23 / S	23 / S	0 / R	0 / R	27 / S	0 / R	21 / S	21 / S	23 / S	+
HIAE 4471	24/04/2006	secreção traqueal	Não foram realizados testes de resistência para essa amostra												
HIAE 2505	27/10/2005	secreção de dreno	0 / R	16 / I	10 / R	36 / S	25 / S	15 / I	0 / R	36 / S	0 / R	26 / S	24 / S	0 / R	+
HIAE 2737	21/11/2005	secreção traqueal	12 / R	0 / R	16 / I	29 / S	34 / S	0 / R	0 / R	32 / S	0 / R	27 / S	18 / I	0 / R	+
LMG 10991		Membro inferior infectado	10 / R	24 / R	28 / S	38 / S	30 / S	10 / R	0 / R	32 / S	32 / S	38 / S	24 / S	34 / S	+
LMG 11004		urina	0 / R	0 / R	24 / S	30 / S	0 / R	10 / R	0 / R	34 / S	0 / R	0 / R	22 / S	25 / S	+
LMG 10851		cultura de sangue humano	0 / R	0 / R	26 / S	34 / S	36 / S	13 / R	0 / R	40 / S	0 / R	28 / S	16 / I	38 / S	+
LMG 10877		paciente com sinusite, pus	0 / R	0 / R	20 / S	26 / S	28 / S	0 / R	0 / R	29 / S	0 / R	27 / S	22 / S	25 / S	+
LMG 10989		bílis	16 / I	0 / R	26 / S	32 / S	30 / S	12 / R	8 / R	40 / S	24 / S	28 / S	30 / S	8 / R	+
LMG 10857		cultura de sangue humano	0 / R	0 / R	29 / S	24 / S	25 / S	0 / R	0 / R	28 / S	0 / R	26 / S	13 / R	0 / R	+
LMG 22073 <i>S. acidaminiphila</i>		reator UASB	30 / S	21 / I	29 / S	35 / S	33 / S	16 / I	13 / R	37 / S	42 / S	17 / S	31 / S	28 / S	+
LMG 22074 <i>S. nitritireducens</i>		biofiltro	Não foram realizados testes de resistência para essa amostra												
DSMZ 17805 <i>S. koreensis</i>		composto (palha + esterco)	39 / S	0 / R	31 / S	28 / S	32 / S	40 / S	37 / S	29 / S	41 / S	0 / R	32 / S	25 / S	-

MR: Multirresistência a antibióticos. Amoxicilina + Ac. Clavulânico (AMC), Aztreonam (ATM), Ceftazidima (CAZ), Cefotaxima (CTX), Ciprofloxacina (CIP), Cloranfenicol (CLO), Imipenem (IPM), Levofloxacina (LVX), Meropenem (MER), Cotrimoxazol (SUT), Tetraciclina (TET) e Tobramicina (TOB).

Padrões de resistência:

 Muito resistente Resistente Sensível

ANEXO C – Árvore filogenética construída para o gene *atpD*

Anexo C – Filograma construído para o gene *atpD* utilizando o programa MEGA5, o método *Neighbor-joining*, parâmetro distância p e com teste de *bootstrap* em 1000 réplicas.

ANEXO D – Árvore filogenética construída para o gene *gapA*.

Anexo D – Filograma construído para o gene *gapA* utilizando o programa MEGA5, o método *Neighbor-joining*, parâmetro distância p e com teste de *bootstrap* em 1000 réplicas.

ANEXO E – Árvore filogenética construída para o gene *guaA*.

Anexo E – Filograma construído para o gene *guaA* utilizando o programa MEGA5, o método *Neighbor-joining*, parâmetro distância p e com teste de *bootstrap* em 1000 réplicas.

ANEXO F- Árvore filogenética construída para o gene *nuoD*.

Anexo F – Filograma construído para o gene *nuoD* utilizando o programa MEGA5, o método de *Neighbor-joining*, parâmetro distância p e com teste de *bootstrap* em 1000 réplicas.

ANEXO G – Árvore filogenética construída para o gene *rpoA*.

Anexo G – Filograma construído para o gene *rpoA* utilizando o programa MEGA5, o método de *Neighbor-joining*, parâmetro distância p e com teste de *bootstrap* em 1000 réplicas.

ANEXO H – Genes e amostras para as quais as sequências de fragmentos específicos foram obtidas no GenBank.

GENES	AMOSTRAS
<i>gapA</i>	LMG 10853 ; LMG 10991
<i>guaA</i>	LMG 958 ; LMG 22073 ; LMG 22074 ; LMG 10874 ; LMG 10991 ; LMG 11114 ; LMG 22072
<i>nuoD</i>	LMG 22074 ; DSMZ 17805 ; LMG 10853 ; LMG 10857 ; LMG 10874 ; LMG 10877 ; LMG 11114 ; LMG 22072
<i>ppsA</i>	DSMZ 17805
<i>recA</i>	LMG 958 ; LMG 22073 ; DSMZ 17805 ; LMG 10853 ; LMG 10857 ; LMG 10874 ; LMG 10877

ANEXO I – Artigo científico enviado para a revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz: PHYLOGENETIC ANALYSIS OF *Stenotrophomonas* spp. NOSOCOMIAL ISOLATES REVEALS COMMUNITY-ACQUIRED ORIGIN.

**PHYLOGENETIC ANALYSIS OF *Stenotrophomonas* spp.
NOSOCOMIAL ISOLATES REVEALS COMMUNITY-ACQUIRED
ORIGIN**

Journal:	<i>Memórias do Instituto Oswaldo Cruz</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Cerezer, Vinicius; Faculdade de Medicina da USP, Pediatria Bando, Silvia; Faculdade de Medicina da USP, Pediatria Pasternak, Jacyr; Hospital Israelita Albert Einstein, Franzolin, Marcia; Instituto Butantan, Laboratório de Bacteriologia Moreira-Filho, Carlos; Faculdade de Medicina da USP, Pediatria
Keyword:	<i>Stenotrophomonas</i> , phylogeny, community-acquired infections

SCHOLARONE™
Manuscripts

Running title: *Stenotrophomonas* clonal complexes

Title: **PHYLOGENETIC ANALYSIS OF *Stenotrophomonas* spp. NOSOCOMIAL ISOLATES REVEALS COMMUNITY-ACQUIRED ORIGIN**

Vinicius Godoy Cerezer¹, Silvia Yumi Bando¹, Jacyr Pasternak², Marcia Regina Franzolin³, & Carlos Alberto Moreira-Filho¹

¹Departamento de Pediatria, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

²Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, SP, Brasil

³Laboratório de Bacteriologia, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brasil

Corresponding Author:

Prof. Dr. Carlos Alberto Moreira-Filho

Departamento de Pediatria da FMUSP

Av. Dr. Enéas Carvalho Aguiar, 647, 5º. Andar

05403-900, São Paulo, SP, Brazil

tel. 55-11- 2661-8606; cmoreira@hc.fm.usp.br

Key words: *Stenotrophomonas*; phylogeny; community-acquired infections

Financial support: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (2010/04115-9)

Abstract

Multilocus Sequence Typing was performed for phylogenetic analysis of nosocomial isolates of *Stenotrophomonas* spp. and of environmental and clinical strains of *S. maltophilia*. Biochemical and multidrug resistance profiles of nosocomial and clinical strains were determined. The inferred phylogenetic profile showed high clonal variability, what correlates with the adaptability process of *Stenotrophomonas* to different habitats. Two clinical isolates subgroups of *S. maltophilia* sharing high phylogenetic homogeneity presented intergroup recombination thus indicating the high permissivity to horizontal gene transfer, a mechanism involved in the acquisition of antibiotic resistance and expression of virulence factors. Moreover, for most of the clinical strains studied here, phylogenetic inferences can be made with the use of the *ppsA* gene sequence data only. Therefore the sequencing of just one specific fragment of this gene would allow, in many cases, to determine whether the infection with *S. maltophilia* was caused by a strain already present in the nosocomial environment, or by bacteria introduced from the community in this environment. Finally, phenotypic data showed that even closely phylogenetic related nosocomial isolates and clinical strains do not share the same metabolic profile, thus indicating their community-acquired origin.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Introduction

The genus *Stenotrophomonas* is genetically and phenotypically heterogeneous (Ryan et al., 2009; Vasileuskaya-Schulz et al., 2011), presently encompassing twelve recognized species validated in the List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature (<http://www.bacterio.cict.fr/s/stenotrophomonas.html>). *S. maltophilia*, the genus type species, besides its biotechnological importance (nitrogen fixing, stimulation of plant growth), has gained clinical importance in the last two decades, being the only specie of the genus *Stenotrophomonas* found in the environment and also as an opportunist human pathogen (Ryan et al., 2009; Looney et al., 2009; Brooke, 2012). *S. maltophilia* occurs in any aquatic/humid environment and is capable of colonizing and proliferating in abiotic surfaces, such as Teflon, glass and plastics, and it has been isolated in niches as diverse as catheters, dialysis machine tubing, and drinking water reservoirs (Brooke, 2012), causing nosocomial as well as community-acquired infections (Falagas et al., 2009; Nyč and Matějková, 2010; Brooke, 2012; Chang et al., 2012).

S. maltophilia can cause serious bloodstream and respiratory infections in immunocompromised patients, with reports of crude mortality rates between 18% and 69% (reviewed by Garcia Paez et al., 2008). *S. maltophilia* infections have great relevance in pediatric hospitals, being associated to high morbimortality rates (crude mortality rates around 40%) in ICU (Intensive Care Unit)-hospitalized and/or immunocompromised patients (Wu et al., 2006; Mutlu et al., 2011). Surveys from different geographic regions report an increasing rate of *S.maltophilia* infections in the last decade, probably associated with an escalation of invasive procedures, the spread of naturally carbapenen-resistant

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

S. maltophilia and the empirical use of broad spectrum antibiotics (Looney et al., 2009; Nyč and Matějková, 2010; Mutlu et al., 2011; Fihman et al., 2012; Garazi et al., 2012). Furthermore, *S. maltophilia* is not exclusively a nosocomial pathogen, since it has been associated to community-acquired infections, mainly affecting patients with some kind of comorbidity (Falagas et al., 2009; Chang et al., 2012) and mostly related to water supply contamination (Brooke, 2012). In a recent survey of *S. maltophilia* bloodstream infections in Taiwan between 2008 and 2011 (153 cases), Chang et al. (2012) found that 38.6% were community-onset (48.5% community acquired and 52.8% healthcare-associated).

