Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

**Deteccção e caracterização de elementos conjugativos
integrativos em bactérias isoladas de amostras
ambientais**

Miriam Lopes da Silva

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Saúde Pública para obtenção do
título de Doutor em Saúde Pública.

Área de Concentração: Serviços de Saúde
Pública

Orientadora: Prof^a. Assoc. Maria Helena Matté

São Paulo
2014

**Detecção e caracterização de elementos conjugativos
integrativos em bactérias isoladas de amostras
ambientais**

Miriam Lopes da Silva

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Saúde Pública para obtenção do
título de Doutor em Saúde Pública.

Área de Concentração: Serviços de Saúde
Pública

Orientadora: Prof^a. Assoc. Maria Helena Matté

**São Paulo
2014**

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que a reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da tese.

*Ao meu pai,
que queria me ver doutora e,
enquanto eu me viabilizava doutora,
morreu antes de me ver,
sem que eu visse que ele morria.*

e

*À minha mãe,
que me perdoa a ausência,
estando sempre presente.*

AGRADECIMENTOS

A realização desse trabalho somente foi possível mediante a participação e o apoio de inúmeras pessoas às quais desejo expressar meu mais profundo agradecimento.

Às inesquecíveis companheiras, que passaram pelo Laboratório de Saúde Pública e se transformaram em amigas, fora dele. Pela boa disposição e amizade demonstradas e por serem constantes fontes de inspiração e encorajamento: à Luisa Moreno, tão frágil e jovem quanto competente e sábia; à dedicada e pragmática Cíntia Mayer, pioneira do laboratório quanto ao tema SXT; à Elisabeth Moura, doçura e alegria contagiantes, sem jamais esquecer a responsabilidade; à vibrante e otimista Camila Rizek; à meiga e tranquila Lícia Natal; à forte e centrada Patrícia Pereira; e ao amigo, Pedro Pedro, inteligência exuberante camuflada com uma simplicidade desconcertante.

A todos os estagiários da FUNDAP, principalmente à Bruna Aguiar, Rafaela Sousa, Rafael e Pâmela, pela ajuda no mutirão de triagem.

À Dra Elayse Maria Hachich da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo – CETESB, cujo laboratório é histórico colaborador no compartilhamento de amostras de esgoto. Aos técnicos, Ana Tereza Galvani e José Antonio Padula, que sempre abriram as portas do seu local de trabalho, nos recebendo com gentileza e generosidade.

À Dra. Maria Inês Zanolli Sato, pelas sábias observações que em muito contribuíram para a conclusão do trabalho.

À Dra. Ana Cristina Gales, não somente pelo auxílio na conclusão do antibiograma, como também pela sinceridade, cordialidade e colaboração além das inestimáveis sugestões, tanto na fase de qualificação, quanto na pré-banca.

Ao Dr. John Anthony McCulloch, pela presteza, auxílio, paciência e benevolência demonstradas durante a pré-banca e principalmente pelas críticas que auxiliaram a aprimorar o trabalho.

Ao pessoal administrativo da secretaria do Departamento de Prática de Saúde Pública – FSP/USP, Maria Aparecida Soares Alves, Sonia Francisca Martins, Livia Mara Silva Rosa e Fernando Miguez Vargas Júnior, pela camaradagem e colaboração constantes.

À equipe da Biblioteca da Faculdade de Saúde Pública/USP, pela incomparável eficiência na disponibilização dos artigos, tão indispensáveis.

À Profa. Dra. Maria Helena Matté, minha orientadora, pelas críticas e opiniões durante a realização do trabalho laboratorial e da preparação do manuscrito desta tese de doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pelo apoio financeiro (processo N° 2011/188267), sem o qual não seria possível a realização da tese.

RESUMO

Silva ML. **Detecção e caracterização de elementos conjugativos integrativos em bactérias isoladas de amostras ambientais**. São Paulo, 2013. [Tese de Doutorado – Faculdade de Saúde Pública da USP – FSP/USP].

O reconhecimento da resistência antimicrobiana como um fenômeno emergente em saúde pública, tem constituído um problema em nível mundial. O abuso na utilização de antibióticos na medicina humana e veterinária, e na agricultura, tem originado incremento na diversidade de micro-organismos resistentes, refletindo em falha terapêutica. Os mecanismos de resistência a antibióticos em micro-organismos são mediados principalmente por genes adquiridos de DNA exógeno. A dinâmica da transferência horizontal é realizada por meio de elementos genéticos móveis que carregam genes de resistência. A ampla distribuição deste tipo de estruturas, como o elemento SXT, isolado inicialmente em *V. cholerae*, tem contribuído para a disseminação de complexos específicos clonais em determinadas áreas geográficas. Este estudo pioneiro no Brasil pesquisou a presença de elementos SXT, em espécies bacterianas do grupo das gama proteobactérias em espécies ambientais, determinou suas características estruturais e funcionais, incluindo genes de resistência a antibióticos, bem como a sensibilidade aos antibióticos dentre os isolados bacterianos que os abrigam. O resultado foi a classificação de 43 elementos SXT obtidos no Brasil, através da comparação com aqueles descritos na literatura. Dentre os elementos SXT obtidos, quatro são albergados por *Morganella morganii*, fato inédito na literatura. O conhecimento da evolução bacteriana constitui importante ferramenta para estabelecer estratégias eficazes de controle e tratamento de infecções, sem aumentar a pressão seletiva sobre os micro-organismos, bem como instrumento preciso e de grande importância para subsidiar estudos epidemiológicos.

Descritores: elementos genéticos móveis, elemento SXT, resistência a antibióticos, Saúde Pública.

ABSTRACT

Silva ML. **Detection and characterization of integrative conjugative elements in bacteria isolated from environmental samples.** São Paulo, 2013 [Doctoral Thesis -- Faculty of Public Health, University of São Paulo – FSP/USP].

Recognition of antimicrobial resistance as an emerging phenomenon in public health has been a problem worldwide. The abuse in the use of antibiotics in human and veterinary medicine, and agriculture, has caused an increase in the diversity of resistant microorganisms, reflecting in treatment failure. The mechanisms of antibiotic resistance in microorganisms are primarily mediated by genes acquired from exogenous DNA. The dynamics of the horizontal transfer is performed by mobile genetic elements which carry resistance genes. The wide distribution of these structures, such as the SXT element originally isolated from *V. cholerae*, has contributed to the spread of specific clonal complexes in certain geographical areas. This pioneering study in Brazil researched the presence of SXT elements in the group of bacterial species in environmental gamma-proteobacteria species, determined their structural and functional characteristics, including genes for resistance to antibiotics and the antibiotic susceptibility among bacterial isolates that harbor them. The result was the classification of 43 SXT elements found in Brazil, by comparison with those found in the literature. Among the SXT elements found, four are sheltered by *Morganella morganii*, unprecedented in the literature. Knowledge of bacterial evolution is an important to establish effective strategies to control and treat infections without increasing the selective pressure on microorganisms, as well as a precise instrument and very important tool to support epidemiological studies.

Keywords: mobile genetic elements, SXT element, antibiotic resistance, Public Health.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 ELEMENTOS GENÉTICOS MÓVEIS.....	21
1.2 ORIGEM DO ELEMENTO SXT.....	24
1.3 CARACTERÍSTICAS DO ELEMENTO SXT.....	26
1.4 O ELEMENTO SXT NO MEIO AMBIENTE.....	32
2 OBJETIVOS.....	36
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	36
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1 ORIGEM DAS AMOSTRAS.....	37
3.2 REISOLAMENTO DOS MICRO-ORGANISMOS.....	38
3.3 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO.....	38
3.3.1 Extração por Choque Térmico.....	39
3.3.2 Método de Extração pelo Brometo de Cetiltrimetilamônio.....	40
3.3.2.1 Qualidade do DNA extraído.....	41
3.4 ANÁLISE GENOTÍPICA.....	42
3.4.1 Reação em Cadeia pela Polimerase – PCR.....	42
3.4.1.1 Detecção do elemento SXT.....	43
3.4.1.2 Detecção de genes estruturais do elemento SXT.....	45
3.4.1.3 Detecção de genes de resistência a antibióticos.....	48
3.4.2 Visualização dos Produtos da PCR.....	51
3.4.3 Sequenciamento de amplicons.....	52
3.5 ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DAS SEQUÊNCIAS GENÔMICAS.....	53

3.6 IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIE – 16S rDNA.....	56
3.7 DESENHO DE INICIADORES ESPECÍFICOS.	58
3.8 ANÁLISE FENOTÍPICA DE SENSIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS.....	59
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
4.1 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DO ELEMENTO SXT.....	70
4.1.1 Região Variável 1 – RV1	71
4.1.2 Gene da Integrase.....	76
4.1.3 Região Variável 2 – RV2	79
4.1.4 Região Variável 3 – RV3	84
4.1.4.1 Operon <i>rumB-rumA</i>	84
4.1.4.2 Genes de resistência a antibióticos.....	88
4.1.5 Hotspot 5.....	91
4.1.6 Hotspot 1.....	94
4.1.7 Hotspot 2.....	97
4.1.8 Hotspot 4.....	100
4.1.9 Hotspot 3.....	104
4.1.10 Região variável 4 – RV4.....	107
4.2 IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIE por 16S rDNA.....	112
4.3 PERFIL GENOTÍPICO DO ELEMENTO SXT.....	117
4.3.1 Perfil Genotípico do Elemento SXT em <i>Morganella morganii</i> ..	117
4.3.2 Perfil Genotípico do Elemento SXT em <i>Proteus</i> spp.	119
4.3.3 Perfil Genotípico do Elemento SXT em <i>Providencia</i> spp.	122
4.3.4 Perfil Genotípico do Elemento SXT em <i>Vibrio</i> spp.	126
4.4 ANÁLISE FENOTÍPICA DE SENSIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS.....	131