S. maltophilia has high-level intrinsic resistance to many unrelated antibiotics (Nyc and Matejkova, 2010; Brooke, 2012). Besides multidrug- efflux pumps and low outer membrane permeability, this bacterium can also acquire antibiotic resistance by horizontal transfer of resistance genes located on plasmids, transposons and integrons (Crossman et al., 2008; Sanchez et al., 2009; Looney et al., 2009; Hu et al., 2011; Brooke, 2012). The remarkable capacity of *S. maltophilia* for acquiring genetic factors of resistance to antibiotics and biocides show the importance of conducting resistance profile and phylogenetic studies in clinical isolates aiming to identify the origins of horizontal genetic transmission (environmental, nosocomial) and isolates with augmented pathogenic potential (Kaiser et al., 2009; Brooke, 2012).

Multilocus sequencing typing (MLST) has proven to be a reliable mean for inter- and intra-species delineation of *Stenotrophomonas* spp. and a highly portable standard for strain characterization (Kaiser et al., 2009; Vasileuskaya-Schulz et al., 2011). Moreover, MLST provides an adequate window of

discrimination for distinguishing among clusters of closely related isolates (clonal complexes) and, therefore, for unraveling horizontally transferred genetic information, because it modifies the composition inside clonal groups (Maiden, 2006; Turner and Feil, 2007; Kaiser et al., 2009; Wiedenbeck and Cohan, 2011). Here we used MLST and phylogenetic analysis, as well as biochemical and multidrug resistance profiles, for characterizing nosocomial isolates and clinical strains of *Stenotrophomonas* spp. and for identifying community- and hospital-acquired origin of nosocomial isolates.

Material and Methods

***Stenotrophomonas* spp. nosocomial isolates and strains** - Twenty-nine nosocomial isolates obtained at Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE), São Paulo, SP, Brazil, and thirteen clinical strains, five environmental strains and five type-strains (one clinical and four environmental) from different collections, in a total of 52 bacterial samples (Table I), were selected for phylogenetic and phenotypic analyses for determining their phylogenetic profiles and association with biochemical and multidrug resistance characteristics. Fourteen of the HIAE nosocomial isolates were collected from patients hospitalized in the Intensive Care Unit. The clinical and environmental strains came from the Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms / Laboratorium voor Microbiologie of Universiteit Gent (BCCM / LMG, Gent, Belgium, <http://bccm.belspo.be/index.php>) The clinical strains were collected between 1976 and 1995 having different geographical origins. One of the five *Stenotrophomonas* type-strains was obtained from the German Culture Deutsche Sammlung von und Mikroorganismen Zellkulturen GmbH (DSMZ

Braunschweig, Germany) and the remaining four came from the BCCM / LMG culture collection.

Bacterial strains were preserved in Trypticase Soy Broth (TSB, Difco Laboratories, Detroit, Michigan) with glycerol (10% v/v) at -80°C. Nosocomial isolates were grown in TSB and, subsequently, these samples were cultivated on Trypticase Soy Agar (TSA, Difco Laboratories, Detroit, Michigan) to check for any eventual contamination. Belonging to the genus *Stenotrophomonas* was confirmed by sequencing of a 500 bp fragment of the 16S rRNA gene (Clarridge, 2004).

Biochemical and Drug Resistance Tests - Biochemical phenotyping of nosocomial isolates and bacterial strains was attained by using the API 20 NE kit (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, France). Nitrogen-fixing capability - a common characteristic of environmental *Stenotrophomonas* strains - was determined for all the nosocomial and clinical strains here studied by means of the acetylene reduction assay (Liba et al., 2006), using the nitrogen fixing strain *Azospirillum brasilense* Sp7T as positive control (Liba et al., 2006).

The antibiotic resistance profiles of *Stenotrophomonas* nosocomial isolates and strains were determined by using susceptibility test discs (Bauer et al., 1966). Bacteria were grown on Mueller-Hinton agar in the presence of the following antibiotic discs (Cefar Diagnóstica Ltda., São Paulo, Brazil): amoxicillin/clavulanic acid, 30 µg; imipinem, 10 µg, meropenem, 10 µg, ceftazidime, 30 µg, cefotaxime, 30 µg, aztreonam, 30 µg, ciprofloxacin, 5 µg, levofloxacin, 5 µg, chloramphenicol, 30 µg, trimethoprim-sulfamethoxazole, 25 µg; tetracycline, 30 µg and tobramycin, 10 µg. The results were evaluated according to CLSI (2005).

Genomic DNA extraction - Total genomic DNA of bacterial strains was extracted by using the Wizard Genomic DNA Purification Kit (cat. no. A1120, Promega Corporation, Madison, WI) according to the manufacturer's instructions. DNA quality and concentration were determined through 1.0% agarose gel electrophoresis using the Invitrogen Low Mass ladder (cat. no. 10068013, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) and ethidium bromide staining and visualization under UV light.

Phylogenetic analysis by Multilocus Sequence Typing (MLST) - Seven constitutive genes were chosen for phylogenetic analysis. Six of these genes - *atpD*, *gapA*, *guaA*, *ppsA*, *nuoD*, *recA* - were used in the work of Kaiser et al. (2009), where MLST was firstly employed for inferring the population structure of the genus *Stenotrophomonas*. We also included the constitutive gene *rpoA* (Ramos et al., 2011). All primer sequences and amplicon sizes were described in these two papers.

Amplification conditions for *gapA*, *guaA*, *ppsA*, *recA* and *rpoA* were: 1X Taq DNA polymerase buffer, 1.5 mM MgCl₂, 2 U of Taq DNA polymerase (cat. no. 10342020 Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA), 25 mM of dNTPs, 10 mM of forward and reverse primers and water to adjust the final reaction volume to 50 µL. The amount of DNA per reaction ranged from 20 to 40 ng depending on the size of the gene fragment to be amplified. The PCR reaction was performed for 40 cycles at the following temperatures: denaturation of DNA at 95 ° C / 6 min, annealing at 62 ° C/15 sec and extension at 72 ° C / 1 min and 15 sec. A final extension was performed at 72 ° C / 7 min In order to amplify the sequences of *atpD* and *nuoD* the annealing temperatures were decreased to 60°C and 48°C, respectively. The amplified products were purified with GFX™

1
2
3 PCR DNA and Gel Band Purification Kit (cat. No. 27-9602-01, GE Healthcare,
4
5 Buckinghamshire, UK), following the manufacturer's instructions.
6

7
8 The sequencing reactions were performed using the Big Dye Terminator
9
10 v3.1 Cycle Sequencing Kit (catalog No. 4337455, Applied Biosystems, Austin,
11
12 Texas) and precipitated with the Big Dye XTerminator Purification Kit (catalog
13
14 No. 4376486, Applied Biosystems, Austin, TX) following the manufacturer's
15
16 instructions. The cycling temperatures were 95 ° C / 20 sec for denaturing, 50-
17
18 55 ° C / 15 sec for annealing and 60 ° C / 1 min for elongation. This cycle was
19
20 repeated 30 times. The sequences were read in the ABI 3500 Genetic Analyzer
21
22 (Applied Biosystems, Forest City, California).
23
24

25
26 Sequence quality was analyzed and consensus sequences were
27
28 identified by using the software Chromas Pro version 1.5 (Technelysium Pty
29
30 Ltd, <http://www.technelysium.com.au/chromas.html>). After obtaining the
31
32 consensus sequences for each bacterial strain, these sequences were exported
33
34 in FASTA format for phylogenetic inference using the software MEGA 5
35
36 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, Tamura et al., 2011). The
37
38 phylogenetic trees were constructed by the neighbor-joining (NJ) method
39
40 (Saitou and Nei, 1987; Zhang and Sun, 2008), based on the p-distance
41
42 (Tamura and Nei, 1993; Tamura et al. 2004).
43
44

45
46 The GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) accession numbers for
47
48 gene nucleotide sequences with 200bp or more are: atpD, KC209168 -
49
50 KC209214; recA, KC209215 - KC209254; ppsA, KC209255 - KC209300; gapA,
51
52 KC209301 - KC209345; nuoD, KC209346 - KC209384; guaA, KC209385 -
53
54 KC209424. These data were publicly released by GenBank on February 17,
55
56 2013.
57
58
59
60

Analysis of nucleotide sequence diversity was performed for the nosocomial isolates, clinical strains and type strains using the software DNAsp (DNA Sequence Polymorphism version 4.10, Rozas et al. 2003) for *atpD*, *gapA*, *guaA*, *nuoD*, *ppsA*, *recA* and *rpoA* genes (Table IV). The parameter P_i (nucleotide diversity) corresponds to the average number of nucleotide differences per site between two sequences (Nei, 1987; Nei and Miller, 1990) and its sampling variance (Nei, 1987).

Results

Biochemical and Drug Resistance Tests - All bacterial strains, with the exception of the four environmental type strains, five LMG well characterized environmental strains, three nosocomial isolates and seven clinical strains were tested biochemically and identified as belonging to the genus *Stenotrophomonas*, what was confirmed for all clinical and nosocomial isolates by 16S rRNA gene sequencing. The results showed extensive biochemical similarity between these isolates (see Table II). Moreover, all nosocomial isolates and clinical strains were found to be unable to reduce acetylene, revealing their incapacity for fixing nitrogen.

The 42 bacterial strains tested (Table III) showed sensibility to LVX. The sensibility to other antimicrobials was slightly or considerably lower: CHL (97.6%), CIP (92.9%), STX (90.5%), CAZ (90.5%), TET (88.1%) and TOB (71.4%). The isolates were resistant to IPM (97.6%), ATM (85.7%), AMC (83.3%), MER (81%), and CTX (71.4%). Interestingly, the majority of clinical isolates studied here shows resistance to various beta-lactams, a characteristic

of clinical isolates of *S. maltophilia* (Gould and Avison, 2006; Gould et al., 2006).

MLST phylogenetic analysis- In order to conduct phylogenetic studies using MLST data, fragments of seven constitutive genes were amplified and sequenced as described above. The consensus sequences were obtained through the software Chromas Pro version 1.5 and the alignment was done using the software Mega 5. For gene sequence alignment we used, in addition to the sequences here obtained, sequences deposited in GenBank® (Kaiser et al. 2009, Vasileuskaya-Schulz et al. 2011) as indicated in Table I.

After sequence alignment, fragments sized 136 to 401 nucleotides for the *atpD*, *gapA*, *guaA*, *nuoD*, *ppsA*, *recA* and *rpoA* genes were used for nucleotide diversity and phylogenetic analyses. The gene with the highest number of polymorphic sites (87 sites) was *guaA*, followed by *recA* (66 sites), and the genes *rpoA*, *ppsA* and *gapA* had the higher rates of nucleotide diversity (Table IV).

Concatenated sequences were firstly obtained using fragment sequences of *atpD*, *gapA*, *guaA*, *ppsA*, *nuoD*, *recA* and *rpoA* from 47 bacterial samples (Fig. 1). These concatenated sequences were utilized to construct a NJ tree (based on p-distance). The concatenated phylogram (Fig. 1) shows the division of these 47 strains in two major groups: group A contains three type-strains of environmental species of the genus *Stenotrophomas* and group B includes all nosocomial strains and type-strains of *S. maltophilia* and *S. pavani*. Interestingly, group B is divided into three subgroups: BI and B.II sharing high phylogenetic homogeneity and subgroup B.III, more heterogeneous, encompassing three clusters of strains, what indicates the occurrence of inter-

subgroup recombination. Phylograms were also constructed for *ppsA* and *recA* gene fragments. The *ppsA* phylogram (Fig. 2) shows a tree topology very similar to the concatenated tree depicted in Fig 1. On the other hand, the *recA* phylogram (Fig. 3) shows a shuffling between the B.III clusters, thus favoring the hypothesis of inter-subgroup recombination. It is worth to note that groups B.I and B.III comprise isolates and strains with higher resistance to antibiotics.

Phylogenetic analysis including environmental strains of *S. maltophilia* - A phylogram for analyzing the genetic similarity between clinical and environmental isolates of the genus *Stenotrophomonas* was built using the concatenated fragment sequences of the genes *atpD*, *gapA*, *guaA*, *ppsA*, *nuoD* and *recA* including all strains of Table I (Figure 4). In this phylogram it is possible to observe the formation of two groups of strains with higher phylogenetic proximity: group A contains only three environmental type-strains of *Stenotrophomonas*. Group B contains all the other clinical and environmental strains plus the type-strains of *S. maltophilia* and *S. pavarii*. Considering the phylogenetic proximities, group B can be divided in four subgroups (B.I to B.IV). B.I includes the five environmental strains of *S. maltophilia* and four nosocomial strains. B.II contains the type-strain of *S. maltophilia* and 12 nosocomial strains. B.III encompasses seven nosocomial isolates. B.IV contains the type-strain of *S. pavarii* and 14 nosocomial strains. The subgroup B.IV is subdivided into three small clusters: B.IV.1 and B.IV.2 encompass only nosocomial strains and B.IV.3 encompasses nosocomial strains and the type-strain of *S. pavarii*.

It is important to note that the subgroups and clusters B.II, B.III, B.IV.1, B.IV.2 and B.IV.3 have high phylogenetic similarity (bootstrap values between 99 and 100, see Kaiser et al. (2009). Moreover, most of the strains in the

groups B.II, B.III, B.IV.1 and B.IV.2 exhibit some intra-group metabolic differences, whereas the samples grouped into B.IV.1 show the same biochemical profile (Table II). This phenotypic divergence between strains and isolates belonging to the same phylogenetic group indicates multiplicity of origin, as will be discussed later. Finally, the phylogram depicted in Figure 4 also shows that the majority of nosocomial isolates and clinical strains are phylogenetically distinct from environmental strains of *S. maltophilia*.

Discussion

This study adopted a phylogenetic approach - based on analysis of nucleotide sequences of fragments of specific genes by constitutive MLST (Multilocus Sequencing Typing) - to investigate the clonal variability of nosocomial isolates and clinical strains of the genus *Stenotrophomonas*, which were also characterized biochemically and for their antibiotic resistance profile. This study allowed us to correlate the phylogenetic and phenotypic profiles with a multiclonal origin, reflecting the process of adaptability of bacteria of the genus *Stenotrophomonas* to different habitats.

A common phenotypic trait of all clinical strains and nosocomial isolates of *Stenotrophomonas* spp studied in this work is their incapacity for nitrogen fixation. Biological nitrogen fixation is typical of environmental *S. maltophilia* (as well as of other *Stenotrophomonas* species) and depends on the nitrogenase structural gene *nifH* (Zher et al., 2003; Liba et al., 2006; Duc et al., 2009). The expression of *nif* genes is controlled by nitrogen availability or the energetic status of the bacterial cell (Steunou et al., 2008). Therefore, one is tempted to hypothesize that the loss of the *nifH* gene cluster (Zher et al., 2003) could be an

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

energy-saving adaptive event favoring the transition from free-living to opportunistic pathogen phenotype.

Phylogenetic analysis by MLST clearly showed that the nosocomial isolates and clinical strains of *Stenotrophomonas* spp. here studied have multiclonal origin and that the nosocomial isolates are grouped separately from environmental strains of the genus *Stenotrophomonas* (excepting *S. pavarii*). The observed pattern is that of clonal complexes: groups are closely related, but not identical, with probable origin in a relatively recent common ancestor (Maiden, 2006; Turner and Feil, 2007; Kaiser et al., 2009).

The phylogenetic groups and subgroups (see Figures 1 and 4) show high values (higher than 80) of bootstrap (Kaiser et al., 2009), indicating that amount of genetic variability here analyzed was adequate for defining five clonal groups among the clinical samples included in this study. Importantly, the 29 clinical samples isolated from HIAE patients (of which 14 were collected from ICU patients, see Table 1) between August 2005 and July 2006 and 13 strains of clinical LMG, isolated at different times (between the years 1976-1995) and with distinct geographical origins, are positioned inside the subgroups B.II and B.IV identified in the phylograms shown in Figures 1 and 4, respectively. Altogether, these data are consistent with a scenario of community origin infections.

The multiclonal origin of clinical strains and nosocomial clinical isolates studied here is consistent with the characteristics of emerging and opportunistic pathogen described for *S. maltophilia* (Brooke, 2012). Moreover, this characterization is supported by detection of multidrug resistance in all these isolates and strains, what is a distinctive property of opportunistic pathogens of environmental origin (Ryan et al., 2009; Brooke, 2012). In the case of this study,

1
2
3 it is worth to note that the majority of clinical isolates showed resistance to beta-
4
5 lactams, which is typical of clinical isolates of *S. maltophilia* (Gould and Avison,
6
7 2006; Gould et al., 2006; Fihman et al., 2012).
8

9
10 It is also interesting to note that some strains and clinical isolates with
11
12 large phylogenetic proximity, with bootstrap values between 99 and 100 (see
13
14 Figure 4 and Table II), which could be considered as belonging to the same
15
16 clonal group, do not share full identity in the metabolic profile, which indicates
17
18 the community origin of these isolates and adaptive plasticity of its genome.
19

20
21 Phylogenetic analysis indicates the occurrence of intergroup genetic
22
23 recombination involving subgroup B.III: there is clear separation between
24
25 subgroups BI and B.III in the phylogram generated from *ppsA* fragment gene
26
27 sequence but there is an overlapping of part of samples of B.III.2 and B.III.3
28
29 subgroups in the phylogram generated from *recA* fragment gene sequence (see
30
31 Figures 2 and 3). This result indicates the occurrence of a mechanism of
32
33 horizontal transfer of genetic material that may occur by the insertion of phage,
34
35 plasmids, action of transposons, etc. (Feil et al. 2001; Turner and Feil, 2007).
36
37 Moreover, it is well established that *S. maltophilia* can acquire genes involved in
38
39 the resistance to antimicrobial agents and antibiotics from other environmental
40
41 bacteria through horizontal gene transfer (Sanchez et al., 2009, Brooke, 2012).
42
43
44

45
46 Horizontal gene transfer events can modify the composition of clonal
47
48 groups as evidenced by studies of MLST (Maiden, 2006, Turner and Feil, 2007;
49
50 Kaiser et al., 2009; Wiedenbeck and Cohan, 2011). This is precisely the case of
51
52 the isolates that integrate the BI and B.III subgroups. This finding by MLST
53
54 analysis indicates that the genome of subgroup B.III would be permissive to
55
56 gain new factors of virulence and of resistance to antimicrobial agents. In fact,
57
58
59
60

strains of the subgroups BI and B.III are among the most multiresistant to antibiotics in this study (see Table III).

The constitutive genes *guaA*, *gapA*, *ppsA* and *rpoA* showed the highest nucleotide variability among the seven genes selected for phylogenetic analysis by MLST (Table IV). Using data from sequencing of specific fragments of these genes, four phylograms were generated and the phylogram generated from *ppsA* gene fragment sequence showed the discrimination of clonal groups closest to the concatenated phylogram shown in Figure 1. This result has practical interest since it indicates that the sequencing of a fragment of 257 bp of the *ppsA* gene can serves to the discrimination of clonal groups of isolates of the genus *Stenotrophomonas*. This simplified scheme can be employed in a clinical laboratory to check whether or not an outbreak - triggered by a specific clonal group - a nosocomial environment.