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	140
6 CONCLUSÕES.....	143
7 REFERÊNCIAS.....	145
ANEXOS.	
ANEXO 1 – Características dos elementos SXT encontrados no estudo, segundo presença e tamanho da região pesquisada.....	160
ANEXO 2A – Perfil de sensibilidade a antibióticos obtidos a partir de teste de disco difusão, em cepas de <i>Morganella morganii</i> e <i>Proteus</i> spp. positivas para o elemento SXT, segundo tamanho do halo.....	163
ANEXO 2B – Perfil de sensibilidade a antibióticos obtidos a partir de teste de disco difusão, em cepas de <i>Providencia</i> spp. positivas para o elemento SXT, segundo tamanho do halo.....	164
ANEXO 2C – Perfil de sensibilidade a antibióticos obtidos a partir de teste de disco difusão, em cepas de <i>Vibrio</i> spp. e <i>Vibrio cholerae</i> positivas para o elemento SXT, segundo tamanho do halo.....	165
ANEXO 3A – Perfil de sensibilidade a antibióticos obtidos a partir de teste de disco difusão, em cepas de <i>Morganella morganii</i> e <i>Proteus</i> spp., positivas para o elemento SXT, segundo resultados qualitativos interpretados como sensível, intermediário ou resistente.....	167
ANEXO 3B – Perfil de sensibilidade a antibióticos obtidos a partir de teste de disco difusão, em cepas de <i>Providencia</i> spp. positivas para o elemento SXT, segundo resultados qualitativos interpretados como sensível, intermediário ou resistente.....	168

ANEXO 3C – Perfil de sensibilidade a antibióticos obtidos a partir de teste de disco difusão, em cepas de <i>Vibrio</i> spp. e <i>Vibrio cholerae</i> , positivas para o elemento SXT, segundo resultados qualitativos interpretados como sensível, intermediário ou resistente.....	169
ANEXO 4 – Critério utilizado para avaliação do perfil de sensibilidade a antibióticos obtidos a partir de teste de disco difusão, segundo antibiótico utilizado e documento de recomendação.....	171
ANEXO 5 – Perfil de sensibilidade a antibióticos apresentado por cepas positivas para a presença de elemento SXT segundo origem da amostra, organismo, genótipo e fenótipo.....	172

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Mecanismos de transferência horizontal.....	21
Figura 2	Representação esquemática da organização genética mínima necessária para o funcionamento de ICEs da família SXT-R391.....	28
Figura 3	Representação esquemática da organização genética do elemento SXT ^{MO10}	31
Figura 4	Possibilidades de amplificação através de iniciadores utilizados em mPCR.....	65
Figura 5	Eletroforese em gel de agarose mostrando <i>int</i> _{SXT} , amplificado pela PCR.....	66
Figura 6	Representação esquemática do par de iniciadores para o sítio attP.....	67
Figura 7	Eletroforese em gel de agarose apresentando <i>amplicons</i> da reação de PCR para a região intergênica attL-xis.	72
Figura 8	Representação esquemática da região variável 1 apresentada por SXT4, SXTMO10, ICE <i>VchMex1</i> e o elemento R391.....	74
Figura 9	Alinhamento ClustalW da região attL-xis de SXT31, comparada com a outros ICEs.....	75
Figura 10	Representação gráfica da análise filogenética inferida com base nas sequências parciais do gene <i>int</i> de SXT4, SXT7 e SXT8.....	77

Figura 11	Representação gráfica da análise filogenética inferida com base na sequência total do gene <i>int</i> de SXT4.....	78
Figura 12	Representação esquemática da sequência de 886 pb, amplificada pelo iniciador anti-senso, no elemento SXT13....	83
Figura 13	Representação esquemática do gene <i>rumB</i>	86
Figura 14	Alinhamento ClustalW da região s026-s027 de SXT1.....	93
Figura 15	Eletroforese em gel de agarose mostrando produto amplificado da reação de PCR para a região intergênica s043-traL.....	95
Figura 16	Eletroforese em gel de agarose apresentando <i>amplicons</i> da reação de PCR para a região intergênica traA-s054.....	98
Figura 17	Esquema linear mostrando os quadros abertos de leitura (<i>open reading frames</i> – ORF), da sequência de 7296 pb encontrada no SXT4.....	99
Figura 18	Eletroforese em gel de agarose mostrando produto amplificado da reação de PCR para a região intergênica traN-s063.....	102
Figura 19	Eletroforese em gel de agarose mostrando produto amplificado da reação de PCR para a região intergênica s073-traF.....	105
Figura 20	Eletrofere em gel de agarose apresentando <i>amplicons</i> da reação de PCR para a região intergênica traG-setC.....	108

Figura 21	Representação gráfica da análise filogenética inferida com base na sequência parcial da região traG-setC e genes Eex, de ICEs da família SXT/R391.....	111
Figura 22	Representação gráfica da análise filogenética inferida com base na sequência parcial do gene rDNA16S das cepas do gênero <i>Providencia</i>	114
Figura 23	Representação gráfica da análise filogenética inferida com base na sequência parcial do gene rDNA16S das cepas do gênero <i>Morganella</i>	115
Figura 24	Representação gráfica da análise filogenética inferida com base na sequência parcial do gene rDNA16S das cepas do gênero <i>Proteus</i>	116
Figura 25	Representação esquemática (sem escala) dos genes e regiões intergênicas amplificadas por PCR de elementos SXT em isolados de <i>Morganella morganii</i>	118
Figura 26	Representação esquemática (sem escala) dos genes e regiões intergênicas amplificadas por PCR de elementos SXT encontrados em isolados do gênero <i>Proteus</i>	120
Figura 27	Representação esquemática (sem escala) dos genes e regiões intergênicas amplificadas por PCR de elementos SXT encontrados em isolados do gênero <i>Providencia</i>	123
Figura 28	Representação esquemática (sem escala) dos genes e regiões intergênicas amplificadas por PCR de elementos SXT encontrados em isolados do gênero <i>Vibrio</i>	127

LISTA DE QUADROS

Quadro1	Sequência nucleotídica de iniciadores para pesquisa do gene integrase <i>int</i> _{SXT} e do sítio <i>attP</i> , utilizados na reação de PCR, para a triagem do elemento SXT.....	27
Quadro1.1	Condições de amplificação pela PCR, indicando componentes e ciclos térmicos da reação.....	27
Quadro 2	Iniciadores para pesquisa de genes e regiões do elemento SXT e genes relacionados.....	29
Quadro 2.1	Condições da PCR, indicando componentes e ciclos térmicos da reação para amplificação das regiões entre os genes, <i>s002-xis</i> , <i>rumBA</i> , <i>s026-s027</i> , <i>s043-traL</i> , <i>traA-s054</i> , <i>s073-traF</i>	30
Quadro 2.2	Condições da PCR, indicando componentes e ciclos térmicos da reação para amplificação das regiões entre os genes <i>attL-xis</i> e <i>traG-setC</i>	30
Quadro 2.3	Condições da PCR, indicando componentes e ciclos térmicos da reação para amplificação das regiões entre os genes <i>traN-s063</i>	31
Quadro 3	Iniciadores para pesquisa de genes de resistência encontrados no elemento SXT.....	32
Quadro 3.1	Condições da PCR, indicando componentes e ciclos térmicos da reação para amplificação do gene <i>strB</i>	33
Quadro 3.2	Condições da PCR, indicando componentes e ciclos térmicos da reação para amplificação do gene <i>dfr1</i>	33

Quadro 3.3	Condições da mPCR, indicando componentes e ciclos térmicos da reação para amplificação dos pares de genes <i>sulII</i> / <i>strA</i> e <i>floR</i> / <i>dfr18</i>	34
Quadro 4	ICEs pertencentes à família SXT/R391 depositados no <i>GenBank</i> , utilizados para análise comparativa.....	38
Quadro 5	Iniciadores para sequenciamento do gene 16S rDNA....	40
Quadro 5.1	Condições da PCR, indicando componentes e ciclos térmicos da reação para amplificação dos pares do gene 16S rDNA.....	40
Quadro 6	Sequência nucleotídica de iniciadores para pesquisa do gene <i>int_{SXT}</i> , do sítio <i>attP</i> , e regiões adjacentes, utilizados na reação de PCR, para a triagem do elemento SXT em busca ampliada.....	47
Quadro 6.1	Condições de amplificação pela PCR, indicando componentes e ciclos térmicos da reação de PCR simples.....	48
Quadro 6.2	Condições de amplificação pela PCR, indicando componentes e ciclos térmicos da reação mPCR.....	48
Quadro 7	Isolados positivos para a presença do elemento SXT utilizados no estudo, segundo gênero do organismo e dados de isolamento.....	52
Quadro 8	Características de resistência do elemento SXT, segundo número e tipo de gene de resistência a antibióticos.....	73
Quadro 9	Espécie de micro-organismo identificado pelo 16S rDNA, segundo o isolado e o respectivo elemento SXT.....	96

Quadro 10	Elemento Conjugativo e Integrativo, segundo organismo de origem, local e ano de isolamento cepa.....	113
Quadro 11:	Perfil de resistência a antibióticos, apresentados por cepas de <i>Morganella morganii</i> positivas para a presença de elemento SXT.....	115
Quadro 12	Perfil de resistência a antibióticos, apresentados por cepas de <i>Proteus</i> spp. positivas para a presença de elemento SXT.....	116
Quadro 13	Perfil de resistência a antibióticos, apresentados por cepas de <i>Providencia</i> spp. positivas para a presença de elemento SXT.....	119
Quadro 14	Perfil de resistência a antibióticos, apresentados por cepas de <i>Vibrio</i> spp. e <i>Vibrio cholerae</i> positivas para a presença de elemento SXT.....	122

1 INTRODUÇÃO

Os antibióticos¹ estão entre as mais importantes descobertas da história, embora paralelamente tenham surgido efeitos indesejáveis devido ao seu uso, ainda hoje essas drogas são essenciais para a humanidade.

Porém, quase que imediatamente após a introdução dos antibióticos na prática clínica, emergiu a resistência bacteriana a essas drogas (FLEMING, 1945; MCDERMOTT *et al.*, 2003). O fenômeno da resistência a antibióticos existe nos micro-organismos como um processo biológico natural, portanto, muito antes do início da utilização de antibióticos como opção terapêutica (FLEMING 1929; FLEMING 1945; TAVARES 2002; WRIGHT, 2010). Os micro-organismos produzem substâncias antibióticas, denominadas biocinas, como forma de defesa ou para obter vantagem competitiva, indispensável à sua sobrevivência no meio ambiente. Assim sendo, os antibióticos não produzem resistência, apenas impelem a seleção de bactérias resistentes, ou seja, exercem pressão seletiva sobre os micro-organismos.