The results of this work show that phylogenetic analysis by MLST is an important tool for the investigation of the genus *Stenotrophomonas* as emerging pathogen. Such analysis is appropriate to identify the nosocomial or community origin of infections, serving to detect outbreaks and allowing a study of the population structure of the pathogen that is important for molecular epidemiology (Maiden, 2006; Turner and Feil, 2007; Kaiser et al., 2009). Moreover, studies using MLST are useful to investigate the origin of community infections by *S. maltophilia* and identify intermediate hosts, an area that remains unclear (Brooke, 2012). As emphasized by Maiden (2006), "MLST provides universal and rapid means for the identification of clonal complexes corresponding to hyperinvasive strains while they are spreading globally."

Acknowledgements

We are deeply indebted to Waldir Pereira Elias Jr. and Cecilia Mari Abe, from the Laboratory of Bacteriology, Instituto Butantan for valuable suggestions and laboratorial support, and to Leandro R. Ferreira, from the Laboratory of Pediatric Genomics, Department of Pediatrics, FMUSP, for performing part of the DNA sequencing used in this work. We also thank Patricia L. Ramos, Department of Biophysics, UNIFESP, for providing most of the environmental and clinical strains used in this study. This work was partially funded by FAPESP grant 2010/04115-9.

References

- Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC & Turck M 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 45: 493-6.
- Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Clark K, Lipman DJ, Ostell J & Sayers EW 2012. GenBank. *Nucleic Acids Research* 40: 48-53.
- Brooke JS 2012. *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging global opportunistic pathogen. *Clin Microbiol Rev* 25: 2-41.
- Chang YT, Lin CY, Lu PL, Lai CC, Chen TC, Chen CY, Wu DC, Wang TP, Lin CM, Lin WR, Chen YH 2012. *Stenotrophomonas maltophilia* bloodstream infection: Comparison between community-onset and hospital-acquired infections. *J Microbiol Immunol Infect* Oct 2. pii: S1684-1182(12)00175-2. doi: 10.1016/j.jmii.2012.08.014. [Epub ahead of print].
- Clarridge JE 3rd 2004. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 17: 840-862.

CLSI - Clinical Laboratory Standard Institute 2005. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*, 15th Information Supplement M100-S15, CLSI, Wayne, Pennsylvania, 177 pp.

Crossman LC, Gould VC, Dow JM, Vernikos GS, Okazaki A, Sebahia M, Saunders D, Arrowsmith C, Carver T, Peters N, Adlem E, Kerhornou A, Lord A, Murphy L, Seeger K, Squares R, Rutter S, Quail MA, Rajandream MA, Harris D, Churcher C, Bentley SD, Parkhill J, Thomson NR, Avison MB 2008. The complete genome, comparative and functional analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* reveals an organism heavily shielded by drug resistance determinants. *Genome Biol* 9: R74.

Duc L, Neuenschwander S, Rehrauer H, Wagner U, Sobek J, Schlapbach R, Zeyer J 2009. Development and experimental validation of a nifH oligonucleotide microarray to study diazotrophic communities in a glacier forefield. *Environ Microbiol* 11:2179-89.

Falagas ME, Kastoris AC, Vouloumanou EK, Dimopoulos G 2009. Community-acquired *Stenotrophomonas maltophilia* infections: a systematic review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 28: 719-730.

Feil EJ, Holmes EC, Bessen DE, Chan MS, Day NP, Enright MC, Goldstein R, Hood DW, Kalia A, Moore CE, Zhou J, Spratt BG 2001. Recombination within natural populations of pathogenic bacteria: short-term empirical estimates and long-term phylogenetic consequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 182-187.

Fihman V, Le Monnier A, Corvec S, Jauregui F, Tankovic J, Jacquier H, Carbonnelle E, Bille E, Illiaquer M, Cattoir V, Zahar JR 2012. *Stenotrophomonas maltophilia* - the most worrisome threat among unusual non-

1
2
3 fermentative gram-negative bacilli from hospitalized patients: a prospective
4 multicenter study. *J Infect.* 64:391-8.

5
6
7 Garazi M, Singer C, Tai J, Ginocchio CC 2012. Bloodstream infections
8 caused by *Stenotrophomonas maltophilia*: a seven-year review. *J Hosp Infect*
9 81: 114-118.

10
11
12 Garcia Paez JI, Costa SF 2008. Risk factors associated with mortality of
13 infections caused by *Stenotrophomonas maltophilia*: a systematic review. *J*
14 *Hosp Infect* 70: 101-8.

15
16
17 Gould V, Avison MB 2006. SmeDEF-mediated antimicrobial drug
18 resistance in *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates having defined
19 phylogenetic relationships. *J Antimicrobial Chemother* 57: 1070-1076.

20
21
22 Gould V, Okazaki A, Avison MB 2006. Beta-lactam resistance and β -
23 lactamase expression in clinical *Stenotrophomonas maltophilia* isolates having
24 defined phylogenetic relationships. *J Antimicrob Chemother* 57: 199-203.

25
26
27 Hu LF, Chang X, Ye Y, Wang ZX, Shao YB, Shi W, Li X, Li JB 2011.
28 *Stenotrophomonas maltophilia* resistance to trimethoprim/sulfamethoxazole
29 mediated by acquisition of sul and dfrA genes in a plasmid-mediated class 1
30 integron. *Int J Antimicrob Agents* 37: 230-234.

31
32
33 Kaiser S, Biehler K & Jonas D 2009. A *Stenotrophomonas maltophilia*
34 multilocus sequence typing scheme for inferring population structure. *J Bacteriol*
35 191: 2934-2943.

36
37
38 Liba CM, Ferrara FI, Manfio GP, Fantinatti-Garboggini F, Albuquerque
39 RC, Pavan C, Ramos PL, Moreira-Filho CA & Barbosa HR 2006. Nitrogen-fixing
40 chemo-organotrophic bacteria isolated from cyanobacteria-deprived lichens and
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

their ability to solubilize phosphate and to release amino acids and phytohormones. *J Appl Microbiol* 101: 1076-1086.

Looney WJ, Narita M, Muhlemann K 2009. *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging opportunist human pathogen. *Lancet Infect Dis* 9: 312-23.

Maiden MC 2006. Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu Rev Microbiol* 60: 561-588.

Mutlu M, Yilmaz G, Aslan Y, Bayramoğlu G 2011. Risk factors and clinical characteristics of *Stenotrophomonas maltophilia* infections in neonates. *J Microbiol Immunol Infect* 44: 467-472.

Nei M 1987. Molecular Evolutionary Genetics. Columbia Univ. Press, New York, 512pp.

Nei M & Miller JC 1990. A simple method for estimating average number of nucleotide substitutions within and between populations from restriction data. *Genetics* 125: 873-879.

Nyč O, Matějková J 2010. *Stenotrophomonas maltophilia*: Significant contemporary hospital pathogen - review. *Folia Microbiol (Praha)* 55: 286-294.

Ramos PL, Moreira-Filho CA, Van Trappen S, Swings J, de Vos P, Barbosa HR, Thompson CC, Vasconcelos AT & Thompson FL 2011. An MLSA-based online scheme for the rapid identification of *Stenotrophomonas* isolates. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106: 394-399.

Rozas J, Sánchez-Delbarrio JC, Messeguer X, Rozas R 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.

Ryan RP, Monchy S, Cardinale M, Taghavi S, Crossman L, Avison MB, Berg G, Vander Lelie D, Dow JM 2009. The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nature Reviews Microbiol* 7: 515-525.

Saitou N & Nei M 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-425.

Sanchez MB, Hernandez A, Martinez JL 2009. *Stenotrophomonas maltophilia* drug resistance. *Future Microbiol* 4: 655-660.

Steunou AS, Jensen SI, Brecht E, Becraft ED, Bateson MM, Kilian O, Bhaya D, Ward DM, Peters JW, Grossman AR, Kühl M 2008. Regulation of *nif* gene expression and the energetics of N₂ fixation over the diel cycle in a hot spring microbial mat. *ISME J* 2:364-78.

Tamura K & Nei M 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol* 10: 512-526.

Tamura K, Nei M & Kumar S 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 11030-11035.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol and Evol* 28: 2731-2739.

Turner KM, Feil EJ 2007. The secret life of the multilocus sequence type. *Int J Antimicrob Agents* 29: 129-135.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Vasileuskaya-Schulz Z, Kaiser S, Maier T, Kostrzewa M, Jonas D 2011. Delineation of *Stenotrophomonas* spp. by multi-locus sequence analysis and MALDI-TOF mass spectrometry. *Syst Appl Microbiol* 34: 35-39.

Wiedenbeck J, Cohan FM 2011. Origins of bacterial diversity through horizontal genetic transfer and adaptation to new ecological niches. *FEMS Microbiol Rev* 35: 957-976.

Wu PS, Lu CY, Chang LY, Hsueh PR, Lee PI, Chen JM, Lee CY, Chan PC, Chang PY, Yang TT, Huang LM 2006. *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia in pediatric patients a 10-years analysis. *J Microbiol Immunol Infect* 39: 144-149.

Zehr JP, Jenkins BD, Short SM, Steward GF 2003. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. *Environ Microbiol* 5:539-54.

Zhang W & Sun Z 2008. Random local neighbor joining: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Phylogenet Evol* 47: 117-128.

Figure Legends

Figure 1: Neighbor-joining phylogram (1000 bootstrap replications, p-distance model) derived from concatenation of *atpD*, *guaA*, *gapA*, *nuoD*, *ppsA*, *recA* and *rpoA* gene sequences. Phylogenetic groups and subgroups are indicated by A, B, B.I, B.II, B.III, B.III.1, B.III.2 and B.III.3. The numbers at branch nodes represent bootstrap values ≥ 50 .