O uso indiscriminado e intensivo de terapias baseadas em antibióticos pela medicina humana, bem como sua utilização terapêutica, profilática e subterapêutica, na medicina veterinária e na agricultura (GYLES, 2008), têm

¹ O termo “antibiótico” se refere estritamente a uma substância de origem biológica, isto é, substância química naturalmente produzida por micro-organismos, enquanto que o termo “quimioterápico” se refere a um produto químico sintético (substância criada artificialmente ou substância de origem biológica modificada estruturalmente em laboratório), e o termo “antimicrobiano” serve para designar tanto antibióticos como quimioterápicos. No entanto, na prática, o termo “antibiótico” é frequentemente utilizado para referir a todos os antimicrobianos e, por esta razão, será o termo adotado nesse texto.

acelerado a pressão seletiva sobre os micro-organismos, porquanto promovendo, mantendo e propagando o processo de resistência, antecipam o fenômeno de seleção natural, que ocorreria eventual e lentamente (LEVY, 2002).

A resistência aos antibióticos pode ocorrer em bactérias patogênicas e comensais, tanto *in vivo*, como no meio ambiente, podendo ser classificada como intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca é aquela que faz parte das características fenotípicas naturais do micro-organismo e por isso é transmitida verticalmente, ou seja, faz parte da herança genética do micro-organismo.

A resistência microbiana adquirida pode ocorrer através de mutações espontâneas ou, mais comumente por aquisição de genes (transmissão horizontal). No primeiro caso, a resistência tem origem em mutações cromossômicas resultantes de erro na cópia da sequência do DNA, durante o processo reprodutivo em uma frequência média, a cada divisão celular, de 10^{-4} a 10^{-10} (LIVERMORE, 2007). No entanto, a resistência aos antibióticos adquirida é mais comum e está associada a elementos extracromossômicos obtidos de outras células bacterianas. Neste processo estão envolvidos diferentes tipos de elementos mobilizáveis de DNA (BARBOSA e LEVY, 2000; LEVY, 2002). Embora alguns patógenos permaneçam sensíveis a um antibiótico em particular, e outros possuam um perfil de resistência em franca ampliação, ainda que, em baixa prevalência; uns poucos dispõem de um amplo arsenal de genes acumulados, conferindo resistência a múltiplas

drogas e produzindo infecções intratáveis (McDERMOTT *et al.*, 2003; LIVERMORE, 2007).

A troca de genes através de elementos genéticos móveis, tais como plasmídeos, transposons e integrons, entre bactérias, de mesma ou de espécies diferentes, tem um papel crucial no processo da transmissão de resistência a antibióticos, contribuindo para a rápida disseminação de genes de resistência entre gêneros bacterianos de importância para a saúde humana e veterinária, inclusive.

Os genes de resistência a antibióticos se acumulam em elementos móveis, conduzindo a uma situação onde os fenótipos de resistência a múltiplas drogas podem ser transferidos a um receptor sensível através de um único evento genético (BURRUS e WALDOR, 2004). A aquisição dos genes de resistência a antibióticos é possível devido aos mecanismos de transdução, transformação e conjugação e, frequentemente, envolve genes situados nos próprios elementos móveis (MURRAY *et al.*, 2004; ALTERTHUM, 2010).

Os mecanismos de transformação, transdução e conjugação diferem na maneira pela qual o segmento de DNA é introduzido, a partir de células doadoras, em células receptoras (Figura 1).

No mecanismo de transformação, os fragmentos de DNA liberados após a morte celular são incorporados por uma bactéria receptora competente.

No mecanismo de transdução, a introdução de material genético de uma bactéria em outra ocorre por intermédio de um bacteriófago.

A conjugação ocorre através da formação de *pilus* sexual, havendo obrigatoriamente contato direto entre as células doadora e receptora, para a transferência do DNA.

Figura 1: Mecanismos de transferência horizontal. Fonte: Antimicrobial resistance learning site – Michigan State University. <http://amrls.cvm.msu.edu/microbiology/molecular-basis-for-antimicrobial-resistance/acquired-resistance/acquisition-of-antimicrobial-resistance-via-horizontal-gene-transfer>. Traduzido pela autora.

1.1 ELEMENTOS GENÉTICOS MÓVEIS

Os avanços na área da biologia molecular possibilitaram o conhecimento de que a composição do genoma bacteriano é altamente variável, estrutural e funcionalmente. O grau de plasticidade do genoma é dependente do conteúdo de repetições e sequências mobilizáveis (MIRA, 2002).

Os elementos genéticos móveis podem atuar de maneiras variadas, modulando a expressão gênica (interrompendo, ligando e desligando genes), conforme o sítio de transposição (local onde são inseridos) e dessa maneira alterando a estrutura e consequentemente as funções do genoma bacteriano (HALL e COLLIS, 1998; NORMAN *et al.*, 2009).

Os elementos genéticos móveis – EGMs, tais como sequências de inserção, transposons, fagos, dentre outros, possuem uma estrutura modular que favorece intercâmbio entre eles de genes, dotando as espécies bacterianas de elevada capacidade adaptativa.

Os menores elementos genéticos móveis são as sequências de inserção – IS (*Insertion Sequence*), pequenos trechos de DNA que possuem nas extremidades sequências repetidas, entre as quais estão localizados exclusivamente genes necessários à própria transposição.

Os transposons são elementos genéticos transponíveis, capazes de mudar de posição dentro do genoma ou fora dele (transposons conjugativos). Carregam um ou mais genes além daqueles que são essenciais para a transposição. Sua estrutura contém IS nas extremidades flanqueando outros genes, como de resistência a antibióticos, por exemplo. Embora possam ser transpostos por meio de conjugação (transposons conjugativos), diferentemente de plasmídeos conjugativos, não possuem uma forma extracomossomal replicativa autônoma, e por isso, integram-se no cromossomo de seus hospedeiros (KAPER e HACKER, 1999).

Os plasmídeos são fragmentos de DNA bacteriano, mantidos como elementos extracromossômicos, quase que exclusivamente na forma circular. Contendo informações não essenciais para a sobrevivência celular, podem se replicar independentemente do cromossomo e migrar para outras células bacterianas (KAPER e HACKER, 1999).

Os integrons são elementos genéticos caracterizados pela capacidade de inserir, excisar e rearranjar cassetes gênicos, por intermédio de recombinação sítio-específica, a qual é mediada pela ação de uma integrase. Consistem de um gene da integrase (*intI*), um local de recombinação (*AttI*), e um ou dois promotores responsáveis pela expressão dos cassetes gênicos inseridos. Integrons são transportados em plasmídeos e transposons que podem potencializar a disseminação de genes de resistência a antibióticos entre espécies bacterianas (RECCHIA *et al.*, 1994; MCDERMOTT *et al.*, 2003).

Os bacteriófagos do tipo temperado são elementos genéticos móveis que integram-se no cromossomo bacteriano (profagos) replicando-se à cada divisão celular. Enquanto integrados ao cromossomo, podem conferir vantagens à célula hospedeira, tornam-se ativos apenas quando a célula mostra sinais de estresse.

Os elementos integrativos conjugativos – ICEs (do inglês *Integrative and Conjugative Elements*) também conhecidos como elementos conjugativos autotransmissíveis integrativos – CONSTINs (um acrônimo com origem na língua inglesa: *Conjugal Self Transmissible Integrating Element*),

denominações que descrevem sua capacidade de autotransferência e integração no cromossomo bacteriano, formam um grupo variado de EGMs, que se transferem por meio do contato célula-célula, através de *pili* sexual e se integram no cromossomo do micro-organismo receptor (BURRUS *et al.*, 2002; WOZNIAK *et al.*, 2009).

1.2 ORIGEM DO ELEMENTO SXT

A classificação de *V. cholerae* em dois grupos: um com potencial para causar epidemias (sorogrupo O1) e o outro sem esse potencial (sorogrupo não-O1), se baseou no fato de que todas as cepas isoladas desde a primeira pandemia de cólera, iniciada em 1817, tinham sido identificadas como pertencentes ao sorogrupo O1 (NAIR *et al.*, 1994). No entanto, durante a última pandemia de cólera, (iniciada em 1992 na cidade de Madras, sul da Índia, e ainda em curso), foi isolada uma cepa toxigênica de *V. cholerae* que não reagia ao teste de aglutinação ao antissoro O1 ou a qualquer antissoro existente, dando origem ao novo sorogrupo O139 (ALBERT *et al.*, 1993; BHATTACHARYA *et al.*, 1993; RAMAMURTHY *et al.*, 1993, NAIR *et al.*, 1994).

O perfil de sensibilidade aos antibióticos do então denominado *V. cholerae* O139, cepa MO10, foi determinado e caracterizou-se por possuir resistência a sulfametazol, trimetoprima, furazolidona e, discreta resistência à estreptomicina (WALDOR e MEKALANOS, 1994). Estudos posteriores,

conduzidos por WALDOR *et al.* (1996), identificaram uma estrutura genética que continha os genes que codificavam resistência a esses antibióticos. Essa estrutura recebeu a denominação de elemento SXT (abreviação utilizada para designar a associação dos antibióticos sulfametoxazol e trimetoprima), posteriormente foi renomeada SXT^{MO10}, em referência à cepa na qual foi descrita (WALDOR *et al.*, 1996).

Aproximadamente dois anos após a emergência do *Vibrio cholerae* O139, surgiu uma nova cepa de *Vibrio cholerae* O1 El Tor apresentando as características de resistência aos mesmos antibióticos conferidos pelo elemento SXT^{MO10} (YAMAMOTO *et al.*, 1995). Essa cepa apresentou um elemento SXT, denominado SXT^{ET}, que se mostrou altamente relacionado, porém, não idêntico ao SXT^{MO10} (WALDOR *et al.*, 1996). Posteriormente, o elemento SXT^{ET} também foi encontrado em uma cepa de *Vibrio cholerae* O139 (HOCHHUT *et al.*, 2001b), evidenciando a mobilidade desses elementos.

Os elementos SXT não são exclusivamente encontrados em *V. cholerae*, apesar de serem mais estudados nessa espécie. O elemento R391, que medeia a resistência à canamicina e ao mercúrio, originalmente encontrado em *Providencia rettgeri*, é funcional e geneticamente relacionado ao elemento SXT encontrado em *Vibrio cholerae* (HOCHHUT *et al.*, 2001a). Dessa maneira juntos, o SXT^{MO10} e o elemento R391 constituem o padrão da família de ICEs SXT/R391.