Figure 2: Neighbor-joining phylogram (1000 bootstrap replications, p-distance model) for the gene *ppsA*. Phylogenetic groups and subgroups are indicated by A, B, B.I, B.II, B.III, B.III.1, B.III.2 and B.III.3 similarly to the concatenated tree depicted in Fig 1. The numbers at branch nodes represent the bootstrap values.

Figure 3: Neighbor-joining phylogram (1000 bootstrap replications, p-distance model) for the gene *recA*. The phylogenetic groups and subgroups are indicated by A, B, B.I, B.II, B.III, B.III.1, B.III.2 and B.III.3 similarly to the concatenated tree depicted in Fig 1. Note the shuffling between B.III clusters. The numbers at branch nodes represent bootstrap values.

Figure 4: Neighbor-joining phylogram (1000 bootstrap replications, p-distance model) derived from concatenation of *atpD*, *guaA*, *gapA*, *nuoD*, *ppsA* e *recA* gene sequences. Phylogenetic groups and subgroups are indicated by A, B, B.I, B.II, B.III, B.IV, B.IV.1, B.IV.2 and B.IV.3. The numbers at branch nodes represent bootstrap values ≥ 50 .

Table I: Nosocomial isolates, clinical and environmental strains and type-strains of *Stenotrophomonas* spp.

Strains	Source	Isolation date
Nosocomial strains		
HIAE 1911	tracheal secretion	08/22/2005 ^U
HIAE 1990	tracheal secretion	08/29/2005 ^U
HIAE 1998	tracheal secretion	08/30/2005 ^U
HIAE 2229	drain secretion	09/24/2005
HIAE 2336	tracheal secretion	10/04/2005 ^U
HIAE 2425	tracheal secretion	10/17/2005 ^U
HIAE 2505	drain secretion	10/27/2005
HIAE 2737	tracheal secretion	11/21/2005 ^U
HIAE 2947	tracheal secretion	12/07/2005
HIAE 3182	tracheal secretion	12/29/2005
HIAE 3338	tracheal secretion	01/16/2006 ^U
HIAE 3369	human blood culture	01/19/2006
HIAE 3576	tracheal secretion	02/05/2006
HIAE 3673	brochoalveolar lavage	02/15/2006
HIAE 3730	tracheal secretion	02/20/2006 ^U
HIAE 3808	tracheal secretion	03/06/2006 ^U
HIAE 4003	tracheal secretion	03/16/2006
HIAE 4249	tracheal secretion	04/03/2006
HIAE 4471	tracheal secretion	04/24/2006 ^U
HIAE 4500	tracheal secretion	04/28/2006 ^U
HIAE 4600	tracheal secretion	05/06/2006
HIAE 4638	tracheal secretion	05/10/2006
HIAE 4800	tracheal secretion	05/21/2006
HIAE 4920	tracheal secretion	05/29/2006 ^U
HIAE 4948	tracheal secretion	05/29/2006
HIAE 5124	tracheal secretion	06/12/2006 ^U
HIAE 5180	leg ulcer	06/13/2006
HIAE 5188	eye secretion	06/14/2006
HIAE 5399	tracheal secretion	07/03/2006 ^U
Clinical strains		
LMG 957	human blood culture	
LMG 10851	human blood culture	
LMG 10853 *	tracheal secretion	
LMG 10857 *	human blood culture	
LMG 10874 *	human blood culture	
LMG 10877 *	patient suffering from sinusitis, pus	
LMG 10989	bile	
LMG 10991 *	leg, pus	
LMG 10992	expectoration	
LMG 11002	mamilla	
LMG 11004	urine	
LMG 11114	human blood culture	
LMG 22072	cerebrospinal fluid	

Environmental strains

LMG 6608	rizosphere
LMG 11089	<i>Cichorium intybus</i> rizosphere
LMG 11090	<i>Cichorium intybus</i> rizosphere
LMG 11105	Triticum roots
LMG 11108	Triticum roots

Type-strains

LMG 958 <i>S. maltophilia</i>	cortical necrosis
LMG 22073 <i>S. acidaminiphila</i>	mud
LMG 22074 <i>S. nitritireducens</i> *	laboratory scale filter
LMG 25348 <i>S. pavanii</i>	sugar cane
DSMZ 17805 <i>S. koreensis</i> *	compost (straw + manure)

* Genomic sequences deposited in the GenBank® (Benson et al., 2012) were utilized in addition to sequences obtained in our laboratory for the genomic analysis by MLST. ^U Strains collected in the ICU of Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE).

Table II: API 20 NE biochemical profile for five phylogenetically close groups of *Stenotrophomonas* spp. shown in Figure 4 phylogram.

Phylogenetic groups	Strains	NO ₃	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNPG	GLU	ARA	MNE	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	ADI	MLT	CIT	PAC	OX
B.IV.3	HIAE 1998	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
	LMG 25348																					
	HIAE 2229	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
	HIAE 2425	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
	LMG 11114	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
B.IV.2	HIAE 3673	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
	LMG 11002	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
	HIAE 3730	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
	HIAE 4003	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
B.IV.1	HIAE 5124	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
	HIAE 3369	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
	LMG 957	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
	LMG 10853	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
	HIAE 2336	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
	HIAE 2947																					
B.III	HIAE 3338	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
	HIAE 3576	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
	HIAE 4600	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
	HIAE 4500	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
	HIAE 4800	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
	HIAE 3808	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
	HIAE 5399	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
B.II	HIAE 4920	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
	HIAE 4249	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
	HIAE 1911	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-

HIAE 4948	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
HIAE 3182	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
HIAE 1990	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
LMG 958	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
HIAE 5188	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
LMG 10992	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
HIAE 4638	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
HIAE 4471																					
HIAE 2505	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
HAIE 2737	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-

NO₃ – potassium nitrate, TRP – L-tryptophane, GLU - D-glucose, ADH – L-arginine, URE – urea, ESC – esculin, GEL – gelatin, PNPG – 4-nitrophenyl-βD-galactopyranoside, ARA – L-arabinose, MNE – D-mannose, MAN – D-mannitol, NAG – N-acetyl-glucosamine, MAL – D-maltose, GNT – potassium gluconate, CAP – capric acid, ADI – adipic acid, MLT – malic acid, CIT – trisodium citrate, PAC – phenylacetic acid, OX – oxidase.

Table III: Antibiotic resistance profile of *Stenotrophomonas* spp. strains.

Strains	Drugs tested: inhibition halo diameter in mm / resistance level												MR
	AMC	IPM	MER	CAZ	CTX	ATM	CIP	LVX	CHL	SXT	TET	TOB	
HIAE 1998	0 / R	0 / R	0 / R	17 / I	0 / R	0 / R	17 / I	20 / S	22 / S	23 / S	19 / S	0 / R	+
LMG 25348 <i>S. pavanii</i>	Drug tests were not performed for this strain.												
HIAE 2229	0 / R	0 / R	0 / R	22 / S	11 / R	0 / R	22 / S	30 / S	26 / S	29 / S	22 / S	15 / S	+
HIAE 2425	0 / R	0 / R	0 / R	25 / S	12 / R	0 / R	29 / S	33 / S	29 / S	25 / S	18 / I	15 / S	+
LMG 11114	0 / R	0 / R	0 / R	25 / S	15 / I	0 / R	28 / S	33 / S	29 / S	21 / S	21 / S	0 / R	+
HIAE 3673	0 / R	0 / R	0 / R	22 / S	9 / R	0 / R	23 / S	30 / S	20 / S	26 / S	20 / S	23 / S	+
LMG 11002	30 / S	0 / R	28 / S	36 / S	18 / I	0 / R	32 / S	28 / S	34 / S	34 / S	20 / S	28 / S	+
HIAE 3730	0 / R	0 / R	0 / R	16 / I	0 / R	0 / R	27 / S	33 / S	30 / S	27 / S	17 / I	15 / S	+
HIAE 4003	0 / R	0 / R	0 / R	27 / S	15 / I	0 / R	29 / S	33 / S	28 / S	31 / S	25 / S	25 / S	+
HIAE 5124	10 / R	8 / R	13 / R	28 / S	16 / I	0 / R	36 / S	36 / S	26 / S	30 / S	24 / S	26 / S	+
HIAE 3369	12 / R	0 / R	13 / R	30 / S	19 / I	0 / R	31 / S	35 / S	28 / S	24 / S	16 / I	23 / S	+
LMG 957	11 / R	0 / R	10 / R	32 / S	20 / S	0 / R	31 / S	28 / S	21 / S	34 / S	17 / I	21 / S	+
LMG 10853	18 / S	0 / R	20 / S	40 / S	21 / I	0 / R	30 / S	33 / S	32 / S	27 / S	26 / S	22 / S	+
HIAE 2336	10 / R	0 / R	0 / R	16 / I	0 / R	0 / R	15 / R	21 / S	22 / S	20 / S	0 / R	25 / S	+
HIAE 2947	Drug tests were not performed for this strain.												
HIAE 3338	11 / R	0 / R	12 / R	28 / S	12 / R	22 / S	27 / S	32 / S	29 / S	28 / S	20 / S	24 / S	+
HIAE 3576	10 / R	0 / R	22 / S	25 / S	17 / I	16 / I	28 / S	29 / S	26 / S	17 / S	17 / I	23 / S	+
HIAE 4600	12 / R	0 / R	11 / R	26 / S	0 / R	23 / S	30 / S	33 / S	32 / S	24 / S	21 / S	22 / S	+
HIAE 4500	0 / R	0 / R	0 / R	17 / I	0 / R	0 / R	27 / S	33 / S	27 / S	29 / S	25 / S	20 / S	+
HIAE 4800	0 / R	0 / R	0 / R	31 / S	0 / R	0 / R	28 / S	31 / S	21 / S	27 / S	28 / S	20 / S	+
HIAE 3808	9 / R	0 / R	0 / R	20 / S	0 / R	0 / R	28 / S	29 / S	28 / S	24 / S	22 / S	18 / S	+
HIAE 5399	0 / R	0 / R	0 / R	17 / I	0 / R	0 / R	29 / S	30 / S	36 / S	25 / S	23 / S	22 / S	+
LMG 10874	Drug tests were not performed for this strain.												
LMG 22072	0 / R	0 / R	0 / R	0 / R	10 / R	0 / R	23 / S	26 / S	23 / S	25 / S	19 / S	16 / S	+
HIAE 5180	0 / R	0 / R	0 / R	31 / S	12 / R	0 / R	23 / S	33 / S	34 / S	31 / S	33 / S	12 / R	+

HIAE 4920	11 / R	0 / R	0 / R	0 / R	0 / R	0 / R	0 / R	31 / S	31 / S	21 / S	19 / S	25 / S	+
HIAE 4249	10 / R	0 / R	0 / R	21 / S	0 / R	0 / R	9 / R	17 / S	29 / S	0 / R	13 / R	0 / R	+
HIAE 1911	8 / R	0 / R	0 / R	20 / S	0 / R	0 / R	22 / S	26 / S	30 / S	17 / S	10 / R	0 / R	+
HIAE 4948	0 / R	0 / R	0 / R	31 / S	0 / R	0 / R	28 / S	31 / S	21 / S	27 / S	22 / S	0 / R	+
HIAE 3182	0 / R	0 / R	0 / R	18 / S	10 / R	0 / R	20 / I	17 / S	23 / S	24 / S	19 / S	0 / R	+
HIAE 1990	0 / R	0 / R	0 / R	10 / R	0 / R	0 / R	26 / S	25 / S	27 / S	0 / R	13 / R	12 / R	+
LMG 958 <i>S. maltophilia</i>	24 / S	0 / R	23 / S	29 / S	15 / I	23 / S	36 / S	36 / S	34 / S	26 / S	27 / S	18 / S	-
HIAE 5188	18 / S	0 / R	0 / R	28 / S	10 / R	0 / R	38 / S	40 / S	30 / S	38 / S	26 / S	18 / S	+
LMG 10992	0 / R	0 / R	0 / R	22 / S	13 / R	0 / R	27 / S	31 / S	31 / S	26 / S	23 / S	15 / S	+
HIAE 4638	0 / R	0 / R	0 / R	21 / S	0 / R	0 / R	23 / S	27 / S	23 / S	21 / S	21 / S	23 / S	+
HIAE 4471	Drug tests were not performed for this strain.												
HIAE 2505	0 / R	0 / R	0 / R	10 / R	15 / I	0 / R	36 / S	36 / S	25 / S	26 / S	24 / S	0 / R	+
HIAE 2737	12 / R	0 / R	0 / R	16 / I	0 / R	0 / R	29 / S	32 / S	34 / S	27 / S	18 / I	0 / R	+
LMG 10989	16 / I	8 / R	24 / S	26 / S	12 / R	24 / S	32 / S	40 / S	30 / S	28 / S	30 / S	8 / R	+
LMG 11004	0 / R	0 / R	0 / R	24 / S	10 / R	0 / R	30 / S	34 / S	0 / R	0 / R	22 / S	25 / S	+
LMG 10991	10 / R	0 / R	32 / S	28 / S	10 / R	32 / S	38 / S	32 / S	30 / S	38 / S	24 / S	34 / S	+
LMG 10851	0 / R	0 / R	0 / R	26 / S	13 / R	0 / R	34 / S	40 / S	36 / S	28 / S	16 / I	38 / S	+
LMG 10877	0 / R	0 / R	0 / R	20 / S	0 / R	0 / R	26 / S	29 / S	28 / S	27 / S	22 / S	25 / S	+
LMG 10989	16 / I	8 / R	24 / S	26 / S	12 / R	24 / S	32 / S	40 / S	30 / S	28 / S	30 / S	8 / R	+
LMG 10857	0 / R	0 / R	0 / R	29 / S	0 / R	0 / R	24 / S	28 / S	25 / S	26 / S	13 / R	0 / R	+
LMG 22073 <i>S. acidaminiphila</i>	30 / S	13 / R	42 / S	29 / S	16 / I	42 / S	35 / S	37 / S	33 / S	17 / S	31 / S	28 / S	-
LMG 22074 <i>S. nitritireducens</i>	Drug tests were not performed for this strain.												
DSMZ 17805 <i>S. koreensis</i>	39 / S	37 / S	41 / S	31 / S	40 / S	0 / R	28 / S	29 / S	32 / S	0 / R	32 / S	25 / S	-

MR: Multidrug resistance. Amoxicillin/clavulanic acid (AMC); Imipinem (IPM); Meropenem (MER); Ceftazidime (CAZ); Cefotaxime (CTX); Aztreonam (ATM); Ciprofloxacin (CIP); Levofloxacin (LVX); Chloramphenicol (CHL); Trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT); Tetracycline (TET); Tobramycin (TOB).

Resistance levels:

Resistant Intermediate Sensible

Table IV: Nucleotide diversity of the *Stenotrophomonas* spp. analyzed in this study.

Gene	Fragment size (bp)	Polimorphic sites	Mutations		Nucleotide diversity (Pi)
			synonymous	non-synonymous	
<i>atpD</i> (3)	303	24	2	22	0,02013
<i>gapA</i> (1)	314	55	48	7	0,03592
<i>guaA</i> (3)	401	87	8	79	0,02889
<i>nuoD</i> (1)	213	32	28	4	0,02742
<i>ppsA</i> (1)	257	56	46	10	0,03763
<i>recA</i> (1)	254	67	58	9	0,03749
<i>rpoA</i> (1)	136	29	17	12	0,03904

Numbers between parentheses indicate the transcription initiation base position

VII) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Al-Jasser AM. *Stenotrophomonas maltophilia* resistant to trimethoprim-sulfamethoxazole: an increasing problem. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2006; 5:23.

Ansari SR, Hanna H, Hachem R, Jiang Y, Rolston K, Raad I. Risk factors for infections with multidrug-resistant *Stenotrophomonas maltophilia* in patients with cancer. *Cancer.* 2007; 109:2615-22.

Arvanitidou M, Vayona A, Spanakis N, Tsakris A. Occurrence and antimicrobial resistance of Gram-negative bacteria isolated in hemodialysis water and dialysate of renal units: results of a Greek multicentre study. *J Appl Microbiol.* 2003; 95:180-5.

Bakken LR, Olsen RA. The relationship between cell size and viability of soil bacteria. *Microb Ecol.* 1987; 13:103–114.

Bando SY, Andrade FB, Guth BE, Elias WP, Moreira-Filho CA, Pestana de Castro AF. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* genomic background allows the acquisition of non-EPEC virulence factors. *FEMS Microbiol Lett.* 2009; 299:22-30.

Bando SY, Do Valle GR, Martinez MB, Trabulsi LR, Moreira-Filho CA. Characterization of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* strains by RAPD analysis. *FEMS Microbiol Lett.* 1998; 165:159-65.

Bando SY, Trabulsi LR, Moreira-Filho CA. Genetic relationship of diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes among the enteropathogenic *Escherichia coli* O serogroup. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007; 102:169-174.

Barbolla R, Catalano M, Orman BE, Famiglietti A, Vay C, Smayevsky J, Centrón D, Piñeiro SA. Class 1 integrons increase trimethoprim-sulfamethoxazole MICs against epidemiologically unrelated *Stenotrophomonas maltophilia* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48:666-9.

Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol.* 1966; 45:493-6.

Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Clark K, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW. GenBank. *Nucleic Acids Research.* 2012; 40:48-53.

Berg G, Roskot N, Smalla K. Genotypic and phenotypic relationships between clinical and environmental isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Clin Microbiol.* 1999; 37:3594-600.

Berg G, Eberl L, Hartmann A. The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria. *Environ Microbiol.* 2005; 7:673-85.

Berg G, Egamberdieva D, Lugtenberg B, Hagemann M. Symbiosis and Stress: Joint Ventures in Biology. In Seckbach J, Grube M. *Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology.* Springer. 2010. Vol. 17.

Boers SA, Vander Reijden WA, Jansen R. High-throughput multilocus sequence typing: bringing molecular typing to the next level. *PLoS One*. 2012; 7(7):e39630.

Bonatti H, Pruett TL, Brandacher G, Hagspiel KD, Housseini AM, Sifri CD, Sawyer RG. Pneumonia in solid organ recipients: spectrum of pathogens in 217 episodes. *Transplantation Proceedings*. 2009; 41:371-74.

Brooke JS. *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging global opportunistic pathogen. *Clin Microbiol Rev*. 2012; 25:2-41.

Cerezer VG, Ramos PL, Rocha RCS, Machado NFG, Barbosa HR, Gomez JGC, Pasternak J, Moreira-Filho CA. Caracterização molecular de isolados clínicos do gênero *Stenotrophomonas* através dos genes 16S rRNA, *uvrB* e *nifH*. In: Livro de resumos do 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia (2428-1). 2009. Porto de Galinhas, Brasil.

Cheong HS, Lee JA, Kang CI, Chung DR, Peck KR, Kim ES, Lee JS, Son JS, Lee NY, Song JH. Risk factors for mortality and clinical implications of catheter-related infections in patients with bacteraemia caused by *Stenotrophomonas maltophilia*. *Int J Antimicrob Agents*. 2008; 32:538-40.

Chun J. *Computer-Assisted Classification and Identification of Actinomycetes* [thesis]. Newcastle upon Tyne. Newcastle University. 1995.

Clarridge JE 3RD. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev*. 2004; 17:840-62

Coenye T, Vanlaere E, Falsen E, Vandamme P. *Stenotrophomonas africana* Drancourt *et al.* 1997 is a later synonym of *Stenotrophomonas maltophilia* (Hugh 1981) Palleroni and Bradbury 1993. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2004; 54(Pt 4):1235-7.

Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol*. 1995; 49:711-45.