Desde o relato do SXT^{MO10}, diferentes variedades de elementos SXT, ou à ele relacionados, têm sido descritas em *Vibrio cholerae* O1, *V. cholerae* O139, outras espécies de *Vibrio* e outras espécies de bactérias, em vários continentes (AMITA *et al.*, 2003; DALSGAARD *et al.*, 2001, CECCARELLI *et al.*, 2006; DALSGAARD *et al.*, 1999; EHARA *et al.*, 2004; BANI *et al.*, 2007; IWANAGA *et al.*, 2004; TOMA *et al.*, 2005; BURRUS *et al.*, 2006b).

1.3 CARACTERÍSTICAS DO ELEMENTO SXT

O elemento SXT é composto por aproximadamente 100 Kilobases (BURRUS e WALDOR 2004), dos quais 62 Kb abrigam genes de resistência a antibióticos que conferem resistência ao sulfametoxazol, a trimetoprima, a estreptomicina e ao cloranfenicol WALDOR *et al.*, 1996).

Este elemento é um exemplo de quimera, uma vez que é composto por genes de resistência a antibióticos associados a transposons e ligados a uma variedade de genes de plasmídeos e fagos, bem como outros genes provenientes de fontes desconhecidas.

O elemento SXT foi considerado membro da família dos transposons conjugativos, por suas características de mobilização dentro do genoma e por sua capacidade de codificar múltiplos genes de resistência a antibióticos (HOCHHUT *et al.*, 2001b; BEABER *et al.*, 2002b); porém, embora utilize um sistema de conjugação relacionado a transposons, difere de outros transposons conjugativos, pelo contato célula-célula ocorrer através da

formação de *pili*, característica de um plasmídeo F (WALDOR *et al.*, 1996). Embora se transfiram por conjugação através de *pilus* sexual, como um plasmídeo F, o elemento SXT se integra ao cromossomo da célula receptora, sendo que o plasmídeo F se mantém na forma circular independente. Como um fago temperado, o elemento SXT multiplica-se junto com o cromossomo do microrganismo receptor, porém se integra por conjugação ao cromossomo bacteriano, enquanto o fago se integra por transdução.

A estrutura essencial dos ICEs da família SXT/R391 é constituída por módulos funcionais encontrados em todos os elementos e que asseguram a manutenção, disseminação e regulação do elemento. Estes módulos estão configurados em conjuntos de genes (*clusters*) que podem ser trocados entre diferentes elementos, ou com o cromossomo (TOUSSAINT e MERLIN, 2002; BURRUS e WALDOR, 2004; GARRIS e BURRUS, 2013).

WALDOR e colaboradores (1996) demonstraram que mais da metade da sequência do SXT^{MO10} (62 kb, com já citado), incluindo a estrutura composta, *tipo-transposon*, que contém genes de resistência a antibióticos, não é necessária para a sua mobilidade. A estrutura funcional básica do elemento SXT, está contida em três módulos (Figura 2), os quais asseguram a transferência vertical e possibilitam a aquisição e transferência de genes (BURRUS e WALDOR, 2004; GARRIS e BURRUS 2013).

necessária a codificação de uma tirosina recombinase que possui similaridade com a família da integrase λ (HOCHHUT e WALDOR, 1999).

O módulo responsável pela disseminação (processamento de DNA e formação de pares de acasalamento) é composto principalmente por diferentes combinações de genes *tra*, responsáveis pela maquinaria de conjugação e genes que conferem alguma vantagem adaptativa, como genes de resistência a antibióticos e a metais pesados, dentre outros (WALDOR *et al.*, 1996).

As funções de processamento de DNA são divididas em dois grupos. O primeiro grupo contém a origem de transferência (*oriT*), um substrato da relaxase *Tral* e o gene *mobI*, responsável pelo reconhecimento de *oriT* (CECCARELLI *et al.*, 2008). No segundo grupo estão *tral*, uma suposta relaxase conjugativa, *traD*, que atua estabilizando o acoplamento e *traJ*, o qual codifica uma proteína homóloga no plasmídeo F (WOZNIAK, *et al.*, 2009), onde possui a função de regulação da expressão do operon *tra* (WILLETTS, 1977). Entre estes dois grupos estão localizados *rumBA* (que frequentemente contém genes de resistência a antibióticos) e alguns quadros abertos de leitura (*open reading frames* – ORFs), com funções desconhecidas.

Ainda no módulo de disseminação, as funções de transposição são realizadas por um sistema de secreção do tipo IV (*type IV secretion system* – T4SS), estruturado em três agrupamentos de genes (*clusters*): *traL/traE/traK/traB/traV/traA*, que incluem os genes necessários para a

formação do *pilus* (ANTHONY *et al.*, 1996), *s054/traC/trhF/traW/traU/ traN* e *traFHG*, responsáveis pelo processo de conjugação (WOZNIAK *et al.*, 2009; GARRIS e BURRUS, 2013).

Entre *traN* e *traF* está situado o gene *s063*, cuja função não foi plenamente entendida, no entanto, integra o módulo responsável pela disseminação, uma vez que sua ausência diminui em aproximadamente 100 vezes a frequência de transferência de SXT (WOZNIAK *et al.*, 2009).

No último módulo encontram-se os genes implicados na regulação do ICE, ou seja, reprimem ou ativam sua transferência. Dois *loci* do SXT^{MO10}, designado *setC* e *setD*, cujas seqüências de aminoácidos são semelhantes aos dos reguladores flagelares *FlhC* e *FlhD*, foram observados como codificadores dos reguladores que ativam a transcrição de genes necessários para a excisão e transferência de SXT^{MO10} (BEABER *et al.*, 2002a). Outro *locus*, designado *setR*, cujo produto tem similaridade com repressores do fago lambdóide, também parece regular a expressão gênica do SXT^{MO10} (BEABER *et al.*, 2002a; BEABER *et al.*, 2004).

A organização estrutural genética mais detalhada do elemento SXT^{MO10}, composta por 86 genes, distribuídos em 99.483 bp, estão representados na Figura 3.

Figura 3. Representação esquemática da organização genética do elemento SXT^{MO10} (sem escala). Sequência geral do elemento, composto de 99.483 bp, dentre os quais estão distribuídos 86 genes. Os genes estão representados por setas mostrando o sentido de leitura. As setas destacadas por cores indicam os principais genes de função igual e/ou semelhante: transposase (representados em amarelo), a resistência aos antibióticos (representados em azul), transferência conjugativa (representados em vermelho), e regulação (representados em verde). As ORFs de função conhecida ou não, cujos melhores hits por BLAST são encontrados nos genomas de fagos, estão representadas por setas verdes. Outras ORfs estão representadas por setas brancas. O ponto laranja indica a posição da origem de transferência. Os números indicados na régua referem-se à localização aproximada. Os genes envolvidos na integração/excisão e regulação estão localizados nas extremidades direita e esquerda, respectivamente. Os genes de resistência a antibióticos que codificam para trimetoprim, cloranfenicol, estreptomicina e sulfametoxazol estão agrupados próximos à extremidade 5', flanqueados por genes que codificam transposase. Os genes relacionados com a transferência do elemento estão agrupados em quatro *clusters* a partir do meio do elemento SXT. Fonte: baseado em esquema publicado por BEABER *et al.* (2002b), modificado pela autora, com base em GARRIS e BURRUS, 2013).

1.4 O ELEMENTO SXT NO MEIO AMBIENTE

O meio ambiente é um reservatório de genes de resistência aos antibióticos de forma que mudanças nesses ecossistemas podem ser relevantes para a emergência de determinantes de resistência em patógenos bacterianos (MARTÍNEZ, 2008). Um bom exemplo é o *V. cholerae*, cujos determinantes de resistência são relatados principalmente associados a plasmídeos e integrons (BIK *et al.*, 1995). Embora cepas de *V. cholerae* com perfil de múltipla resistência a antibióticos tenham sido isoladas a partir de 1977, existe um único relato da presença do elemento SXT em cepas ambientais de *Vibrio cholerae* não-O1/não-O139 antes de 1992 (MOHAPATRA *et al.*, 2008), não havendo nenhum outro indício do elemento SXT antes desse período (AMITA *et al.*, 2003; CECCARELLI, *et al.*, 2011), quando então, os genes de resistência em *V. cholerae* eram descritos principalmente associados aos plasmídeos e integrons (BIK *et al.*, 1995).

Após o surgimento do SXT^{MO10}, primeiramente identificados no novo sorogrupo de *V. cholerae* isolados de surtos de cólera e também no meio ambiente, ocorreu uma rápida difusão, tanto do novo sorogrupo quanto do SXT^{MO10}, em distintas áreas geográficas, especialmente no sudeste da Ásia (WALDOR *et al.*, 1996). Atualmente, estão presentes em quase todas as cepas de *Vibrio cholerae* isolados nessa região (HOCHHUT *et al.*, 2001a), e estão sendo identificados nos poucos estudos conduzidos com esse fim.

Foram estudados isolados de *V. cholerae* O1 El Tor com mesmo perfil de resistência de *V. cholerae* O139 e que possuíam genes agrupados em uma estrutura muito semelhante ao SXT^{MO10}. A comparação entre os dois elementos mostrou que divergiam em um gene de resistência a trimetoprima que no sorogrupo O1 era conferido pelo gene *dfrA1* e no O139 por um gene diferente, designado *dfr18* (HOCHHUT *et al.*, 2001b). O elemento SXT^{LAOS} (elemento SXT de *V. cholerae* isolado em Laos), também difere dos elementos SXT previamente descritos não contendo genes *dfrA1* ou *dfr18*, os quais medeiam a resistência ao trimetoprima em SXT^{ET} (elemento SXT de *V. cholerae* O1 biotipo El Tor) e SXT^{MO10}, respectivamente (IWANAGA, *et al.*, 2004; RAMACHANDRAN *et al.*, 2007).

Em outubro de 2010 iniciou-se um surto de cólera no Haiti. Entre 21 e 27 de outubro, foi relatado um total de 4.722 casos de cólera e 303 mortes no Haiti. O isolamento e identificação do *Vibrio cholerae* O1 toxigênico, sorotipo Ogawa, biotipo El Tor realizados pelo Laboratório Nacional de Saúde Pública do Ministério de Saúde Pública e População do Haiti foi confirmado pelo CDC. O teste de sensibilidade a antibióticos, realizado em alguns destes isolados de *Vibrio cholerae* demonstrou sensibilidade a tetraciclina, ciprofloxacina, e canamicina; e resistência a trimetoprima-sulfametoxazol, furazolidona, ácido nalidíxico, sulfisoxazol, e estreptomicina (CDC, 2010). Naquele momento não havia sido determinada a caracterização genotípica dos isolados do surto, porém, o perfil de sensibilidade a antibióticos era indicativo da presença de um elemento SXT

entre os isolados, o que foi confirmado posteriormente por CHIN *et al.* (2011).

A investigação de uma cepa de *V. fluvialis*, isolado de um caso clínico com padrão de resistência a antibióticos idêntico ao atribuído pelo SXT^{MO10}, detectou a presença de um elemento semelhante ao SXT^{MO10} com genes *int* e sítio *attP* diferentes do padrão apresentado por *V. cholerae*, indicando que o SXT^{MO10} pode ter sido transferido horizontalmente do *V. cholerae* para o *V. fluvialis* ou que esse possa ser um tipo variante (AHMED *et al.*, 2005).

Pesquisadores tailandeses, ao caracterizar o genótipo de resistência aos antibióticos de cepas de *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. fluvialis* e *V. vulnificus*, isolados de camarões marinhos cultivados, detectaram a presença de integrons de classe 1 contendo um cassete gênico *rumA* incompleto. O operon *rumAB* é parte de elemento SXT^{MO10} em espécies do gênero *Vibrio*. Das 83 cepas de *Vibrio* spp., sete foram positivas para a presença do gene da integrase *int*_{SXT} (três em *V. cholerae*, duas em *V. fluvialis* e um em ambos, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*) que demonstram a presença do elemento SXT^{MO10}. A maioria, 89% foi resistente a pelo menos um antibiótico e 26% foram resistentes no mínimo a três classes diferentes de antibióticos. As taxas de resistência foram de 61% para ampicilina, 20% para ciprofloxacina, 42% para eritromicina, 7% para estreptomicina, 28% para sulfametoxazol, 19% para tetraciclina e 20% para trimetoprim (KITIYODOM *et al.*, 2010).

No Brasil, não havia estudos que investigassem a presença do elemento SXT até 2010, quando, após uma breve triagem desses elementos, conduzida por MAYER (2010), no Laboratório de Saúde Pública da FSP/USP, ao caracterizar o perfil de sensibilidade a antibióticos de espécies do gênero *Vibrio*, detectou o elemento SXT em uma cepa de *V. fluvialis*. Devido à sua diversidade, é possível sugerir que esses os elementos SXT fazem parte de um grupo de EGMs que contribuem consideravelmente para a distribuição de genes de resistência (HOCHHUT *et al.*, 2001b; IWANAGA *et al.*, 2004; MOHAPATRA *et al.*, 2008), e por essa razão, justifica-se o seu estudado em cepas brasileiras.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Detectar a presença e caracterizar o elemento integrativo e conjugativo, da família SXT/R391 em isolados bacterianos pertencentes à coleção de cultura do Laboratório de Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública/USP.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 🧬 Pesquisar a presença de ICEs da família SXT/R391 dentre os isolados bacterianos em estudo.
- 🧬 Determinar as sequências das regiões que caracterizam os ICEs da família SXT/R391 dentre os isolados bacterianos em estudo.
- 🧬 Pesquisar a presença de genes de resistência aos antibióticos que caracterizam os ICEs da família SXT/R391 dentre os isolados bacterianos em estudo.
- 🧬 Comparar as características dos ICEs da família SXT/R391 obtidos no estudo com ICEs da mesma família disponíveis em banco de dados públicos de sequências de nucleotídeos e proteínas.
- 🧬 Desenvolver iniciadores, para a detecção da presença dos elementos SXT característicos do Brasil.
- 🧬 Determinar a sensibilidade aos antibióticos de diferentes classes, dentre os isolados bacterianos em estudo que alberguem ICEs da família SXT/R391.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ORIGEM DAS AMOSTRAS

Foram selecionadas para o estudo bactérias provenientes de amostras de esgoto, água do mar, água de recreação, água salobra, água mineral, frango, ostras, mariscos e peixes, isoladas entre os anos de 1993 e 2012, nas cidades paulistas de São Paulo, Guarulhos, Santos, Cubatão, Mongaguá e Iporanga; nas cidades baianas de Camaçari, Valença e Feira de Santana. As bactérias pertencem à coleção de cultura do Laboratório de Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo e foram presuntivamente identificadas através de ensaios bioquímicos.

Foram primeiramente selecionados cepas de *Vibrio cholerae* provenientes de amostras de esgoto coletadas em período epidêmico, em seguida amostras de alimentos e ambiente nas quais foram isolados *Vibrio* spp. em qualquer período, e por último, esgotado os lotes de amostras com estes perfis, partiu-se para amostras de ambiente e alimentos não necessariamente positivas para o gênero *Vibrio*.

Por intermédio deste critério, foi selecionado o total de 1120 isolados, sendo 456 (41 %) provenientes de amostras de esgoto, 562 (50 %) provenientes de amostras de alimentos e 102 (9 %) provenientes de outras amostras ambientais, que não esgoto.

3.2 REISOLAMENTO DOS MICRO-ORGANISMOS

Isolados bacterianos selecionados para o estudo, preservados a -80 °C, em microtubos contendo 0,5 mL de suspensão bacteriana em Caldo Lúria Bertani – CLB (Himedia Laboratories Pvt. Ltd. Mumbai, India) e igual volume de glicerol a 80 %, foram inoculados em tubos contendo 2 mL de CLB e cultivados a 35 °C por 24 horas para teste de viabilidade.

Após 24 horas, os isolados que se mostraram viáveis foram reisolados pela técnica de esgotamento por estrias, em placas de Petri contendo 17 mL de Ágar Lúria Bertani – ALB (Himedia Laboratories Pvt. Ltd. Mumbai, India) e novamente cultivados a 35 °C por 24 horas, para teste de pureza do isolado.

Dos isolados inicialmente avaliados, os que se mostraram viáveis para o prosseguimento do estudo, tiveram uma colônia pura inoculada em tubo contendo 4 mL de ALB inclinado, cultivada a 35°C por 24 horas, e mantida à temperatura ambiente, para utilização nos procedimentos subsequentes.

3.3 EXTRAÇÃO DO DNA GENÔMICO

Para a detecção do elemento SXT foi realizada a extração do DNA genômico em pequena escala, de cada um dos isolados bacterianos, através

do método de choque térmico descrito por CHAPMAN *et al.* (2001), com modificações.

Após a triagem, cada um dos isolados bacterianos que se mostrou positivo para a presença do elemento SXT teve seu DNA extraído pelo método do Brometo de Cetiltrimetilamônio – CTAB, apresentado por MURRAY e THOMPSON (1980) e descrito por AUSUBEL *et al.* (1995), com modificações. O DNA genômico obtido por este método será utilizado nas reações para detecção de genes e regiões intergênicas que caracterizam o elemento SXT, bem como para a identificação de espécie, por intermédio do gene 16S rDNA.

3.3.1 Extração por Choque Térmico

Cada amostra foi inoculada em tubo tipo *Falcon*® (50 mL) contendo 10 ml de CLB e incubada a 35 °C $\pm$ 2 por 18-24 horas. Após esse período foi centrifugada a 2.566 xg durante 10 minutos em temperatura ambiente – TA (24 °C). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células foi novamente suspenso em 1 mL de água ultrapura (Milli-Q Gradient System – Millipore ®) estéril. Depois de homogeneizada, a suspensão foi transferida para um tubo tipo *Eppendorf*® de 1,5 ml, e centrifugada a 15.294 xg durante 3 minutos em TA e o sobrenadante descartado. O *pellet* de células foi ressuspenso em 200 μ L de água ultrapura estéril e mantido em banho maria a 95 °C por 10 minutos. Após esse período, foi congelado em freezer -20 °C por 30 minutos

e então, mantidos a 65 °C até completo descongelamento. Depois de descongelado, o tubo foi centrifugado a 15.294 xg por 10 minutos em TA e até 200 µL do sobrenadante foi transferido para um novo tubo tipo *Eppendorf*® de 1,5 ml e armazenado em freezer -20 °C até o momento da utilização (máximo de duas semanas).

3.3.2 Extração pelo Brometo de Cetiltrimetilamônio – CTAB

Cada amostra foi inoculada em tubo de *Falcon*® (50 mL) contendo 10 ml de CLB e incubada a 35 °C±2 por 18-24 horas, quando então, foi centrifugada a 2.566 xg durante 10 minutos em temperatura ambiente – TA (24 °C). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 567 µL de solução tampão TE I (Tris-HCl [pH 8,0] 10 mM, EDTA [pH 8,0] 1 mM). Após acrescentar 30 µL de solução a 10 % de SDS e 3 µL de solução de proteinase K (na concentração de 20 mg/mL em H₂O ultrapura estéril), o conteúdo foi homogeneizado, e depois de transferido para tubo tipo *Eppendorf*® de 1,5 mL, incubado a 37 °C por 1 hora. Após o período de incubação foram adicionados 100 µL de solução 5M NaCl e a mistura foi homogeneizada e acrescida de 80 µL de CTAB, previamente aquecido em banho-maria a 65 °C por no mínimo 10 minutos. A suspensão foi homogeneizada com cuidado, incubada em banho-maria 65 °C por 20 minutos e depois esfriada em TA. Foram adicionados à solução, aproximadamente 700 µL de clorofórmio–álcool isoamílico na proporção de 24:1, que foi agitada vigorosamente e centrifugada a 10.621 xg durante 25

minutos, em temperatura de 24 °C. Depois de removida cuidadosamente a fase superior (sobrenadante) com o auxílio de uma pipeta automática e transferida para um novo tubo tipo *Eppendorf*® de 1,5 ml, foram adicionados 5 µL de RNase A na concentração de 10 mg/mL e incubada a 37 °C por 1 hora. Foram adicionados aproximadamente 600 µL de clorofórmio puro e então agitada vigorosamente e centrifugada a 10.621 xg durante 15 minutos em TA. Depois de removida cuidadosamente, mais uma vez, a fase superior (sobrenadante) com o auxílio de uma pipeta automática e transferida para um novo tubo tipo *Eppendorf*® de 1,5 ml, foram adicionados 0,6 vezes o volume (± 700 µL) de 2-propanol (álcool isopropílico) gelado. O DNA foi precipitado cuidadosamente com movimentos rotatórios no sentido horário, e centrifugado a 10.621 xg durante 5 minutos em TA. O sobrenadante foi descartado, lavado com 1 mL de etanol 70 % gelado e centrifugado novamente a 10.621 xg durante 5 minutos em TA. O sobrenadante foi novamente descartado e os tubos tipo *Eppendorf*® mantidos abertos sob vácuo num período mínimo de 12 horas (*overnight*), para a secagem do DNA extraído.