Crossman LC, Gould VC, Dow JM, Vernikos GS, Okazaki A, Sebahia M, Saunders D, Arrowsmith C, Carver T, Peters N, Adlem E, Kerhornou A, Lord A, Murphy L, Seeger K, Squares R, Rutter S, Quail MA, Rajandream MA, Harris D, Churcher C, Bentley SD, Parkhill J, Thomson NR, Avison MB. The complete genome, comparative and functional analysis of *Stenotrophomonas maltophilia* reveals an organism heavily shielded by drug resistance determinants. *Genome Biol*. 2008; 9:R74.

Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev*. 2012; 36:380-407.

Czosnowski QA, Wood GC, Magnotti LJ, Croce MA, Swanson JM, Boucher BA, Fabian TC. Clinical and microbiologic outcomes in trauma patients treated for

Stenotrophomonas maltophilia ventilator-associated pneumonia. *Pharmacotherapy*. 2011; 31:338-45.

De Oliveira-Garcia D, Dall'Agnol M, Rosales M, Azzuz AC, Alcántara N, Martinez MB, Girón JA. Fimbriae and adherence of *Stenotrophomonas maltophilia* to epithelial cells and to abiotic surfaces. *Cell Microbiol*. 2003; 5:625-36.

De Vrankrijker AMM, Wolfs TFW, van der Ent CK. Challenging and emerging pathogens in cystic fibrosis. *Pediatric Respiratory Reviews*. 2010; 11:246-54.

Denton M, Kerr KG. Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. *Clin Microbiol Rev*. 1998; 11:57-80.

Denton M, Rajgopal A, Mooney L, Qureshi A, Kerr KG, Keer V, Pollard K, Peckham DG, Conway SP. *Stenotrophomonas maltophilia* contamination of nebulizers used to deliver aerosolized therapy to inpatients with cystic fibrosis. *J Hosp Infect*. 2003; 55:180-3.

Di Bonaventura G, Prosseda G, Del Chierico F, Cannavacciuolo S, Cipriani P, Petrucca A, Superti F, Ammendolia MG, Concato C, Fiscarelli E, Casalino M, Piccolomini R, Nicoletti M, Colonna B. Molecular characterization of virulence determinants of *Stenotrophomonas maltophilia* strains isolated from patients affected by cystic fibrosis. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2007; 20:529-37.

Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*. 2002; 8:881-90.

Dunne WM Jr, Slater WA. Antimicrobial activity of merocyanine 540: a photosensitizing dye. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1998; 32:101-5.

Elting LS, Bodey GP. Septicemia due to *Xanthomonas* species and non-aeruginosa *Pseudomonas* species: increasing incidence of catheter-related infections. *Medicine(Baltimore)*.1990; 69:296-306.

Falagas ME, Kastoris AC, Vouloumanou EK, Dimopoulos G. Community-acquired *Stenotrophomonas maltophilia* infections: a systematic review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2009; 28:719-30.

Feazel LM, Baumgartner LK, Peterson KL, Frank DN, Harris JK, Pace NR. Opportunistic pathogens enriched in showerhead biofilms. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009; 106:16393-9.

Feil EJ, Enright MC. Analyses of clonality and the evolution of bacterial pathogens. *Curr Opin Microbiol*. 2004; 7:308-13.

Feil EJ, Holmes EC, Bessen DE, Chan MS, Day NP, Enright MC, Goldstein R, Hood DW, Kalia A, Moore CE, Zhou J, Spratt BG. Recombination within natural populations of pathogenic bacteria: short-term empirical estimates and long-term phylogenetic consequences. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98:182-7.

Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*. 1985; 39:783–91.

Feng PC, Monday SR, Lacher DW, Allison L, Siitonen A, Keys C, Eklund M, Nagano H, Karch H, Keen J, Whittam TS. Genetic diversity among clonal lineages within *Escherichia coli* O157:H7 stepwise evolutionary model. *Emerg Infect Dis*. 2007; 13:1701-6.

Figueirêdo PM, Furumura MT, Santos AM, Sousa AC, Kota DJ, Levy CE, Yano T. Cytotoxic activity of clinical *Stenotrophomonas maltophilia*. *Lett Appl Microbiol*. 2006; 43:443-9.

Fouhy Y, Scanlon K, Schouest K, Spillane C, Crossman I, Avison MB, Ryan RP, Dow JM. Diffusible signal factor-dependent cell-cell signaling and virulence in the nosocomial pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Bacteriol*. 2007; 189:4964-8.

Furuhata K, Ishizaki N, Kawakami Y, Fukuyama M. Bacterial contamination of stock solutions in storage cases for contact lens, and the disinfectant-resistance of isolates. *Biocontrol Sci*. 2010; 15:81-5.

Garcia Paez JI, Costa SF. Risk factors associated with mortality of infections caused by *Stenotrophomonas maltophilia*: a systematic review. *J Hosp Infect*. 2008; 70:101-8.

Goss CH, Otto K, Aitken ML, Rubenfeld GD. Detecting *Stenotrophomonas maltophilia* does not reduce survival of patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002; 166:356-61.

Gordo I, Perfeito L, Sousa A. Fitness effects of mutations in bacteria. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2011; 21:20-35.

Gould V, Avison MB. SmeDEF-mediated antimicrobial drug resistance in *Stenotrophomonas maltophilia* clinical isolates having defined phylogenetic relationships. *J Antimicrobial Chemother*. 2006; 57:1070-6.

Gould V, Okazaki A, Avison MB. Beta-lactam resistance and β -lactamase expression in clinical *Stenotrophomonas maltophilia* isolates having defined phylogenetic relationships. *J Antimicrob Chemother*. 2006; 57:199-203.

Hauben L, Vauterin L, Moore ER, Hoste B, Swings J. Genomic diversity of the genus *Stenotrophomonas*. *Int J Syst Bacteriol*. 1999; 49(Pt 4):1749-60.

Hoefel D, Monis PT, Grooby WL, Andrews S, Saint CP. Profiling bacterial survival through a water treatment process and subsequent distribution system. *J Appl Microbiol*. 2005; 99:175-86.

Hu LF, Chang X, Ye Y, Wang ZX, Shao YB, Shi W, Li X, Li JB. *Stenotrophomonas maltophilia* resistance to trimethoprim/sulfamethoxazole mediated by acquisition of

sul and dfrA genes in a plasmid-mediated class 1 integron. *Int J Antimicrob Agents*. 2011; 37:230-4

Huang X, Liu J, Ding J, He Q, Xiong R, Zhang K. The investigation of nematocidal activity in *Stenotrophomonas maltophilia* G2 and characterization of a novel virulence serine protease. *Can J Microbiol*. 2009; 55:934-42.

Hussain H, Burgess JJ, Sheth AN, Bajaj NH, Brooke JS. Efficacy of selected germicides on the biofilm formation of *Stenotrophomonas maltophilia*, Abstr AE22.59th Annu Conf Can Soc Microbiol Canadian Society of Microbiologists, Ottawa, Ontario, Canada. 2009.

Juhnke ME, Des Jardin E. Selective medium for isolation of *Xanthomonas maltophilia* from soil and rhizosphere environments. *Appl Environ Microbiol*. 1989; 55:747-50.

Kaiser S, Biehler K, Jonas D. A *Stenotrophomonas maltophilia* multilocus sequence typing scheme for inferring population structure. *J Bacteriol*. 2009; 191:2934-43.

Kim HB, Srinivasan S, Sathiyaraj G, Quan LH, Kim SH, Bui TP, Liang ZQ, Kim YJ, Yang DC. *Stenotrophomonas ginsengisoli* sp. nov., isolated from a ginseng field. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2010; 60(Pt 7):1522-6.

Lai CH, Chi CY, Chen HP, Chen TL, Lai CJ, Fung CP, Yu KW, Wong WW, Liu CY. Clinical characteristics and prognostic factors of patients with *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia. *J Microbiol Immunol Infect*. 2004; 37:350-8.

Lai CH, Wong WW, Chin C, Huang CK, Lin HH, Chen WF, Yu KW, Liu CY. Central venous catheter-related *Stenotrophomonas maltophilia* bacteraemia and associated relapsing bacteraemia in haematology and oncology patients. *Clin Microbiol Infect*. 2006; 12:986-91.

Lambiase A, Raia V, Del Pezzo M, Sepe A, Carnovale V, Rossano F. Microbiology of airway disease in a cohort of patients with cystic fibrosis. *BMC Infect Dis*. 2006; 6:4.

Ledder RG, Gilbert P, Willis C, McBain AJ. Effects of chronic triclosan exposure upon the antimicrobial susceptibility of 40 ex-situ environmental and human isolates. *J Appl Microbiol*. 2006; 100:1132-40.

Lee M, Woo SG, Chae M, Shin MC, Jung HM, Ten LN. *Stenotrophomonas daejeonensis* sp. nov., isolated from sewage. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2011; 61(Pt 3):598-604.

Liba CM, Ferrara FI, Manfio GP, Fantinatti-Garboggini F, Albuquerque RC, Pavan C, Ramos PL, Moreira-Filho CA, Barbosa HR. Nitrogen-fixing chemo-organotrophic bacteria isolated from cyanobacteria-deprived lichens and their ability to solubilize phosphate and to release amino acids and phytohormones. *J Appl Microbiol*. 2006; 101:1076-86.

Lin D, Lehmann PF, Hamory BH, Padhye AA, Durry E, Pinner RW, Lasker BA. Comparison of three typing methods for clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol*. 1995; 33:1596-601.

Lipuma JJ. Expanding microbiology of pulmonary infection in cystic fibrosis. *Pediatr Infect Dis J*. 2000; 19:473-4.

Lipuma JJ. *Burkholderia* and emerging pathogens in cystic fibrosis. *Semin Respir Crit Care Med*. 2003; 24:681-92.

Looney WJ, Narita M, Muhlemann K. *Stenotrophomonas maltophilia*: an emerging opportunist human pathogen. *Lancet Infect Dis*. 2009; 9:312-23.

Maiden MC. Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu Rev Microbiol*. 2006; 60:561-88.

Maiden MC, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci*. 1998; 95:3140-5.

Mancini DA, Mendonça RM, Dias AL, Mendonça RZ, Pinto JR. Co-infection between influenza virus and flagellated bacteria. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2005; 47:275-80.

McKay GA, Woods DE, MacDonald KL, Poole K. Role of phosphoglucosyltransferase of *Stenotrophomonas maltophilia* in lipopolysaccharide biosynthesis, virulence, and antibiotic resistance. *Infect Immun*. 2003; 71:3068-75.

Metan G, Hayran M, Hascelik G, Uzun O. Which patient is a candidate for empirical therapy against *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia? An analysis of associated risk factors in a tertiary care hospital. *Scand J Infect Dis*. 2006; 38:527-31.

Meunier JR, Grimont PA. Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Res Microbiol*. 1993; 144:373-9.

Minkwitz A, Berg G. Comparison of antifungal activities and 16S ribosomal DNA sequences of clinical and environmental isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Clin Microbiol*. 2001; 39:139-45.

Mutlu M, Yilmaz G, Aslan Y, Bayramoğlu G. Risk factors and clinical characteristics of *Stenotrophomonas maltophilia* infections in neonates. *J Microbiol Immunol Infect*. 2011; 44:467-72.

Nazik H, Ongen B, Erturan Z, Salcioğlu M. Genotype and antibiotic susceptibility patterns of *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from cystic fibrosis patients. *Jpn J Infect Dis*. 2007;60:82-6.

- Nei M. Molecular Evolutionary Genetics. *Columbia Univ. Press*, New York. (1987).
- Nei M, Miller JC. A simple method for estimating average number of nucleotide substitutions within and between populations from restriction data. *Genetics*. 1990; 125:873-9.
- Nyč O, Matějková J. *Stenotrophomonas maltophilia*: Significant contemporary hospital pathogen - review. *Folia Microbiol* (Praha). 2010; 55:286-94.
- O'Donnell MJ, Tuttlebee CM, Falkiner FR, Coleman DC. Bacterial contamination of dental chair units in a modern dental hospital caused by leakage from suction system hoses containing extensive biofilm. *J Hosp Infect*. 2005; 59:348-60.
- Palleroni NJ, Bradbury JF. *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings *et al.* 1983. *Int J Syst Bacteriol*. 1993; 43:606-9.
- Park M, Kim C, Yang J, Lee H, Shin W, Kim S, Sa T. Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. *Microbiol Res*. 2005; 160:127-33.
- Pathmanathan A, Waterer GW. Significance of positive *Stenotrophomonas maltophilia* culture in acute respiratory tract infection. *Eur Respir J*. 2005; 25:911-4.
- Potera C. Forging a link between biofilms and disease. *Science*. 1999; 283:1837-9.
- Pompilio A, Crocetta V, Confalone P, Nicoletti M, Petrucca A, Guarnieri S, Fiscarelli E, SAVINI V, Piccolomini R, Di Bonaventura G. Adhesion to and biofilm formation on IB3-1 bronchial cells by *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from cystic fibrosis patients. *BMC Microbiol*. 2010; 10:102.
- Prince AS. Biofilms, antimicrobial resistance, and airway infection. *N Engl J Med*. 2002; 347:1110-1.
- Raad I, Reitzel R, Jiang Y, Chemaly RF, Dvorak T, Hachem R. Anti-adherence activity and antimicrobial durability of anti-infective-coated catheters against multidrug-resistant bacteria. *J Antimicrob Chemother*. 2008; 62:746-50.
- Rahmatl-Bahram A, Magee JT, Jackson SK. Effect of temperature on aminoglycoside binding sites in *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Antimicrob Chemother*. 1997; 39:19-24.
- Ramos PL, Van Trappen S, Thompson FL, Rocha RC, Barbosa HR, DE Vos P, Moreira-Filho CA. Screening for endophytic nitrogen-fixing bacteria in Brazilian sugar cane varieties used in organic farming and description of *Stenotrophomonas pavanii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2011; 61(Pt 4):926-31.
- Ramos PL, Moreira-Filho CA, Van Trappen S, Swings J, Devos P, BarbosaHR, Thompson CC, Vasconcelos AT, Thompson FL. An MLSA-based online scheme for

the rapid identification of *Stenotrophomonas* isolates. *Mem Inst OswaldoCruz*. 2011; 106: 394-9.

Rozas J, Sánchez-Delbarrio JC, Messeguer X, Rozas R. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*. 2003; 19:2496-7.

Ryan RP, Monchy S, Cardinale M, Taghavi S, Crossman L, Avison MB, Berg G, Vander Lelie D, Dow JM. The versatility and adaptation of bacteria from the genus *Stenotrophomonas*. *Nature Reviews Microbiol*. 2009; 7:515-25.

Saiki RK, ScharF S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 1985; 230:1350-4.

Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol*. 1987; 4:406–25.

Sakhnini E, Weissmann A, Oren I. Fulminant *Stenotrophomonas maltophilia* soft tissue infection in immunocompromised patients: an outbreak transmitted via tap water. *Am J Med Sci*. 2002; 323:269-72.

Sanchez MB, Hernandez A, Martinez JL. *Stenotrophomonas maltophilia* drug resistance. *Future Microbiol*. 2009; 4:655-60.

Selander RK, Caugant DA, Ochman H, Musser JM, Gilmour MN, Whittam TS. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl Environ Microbiol*. 1986; 51:873-84.

Shi SH, Kong HS, Xu J, Zhang WJ, Jia CK, Wang WL, Shen Y, Zhang M, Zheng SS. Multidrug resistant gram-negative bacilli as predominant bacteremic pathogens in liver transplant recipients. *Transpl Infect Dis*. 2009; 11:405-12.

Silbaq FS. Viable ultramicrocells in drinking water. *J Appl Microbiol*. 2009; 106:106-17.

Spicuzza L, Sciuto C, Vitaloti G, Di Dio G, Leonardi S, La Rosa M. Emerging pathogens in cystic fibrosis: ten years of follow-up in a cohort of patients. *Eur J ClinMicrobiol Infect Dis*. 2009; 28:191-5.

Schwartz DC, Saffran W, Welsh J, Haas R, Goldenberg M, Cantor CR. New techniques for purifying large DNAs and studying their properties and packaging. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1983; 47(Pt 1):189-95.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. 2007; 24:1596-9.

Tamura K, Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol.* 1993; 10:512-26.

Tamura K, Nei M, Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101:11030-5.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution.* 2011; 28:2731-9.

Torrella F, Morita RY. Microcultural study of bacterial size changes and microcolony and ultramicrocolony formation by heterotrophic bacteria in seawater. *Appl Environ Microbiol.* 1981; 41:518-27.

Tseng CC, Fang WF, Huang KT, Chang PW, Tu ML, Shiang YP, Douglas IS, Lin MC. Risk factors for mortality in patients with nosocomial *Stenotrophomonas maltophilia* pneumonia. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2009; 30:1193-202.

Turner GL, Gibson AH. Measurement of nitrogen fixation by indirect means. In: Bergensen FJ editor. *Methods of Evaluating Biological Nitrogen Fixation.* London: John Wiley & Son; 1980; 111–139.

Turner KM, Feil EJ. The secret life of the multilocus sequence type. *Int J Antimicrob Agents.* 2007; 29:129-35.

Vasileuskaya-Schulz Z, Kaiser S, Maier T, Kostrzewa M, Jonas D. Delineation of *Stenotrophomonas* spp. by multi-locus sequence analysis and MALDI-TOF mass spectrometry. *Syst Appl Microbiol.* 2011; 34:35-9.

Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 1995; 23:4407-14.

Wang SA, Levine RB, Carson LA, Arduino MJ, Killar T, Grillo FG, Pearson ML, Jarvis WR. An outbreak of gram-negative bacteremia in hemodialysis patients traced to hemodialysis machine waste drain ports. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1999; 20:746-51.

Wang C, Zhan Q, Mi Z, Huang Z, Chen G. Distribution of the antiseptic-resistance gene qacEDelta1 in 283 clinical isolates of Gram-negative bacteria in China. *J Hosp Infect.* 2008; 69:394-6.

Waterman MS. *Introduction to computational biology*, p. 201–202. Chapman & Hall, New York, N.Y. (1995).

Weber DJ, Rutala WA, Sickbert-Bennett EE, Samsa GP, Brown V, Niederman MS. Microbiology of ventilator-associated pneumonia compared with that of hospital-acquired pneumonia. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2007; 28:825-31.

Wiedenbeck J, Cohan FM. Origins of bacterial diversity through horizontal genetic transfer and adaptation to new ecological niches. *FEMS Microbiol Rev*. 2011; 35:957-76.

Wilkinson FH, Kerr KG. Bottled water as a source of multi-resistant *Stenotrophomonas* and *Pseudomonas* species for neutropenic patients. *Eur J Cancer Care (Engl)*. 1998; 7:12-4.

Woese CR. *Bacterial evolution Microbiol Rev*. 1987; 51:221–71.

Wu PS, Lu CY, Chang LY, Hsueh PR, Lee PI, Chen JM, Lee CY, Chan PC, Chang PY, Yang TT, Huang LM. *Stenotrophomonas maltophilia* bacteremia in pediatric patients a 10-years analysis. *J Microbiol Immunol Infect*. 2006; 39:144-9.

Yi H, Srinivasan S, Kim MK. *Stenotrophomonas panacihumi* sp. nov., isolated from soil of a ginseng field. *J Microbiol*. 2010; 48:30-5.

Zhang W, Sun Z. Random local neighbor joining: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Phylogenet Evol*. 2008; 47:117-28.

Zgair AK, Chhibber S. Adhesion of *Stenotrophomonas maltophilia* to mouse tracheal mucus is mediated through flagella. *J Med Microbiol*. 2011; 60(Pt7):1032-7.