3.3.2.1 Qualidade do DNA Extraído

Cada amostra de DNA genômico foi ressuspensa em 50 µL da solução tampão TE II (Tris-HCl [pH 8.0] 10 mM, EDTA [pH 8.0] 0,1 mM) por no mínimo 10 minutos, quando então sua qualidade foi analisada. A

concentração da amostra de DNA foi medida por espectrofotometria de ultravioleta (*Biophotometer Eppendorf®*), nos comprimentos de onda 260/280 nm. A amostra de DNA foi considerada de boa qualidade quando apresentou a razão entre 260/280 nm (DNA/proteína), na faixa entre 1,8 e 2,0. A eletroforese foi realizada em gel de agarose na concentração 1 %, em tampão TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA). As amostras de DNA fora do padrão de qualidade exigido foram descartadas e novamente extraídas. As amostras de DNA que passaram no controle de qualidade foram mantidas em refrigerador (entre 4 e 10 °C) até o momento de utilização nas provas moleculares.

3.4 ANÁLISE GENOTÍPICA

3.4.1 Reação em Cadeia pela Polimerase – PCR

Rotineiramente os ciclos térmicos para a PCR foram realizados por intermédio do termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf®). Em cada lote de reação foi utilizado como controle negativo, 5 µL de água ultra pura estéril e como controle positivo, 5 µL do DNA de uma cepa de *Vibrio cholerae* O139, que alberga um elemento SXT relacionado ao SXT^{MO10}, denominada no laboratório como DV14. O controle positivo foi cedido ao Laboratório de Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, através da doutora Maria Helena Matté, pelo

doutor Durg V. Singh (Center for Marine Biotechnology, University of Maryland Biotechnology Institute, Baltimore, MD, USA).

3.4.1.1 Detecção do Elemento SXT

Para a realização da triagem do elemento SXT foram empregadas as amostras de DNA obtidas através de choque térmico, descrita no item 3.3.1. Estas amostras foram submetidas à amplificações por intermédio da PCR, empregando-se iniciadores para o sítio *attP* (HOCHHUT e WALDOR, 1999) e para integrase *int_{SXT}* (AHMED *et al.*, 2005), descritos no quadro 1.

As condições da PCR, componentes da reação – *Master Mix* e ciclos térmicos foram realizados segundo a padronização de MAYER (2010) com modificações e podem ser vistas no quadro 1.1.

As amostras de DNA que se mostraram negativas para a presença do Elemento SXT, após a primeira triagem, utilizando os iniciadores clássicos, descritos no quadro 1, foram triadas novamente, utilizando outros iniciadores descritos na literatura, bem como, iniciadores desenvolvidos neste estudo.

Quadro 1– Sequência nucleotídica de iniciadores para pesquisa do gene integrase *int*_{SXT} e do sítio *attP*, utilizados na reação de PCR, para a triagem do elemento SXT.

Nome do Iniciador	Sequência nucleotídica (5' to 3')	Região amplificada	Tamanho do fragmento (pb)
attP-F	TGCTGTCATCTGCATTCTCCTG	<i>attP</i> (1)	785
attP-B	GCCAATTACGATTAACACGACGG		
IntSXTF	CCCAAAGCAGAATCACGTAA	<i>int</i> (2)	1350
IntSXTB	GAAGATTTGGAGGAGTATGAG		

Fonte: (1)HOCHHUT e WALDOR, 1999; (2)AHMED *et al.*, 2005 .

Quadro 1.1: Condições de amplificação pela PCR, indicando componentes e ciclos térmicos da reação.

Componentes	Volume (μL)	Concentração Final	Ciclos térmicos		
			Temperatura	Tempo	Nº de Ciclos
tampão 5X ^a	5	1x (1.5 mM MgCl ₂)	94 °C	5 min.	1X
dNTP mix (25 mM) ^b	0,2	0,2 mM (cada dNTP)	94 °C	1 min.	29X
iniciador senso ^c	0,3	100 pmol/μL	55 °C	1 min.	
iniciador anti-senso ^c	0,3	100 pmol/μL	72 °C	2 min.	
<i>Taq</i> polimerase ^a	0,25	1U	72 °C	5 min.	1X
DNA molde	5	Variável	Temperatura de manutenção 4 °C		
H ₂ O ^d (ultra pura)	25 (q.s.p)	NA ^d			

^a GoTaq® DNA polimerase (Promega Corporation, Madison, USA).

^b dNTP set, 100 mM (Fermentas Life Science, USA).

^c Bioneer Corporation.

^d Não aplicável.

3.4.1.2 Detecção de genes estruturais do elemento SXT

Após a triagem para a presença do elemento SXT, as amostras de DNA que resultaram positivas, foram submetidas à análise para detecção dos genes e de regiões intergênicas: excisionase (Xis), s002-xis, s003-int, attL-xis, rumBA, traG-setC, s026-s027, s043-traL, traA-s054, traN-s063 e s073-traF. Para este fim, as amostras de DNA genômico, obtidas através do método de CTAB, de acordo com o descrito no item 3.3.2., foram utilizadas.

As amostras de DNA foram submetidas a amplificações por intermédio da PCR, sendo que em cada lote de amplificação foram empregadas as mesmas condições descritas no item 3.4.1.

Os parâmetros para amplificação, por meio da PCR (com modificações), bem como os iniciadores empregados, foram baseados na descrição de HOCHHUT *et al.* (2001b), BURRUS *et al.* (2006b), BURRUS e WALDOR (2004) e TOMA *et al.* (2005). As sequências dos iniciadores utilizados para a caracterização do elemento SXT estão relacionadas no quadro 2. As condições da PCR, bem como, componentes da reação e ciclos térmicos podem ser observadas nos quadros 2.1, 2.2 e 2.3.

As amostras de DNA que se mostraram negativas para detecção de genes ou de regiões intergênicas, utilizando os iniciadores inicialmente elencados para o estudo, descritos no quadro 2, foram submetidas a novos testes, utilizando outros iniciadores descritos na literatura, bem como, iniciadores desenvolvidos neste estudo.

Quadro 2 – Iniciadores para pesquisa de genes e regiões do elemento SXT e genes relacionados.

Nome do Iniciador	Sequência nucleotídica (5' to 3')	Região amplificada	Referência
INT1	GCTGGATAGGTTAAGGGCGG	<i>Int</i>	(1)
INT2	CTCTATGGGCACTGTCCACATTG		
INT3	TGAGCCAACCCAATCTATCC	<i>s002-xis</i>	(2)
INT4	TATACGACGCTCTGGCGAAG		
s2Int-F	TGAGCCAACCCAATATATCAACG	<i>s002-xis</i>	Este estudo (2)
INT4	TATACGACGCTCTGGCGAAG		
Fint-Rrv-F	GCGATACCCGAGCACTTAG	<i>Int- s003</i>	Este estudo
s003-R	TGGATCGACTTGAAAAAGCCATG		
s003-fw	ACCTAGCTGAACTTTTTCGGTAC	<i>s003-int</i>	Este estudo
Fint-Rrv	GCGATACCCGAGCACTTAG		
VisLF	GAGTACAAATTCGGTTTTAG	<i>attL-xis</i>	(3)
VisLR3	GCATTCTCCTGAAAATCAATG		
LeftF3	GGTGCCATCTCCTCCAAAGTGC	<i>rumBA</i>	(1)
RumA	CGAGCAATCCCCACATCAAG		
S026F	GAGCAATGGGCGAGAGTTCC	<i>s026-s027</i>	(4)
S027R	TCAGCGACAACCGGAGAATG		
HS1F	GGCTATTCCACCGGTGGTG	<i>s043-traL</i>	(4)
HS1R	TGCCGATCACTAGCCCCAAC		
HotS2F	TTCCAGCAATCAGCGCCG	<i>traA-s054</i>	(2)
HotS2R	CAGTTGTCCTATGTGGACTCGG		
HS4-F	AGTGACCCAGGCATAGAC	<i>traN-s063</i>	(5)
HS4-R	GAAGAGGAAACAGATAACCC		
HotS3F2	CCTAAGCATCCTTGGAAGGCT	<i>s073-traF</i>	(2)
TraF2R	TGGGATGGTCACCCATAGGA		
13TA4	TTGCGGGAGATTATGCTC	<i>traG-setC</i>	(2)
MerR	TGACCATCAATGAAGGTTG		

Referências: (1) Hochhut *et al.*, 2001b; (2) Burrus *et al.*, 2006b; (3) Burrus e Waldor, 2004; (4) Toma *et al.*, 2005; (5) Song *et al.*, 2013.

Quadro 2.1: Condições da PCR, indicando componentes e ciclos térmicos da reação para amplificação das regiões entre os genes, *s002-xis*, *rumBA*, *s026-s027*, *s043-traL*, *traA-s054*, *s073-traF*.

Componentes	Volume (μL)	Concentração Final	Ciclos térmicos		
			Temperatura	Tempo	N° de Ciclos
tampão 5X ^a	5	1x (1.5mM MgCl ₂)	94°C	5 min.	1X
dNTP mix (25mM) ^b	0,2	0,2 mM (cada dNTP)	92°C	45 seg.	29X
iniciador senso ^c	0,3	100 pmol/μL	57°C	1 min.	
iniciador anti-senso ^c	0,3	100 pmol/μL	72°C	20 min.	
<i>Taq</i> polimerase ^a	0,25	1U	72°C	30 min.	1X
DNA molde	5	Variável	Temperatura de manutenção 4°C		
H ₂ Od (ultra pura)	25 (q.s.p)	NA ^d			

^a GoTaq® DNA polimerase (Promega Corporation, Madison, USA).

^b dNTP set, 100mM (Fermentas Life Science, USA).

^c Bioneer Corporation.

^d Não aplicável.

Quadro 2.2: Condições da PCR, indicando componentes e ciclos térmicos da reação para amplificação das regiões entre os genes *attL-xis* e *traG-setC*.

Componentes	Volume (μL)	Concentração Final	Ciclos térmicos		
			Temperatura	Tempo	N° de Ciclos
tampão 5X ^a	5	1x (1.5mM MgCl ₂)	94°C	5 min.	1X
dNTP mix (25mM) ^b	0,2	0,2 mM (cada dNTP)	92°C	45 seg.	34X
iniciador senso ^c	0,3	100 pmol/μL	50°C	2 min.	
iniciador anti-senso ^c	0,3	100 pmol/μL	72°C	5 min.	
<i>Taq</i> polimerase ^a	0,25	1U	72°C	20 min.	1X
DNA molde	5	Variável	Temperatura de manutenção 4°C		
H ₂ Od (ultra pura)	25 (q.s.p)	NA ^d			

^a GoTaq® DNA polimerase (Promega Corporation, Madison, USA).

^b dNTP set, 100mM (Fermentas Life Science, USA).

^c Bioneer Corporation.

^d Não aplicável.

Quadro 2.3: Condições da PCR, indicando componentes e ciclos térmicos da reação para amplificação das regiões entre os genes *traN-s063*.

Componentes	Volume (µL)	Concentração Final	Ciclos térmicos		
			Temperatura	Tempo	Nº de Ciclos
tampão 5X ^a	5	1x (1.5mM MgCl ₂)	94°C	3 min.	1X
1.5mM MgCl ₂	0,5	50mM	94°C	45 seg.	29X
dNTP mix (25mM) ^b	0,2	0,2 mM (cada dNTP)	55°C	1 min.	
iniciador 1 senso ^c	0,3	100 pmol/µL	72°C	10 min.	
iniciador 2 anti-senso ^c	0,3	100 pmol/µL	72°C	3 min.	1X
<i>Taq</i> polimerase ^a	0,25	1U	Temperatura de manutenção 4°C		
DNA molde	5	Variável			
H ₂ Od (ultra pura)	25 (q.s.p)	NA ^d			

^a GoTaq® DNA polimerase (Promega Corporation, Madison, USA).

^b dNTP set, 100mM (Fermentas Life Science, USA).

^c Exxtend biotecnologia.

^d Não aplicável.

3.4.1.3 Detecção de genes de resistência a antibióticos

Para a pesquisa de genes de resistência que caracterizam o elemento SXT, foram empregadas as amostras de DNA genômico obtidas através do método de CTAB, de acordo com o descrito no item 3.3.2.

Os ciclos térmicos para a PCR foram realizados por intermédio do termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf®). Em cada lote de amplificação da PCR foram empregadas as mesmas condições descritas no item 3.4.1.

Os parâmetros para amplificação, por meio da PCR (com modificações), bem como os iniciadores empregados, foram baseados na descrição de HOCHHUT *et al.* (2001b), DALSGAARD *et al.* (1999) e IWANAGA *et al.* (2004). As sequências dos iniciadores utilizados para a caracterização do elemento SXT estão relacionadas no quadro 3.

As condições da PCR, bem como, componentes da reação e ciclos térmicos podem ser observadas nos quadros 3.1, 3.2 e 3.3.

Quadro 3 – Iniciadores para pesquisa de genes de resistência encontrados no elemento SXT.

Nome do Iniciador	Sequência nucleotídica (5' to 3')	Região amplificada	Referência
SUL2-F	TGTGCGGATGAAGTCAGCTCC	<i>sullI</i>	(1)
SUL2-B	AGGGGGCAGATGTGATCGAC		
STRA-F	TTGATGTGGTGTCCCGCAATGC	<i>strA</i>	(1)
STRA-B	CCAATCGCAGATAGAAGGCAA		
STRB-F	GGCACCCATAAGCGTACGCC	<i>strB</i>	(2)
STRB-B	TGCCGAGCACGGCGACTACC		
TMP-F	TGGGTAAGACACTCGTCATGGG	<i>dfrA18</i>	(1)
TMP-B	ACTGCCGTTTTCGATAATGTGG		
DFR1-F	CGAAGAATGGAGTTATCGGG	<i>dfrA1</i>	(3)
DFR1-R	TGCTGGGGATTTTCAGGAAAG		
FLOR-F	TTATCTCCCTGTCGTTCCAGCG	<i>floR</i>	(1)
FLOR-B	TCGTGGAACCTCTGCCAAATG		

Referências: (1) Hochhut *et al.*, 2001b; (2) Dalsgaard *et al.*, 1999; (3) Iwanaga *et al.*, 2004.

Quadro 3.1: Condições da PCR, indicando componentes e ciclos térmicos da reação para amplificação do gene *strB*.

Componentes	Volume (μL)	Concentração Final	Ciclos térmicos		
			Temperatura	Tempo	Nº de Ciclos
tampão 5X ^a	5	1x (1.5mM MgCl ₂)	94°C	3 min.	1X
1.5mM MgCl ₂	0,5	50mM	94°C	30 seg.	24X
dNTP mix (25mM) ^b	0,2	0,2 mM (cada dNTP)	64°C	1 min.	
iniciador 1 senso ^c	0,3	100 pmol/μL	72°C	35 seg.	
iniciador 2 anti-senso ^c	0,3	100 pmol/μL	72°C	3 min.	1X
<i>Taq</i> polimerase ^a	0,25	1U	Temperatura de manutenção 4°C		
DNA molde	5	Variável			
H ₂ Od (ultra pura)	25 (q.s.p)	NA ^d			

^a GoTaq® DNA polimerase (Promega Corporation, Madison, USA).

^b dNTP set, 100mM (Fermentas Life Science, USA).

^c Exxtend biotecnologia.

^d Não aplicável.

Quadro 3.2: Condições da PCR, indicando componentes e ciclos térmicos da reação para amplificação do gene *dfr1*.

Componentes	Volume (μL)	Concentração Final	Ciclos térmicos		
			Temperatura	Tempo	Nº de Ciclos
tampão 5X ^a	5	1x (1.5mM MgCl ₂)	94°C	3 min.	1X
1.5mM MgCl ₂	0,5	50mM	94°C	30 seg.	24X
dNTP mix (25mM) ^b	0,2	0,2 mM (cada dNTP)	57°C	1 min.	
iniciador 1 senso ^c	0,3	100 pmol/μL	72°C	25 seg.	
iniciador 2 anti-senso ^c	0,3	100 pmol/μL	72°C	3 min.	1X
<i>Taq</i> polimerase ^a	0,25	1U	Temperatura de manutenção 4°C		
DNA molde	5	Variável			
H ₂ Od (ultra pura)	25 (q.s.p)	NA ^d			

^a GoTaq® DNA polimerase (Promega Corporation, Madison, USA).

^b dNTP set, 100mM (Fermentas Life Science, USA).

^c Exxtend biotecnologia.

^d Não aplicável.

Quadro 3.3: Condições da mPCR, indicando componentes e ciclos térmicos da reação para amplificação dos pares de genes *sullI* / *strA* e *floR* / *dfr18*.

Componentes	Volume (µL)	Concentração Final	Ciclos térmicos		
			Temperatura	Tempo	Nº de Ciclos
tampão 5X ^a	5	1x (1.5mM MgCl ₂)	94°C	5 min.	1X
1.5mM MgCl ₂	0,5	50mM	94°C	30 seg.	29X
dNTP mix (25mM) ^b	0,2	0,2 mM (cada dNTP)	60°C	1 min.	
iniciador 1 senso ^c	0,3	100 pmol/µL	72°C	1 min.	
iniciador 1 anti-senso ^c	0,3	100 pmol/µL	72°C	5 min.	1X
iniciador 2 senso ^c	0,3	100 pmol/µL	Temperatura de manutenção 4°C		
iniciador 2 anti-senso ^c	0,3	100 pmol/µL			
<i>Taq</i> polimerase ^a	0,25	1U			
DNA molde	5	Variável			
H ₂ O _d (ultra pura)	25 (q.s.p)	NA ^d			

^a GoTaq® DNA polimerase (Promega Corporation, Madison, USA).

^b dNTP set, 100mM (Fermentas Life Science, USA).

^c Bioneer Corporation.

^d Não aplicável.

3.4.2 Visualização dos Produtos da PCR

Os fragmentos amplificados pela PCR, *amplicons*, foram separados por meio de eletroforese em gel de agarose (Agargen, Torrejón de Ardoz, Espanha), na concentração de 1,2%, em tampão TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA) e corados com Brometo de Etídio em concentração final de 10 mg/mL. Foi aplicada no gel de agarose, 5µL de cada amostra, adicionada de tampão *loading* (6X DNA Loading Dye), a uma concentração final de 1 µL/5 µL da amostra. A eletroforese foi realizada em tensão constante de 6V/cm, durante 40 minutos, no mínimo. Em cada ensaio de eletroforese foram utilizados, marcadores de peso molecular adequados para cada tamanho de fragmento esperado, além de controles positivo e negativo.

Os marcadores de peso molecular utilizados no estudo foram o Lambda DNA/HindIII Marker, GeneRuler™ 1kb DNA Ladder, o GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder ready-to-use, o GeneRuler 100 bp DNA Ladder e o 100 pb MassRuler DNA Ladder (Fermentas, Lituania),

Os perfis gerados pelos *amplicons* separados no gel de agarose foram visualizados e registrados digitalmente através do sistema de aquisição de imagens Epi Chemi II Darkroom e o software Labworks (UVP products, California, USA).

3.4.3 Sequenciamento de *Amplicons*

Foram sequenciados apenas alguns *amplicons*, sendo que o critério para a escolha privilegiou, pelo menos, um *amplicon* de tamanho esperado e outro de tamanho atípico representativo de cada gene ou região intergênica. Os *amplicons* cujo tamanho excedia a capacidade do sequenciamento, foram preteridos e serão futuramente submetidos ao sequenciamento completo.

Os *amplicons* escolhidos foram purificados utilizando o kit comercial *illustra™ GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) de acordo com as instruções do fabricante. Alíquotas de 150 ng do DNA purificado, além dos respectivos iniciadores na concentração de 3,2 pmol/μl, foram enviadas para sequenciamento para confirmação da sequência ampliada. O sequenciamento foi realizado pela

empresa Genomic Engenharia Molecular, por meio do BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit da Applied Biosystems e os produtos de sequenciamento submetidos à eletroforese em um sequenciador modelo 3130xl da Applied Biosystems.

Os cromatogramas, resultantes do sequenciamento das amostras, foram utilizados para realização das análises *in silico*.

3.5 ANÁLISE *IN SILICO* DAS SEQUÊNCIAS GENÔMICAS

As sequências parciais de nucleotídeos foram inspecionadas manualmente e, quando necessário, editadas com o auxílio do programa BioEdit, *Sequence Alignment Editor* BioEdit, version 7.0.4.1 (HALL, 1999), com base nos respectivos cromatogramas.

As sequências parciais de cada amostra foram alinhadas por intermédio da ferramenta ClustalW Multiple alignment (THOMPSON *et al.*, 1994), implementada no programa BioEdit ou no programa MEGA, Molecular Evolutionary Genetics Analysis, version 5 (TAMURA *et al.*, 2011). Após a verificação de discrepâncias entre as sequências alinhadas por intermédio de inspeções visuais dos cromatogramas e edição manual, foi obtida uma sequência consenso.

As sequências consenso de cada amostra foram submetidas à análise para verificação do nível de similaridade com as sequências disponíveis em banco de dados público de sequências não redundantes (nr) de nucleotídeos e proteínas, GenBank (NCBI – National Center for Biotechnology Information), através da ferramenta de BLAST – Basic Local Alignment Search Tool, suite blastn, utilizando o algoritmo megablast (ALTSCHUL *et al.*, 1997).

Para estabelecer as relações filogenéticas entre as sequências consenso e as diversas sequências públicas foi utilizado o programa MEGA5 (TAMURA *et al.*, 2011), empregando os métodos de Neighbor-joining (NJ), “vizinhos mais-próximos”, (TAMURA *et al.*, 2007) e de Maximum-likelihood (ML), “Máxima Verossimilhança”, (FELSENSTEIN, 1981).

Na decisão entre qual a árvore filogenética seria considerada, levou-se em conta que quando o número de nucleotídeos utilizados é grande, os métodos NJ e ML mostram semelhante eficácia (SAITOU e IMANISHI, 1989), porém o tempo computacional para o método ML é consideravelmente maior, neste contexto, comparado ao método NJ, tornando este último, o método preferencialmente, porém não exclusivamente, escolhido.

Quando utilizado o método de Neighbor-joining (NJ), as distâncias genéticas entre as amostras foram calculadas dentro do modelo Kimura 2-parâmetros (Kimura2) como modelo de substituição nucleotídica. A

significância estatística, das árvores filogenéticas obtidas, foi estimada através de 1.000 réplicas de Bootstrap.

Uma vez escolhido o método de Maximum-likelihood (ML), as distâncias foram calculadas, segundo modelo de Tamura-Nei e a significância estatística foi estimada com 1.000 replicações.

As sequências completas dos representantes dos principais membros da família SXT/R391, disponíveis no GenBank, serviram de base para inferir as relações filogenéticas entre as sequências obtidas (quadro 4).

Quadro 4: ICEs pertencentes à família SXT/R391 depositados no *GenBank*, utilizados para análise comparativa.

Nome do ICE	Espécie/cepa	Local	Nº de acesso
SXT ^{MO10}	<i>Vibrio cholerae</i> /O139 MO10	Índia	AY055428
R391	<i>Providencia rettgeri</i> *	África do Sul	AY090559
ICE VchBan9	<i>Vibrio cholerae</i> /O1 MJ-1236	Bangladesh	CP001485.1
ICE VchBan5	<i>Vibrio cholerae</i> /O1 Ban5	Bangladesh	GQ463140.1
ICE VchBan8	<i>Vibrio cholerae</i> /O37 MZO-3	Bangladesh	JQ345361.1
ICE VchInd5	<i>Vibrio cholerae</i> /O1 Ind5	Índia	GQ463142.1
ICE VchMex1	<i>Vibrio cholerae</i> /non O1-O139 Mex1	México	GQ463143.1
ICE VchInd4	<i>Vibrio cholerae</i> /O139 Ind4	Índia	GQ463141.1
ICE VflInd1	<i>Vibrio fluvialis</i> /Ind1	Índia	GQ463144.1
ICE VchHai1	<i>Vibrio cholerae</i> /VC1786ICE	Haiti	JN648379.1
ICE SpuPO1	<i>Shewanella putrefaciens</i> /W3-18-1	Oceano Pacífico	CP000503
ICE PalBan1	<i>Providencia alcalifaciens</i> /Ban1	Bangladesh	GQ463139
ICE PmiUSA1	<i>Proteus mirabilis</i> /HI4320	Estados Unidos	AM942759.1
ICE PdaSpa1	<i>Photobacterium damsela</i> /PC554.2	Espanha	AJ870986

Fonte: Banco de dados ICEberg (<http://db-mml.sjtu.edu.cn/ICEberg/>).

* Cepa desconhecida

As sequências que não foram consideradas homólogas foram submetidas à base de dados GenBank, através do programa *Sequin*, ferramenta de submissão eletrônica de sequências de DNA mantida pelo NCBI.

3.6 IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIE – 16S rDNA

Para a identificação da espécie dos 48 isolados bacterianos, que carregam o elemento SXT, o gene 16S rDNA foi amplificado por PCR. Com este propósito foram utilizadas amostras de DNA genômico extraídas pelo método de CTAB, conforme descrito no item 3.3.2.

Os ciclos térmicos para amplificação através da PCR foram realizados por intermédio do termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf®). Em cada lote de reação foram utilizados controles negativo e positivo. Os parâmetros para amplificação, por meio da PCR (com modificações), bem como, os iniciadores foram descritos por THOMPSON *et al.* (2001). Os componentes da reação, ciclos térmicos e iniciadores podem ser observadas nos quadros 5 e 5.1.

Todos os 48 *amplicons* do gene 16S rDNA resultantes da PCR foram purificados utilizando o kit comercial *illustra™ GFX PCR DNA and Gel Band*

Purification (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) e enviados para sequenciamento conforme descrito no item 3.4.3.

Quadro 5: Iniciadores para sequenciamento do gene 16S rDNA.

Nome do Iniciador	Sequência nucleotídica (5' to 3')	Tamanho do fragmento (pb)
MH1-F	AGTTTGATCCTGGCTCAG	1503
MH2-R	TACCTTGTTACGACTTCACCCCA	

Quadro 5.1: Condições da PCR, indicando componentes e ciclos térmicos da reação para amplificação dos pares do gene 16S rDNA.

Componentes	Volume (µL)	Concentração Final	Ciclos térmicos		
			Temperatura	Tempo	Nº de Ciclos
tampão 5X ^a	5	1x (1.5mM MgCl ₂)	95°C	7 min.	1X
1.5mM MgCl ₂	0,5	50mM	95°C	2 min.	34X
dNTP mix (25mM) ^b	0,2	0,2 mM (cada dNTP)	55°C	1 min.	
iniciador 1 senso ^c	0,3	100 pmol/µL	72°C	2 min.	
iniciador 1 anti-senso ^c	0,3	100 pmol/µL	72°C	10 min.	1X
Taq polimerase ^a	0,25	1U	Temperatura de manutenção 4°C		
DNA molde	5	Variável			
H ₂ O ^d (ultra pura)	25 (q.s.p)	NA ^d			

^a GoTaq® DNA polimerase (Promega Corporation, Madison, USA).

^b dNTP set, 100mM (Fermentas Life Science, USA).

^c Bioneer Corporation.

^d Não aplicável.

A análise *in silico* das sequências parciais de nucleotídeos foi realizada conforme o item 3.5, exceto pela análise para verificação do nível de similaridade que foi realizada através de sequências disponíveis em

banco de dados público de sequências 16S ribossomal RNA (Bacteria e Archaea), limitado às cepas tipo, GenBank (NCBI – National Center for Biotechnology Information), através da ferramenta de BLAST – Basic Local Alignment Search Tool, suite blastn, utilizando o algoritmo megablast (ALTSCHUL *et al.*, 1997).

O nível de similaridade foi também verificado através do sistema SILVA, base de dados do *Microbial Genomics Group*, através da ferramenta de alinhamento, *on line*, SINA (SILVA INcremental Aligner) , versão 1.2.11, utilizando como parâmetro 97% de identidade entre sequências (PRUESSE *et al.*, 2012).

3.7 DESENHO DE INICIADORES ESPECÍFICOS

Foram desenvolvidos iniciadores específicos para favorecer a amplificação de regiões intergênicas dos elementos SXT brasileiros. Para esta finalidade foram utilizadas sequências do nosso banco de dados e sequências disponíveis em bancos de dados públicos, as quais foram alinhadas para confirmação de genes ortólogos e para a definição das melhores regiões para escolha dos iniciadores. Os critérios utilizados para o desenho dos iniciadores foram: tamanho de entre 18 e 30 bases; composição entre 30-60% de G+C; término (posição 3') com G, C, CG ou GC; temperatura de desnaturação, T_m (melting temperature) entre 55 e 65°C; T_m entre os iniciadores senso e anti-senso não exceder 2°C; não

Para as cepas pertencentes ao gênero *Vibrio*, foram empregados os antibióticos que compõe o painel empregado para a pesquisa do perfil fenotípico de resistência à antibióticos nas enterobactérias, acrescido dos seguintes antibióticos: eritromicina (15µg), furazolidona (100µg), moxifloxacina (5µg), oxacilina (5µg), polimixina B (300u), rifampicina (5µg) e tigeciclina (15µg).

O método empregado foi o teste qualitativo clássico, Kirby Bauer, de disco-difusão em placa, de acordo com o protocolo recomendado pelo CLSI 2012 (*Clinical and Laboratory Standards Institute*). Assim sendo, colônias puras de cada microrganismo em estudo foram transferidas para solução salina estéril, de modo à obter turbidez correspondente a 0,5 da escala de McFarland ($\cong 1,5 \times 10^8$ UFC/mL) e semeadas, com o auxílio de um *swab*, na superfície de uma placa de Petri contendo Agar Müller Hinton, onde foram dispostos discos dos diferentes antibióticos selecionados para o estudo. As placas com o painel de antibióticos foram incubadas a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 16-18 horas.

A interpretação dos resultados foi baseada na medida do diâmetro das zonas de inibição de crescimento e foram consideradas como: sensíveis, intermediárias ou resistentes, de acordo com os padrões do CLSI (2013) para enterobactérias e CLSI (2010) para espécies do gênero *Vibrio*. Para espécies do gênero *Vibrio*, cujos antibióticos testados não possuem *break point* definido, foi utilizado o critério do CLSI (2013) para as enterobactérias e, na falta destes, os critérios do EUCAST 2013 (*European*

Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). Um quadro com os limites considerados está disponível no anexo 4.

O diâmetro das zonas de inibição foi medido em milímetros, incluindo o diâmetro do disco. Colônias que foram observadas dentro da zona de inibição foram reisoladas e submetidas a um novo teste de disco-difusão, com objetivo de confirmar os resultados.

Foram seguidos os parâmetros para o controle de qualidade do teste, conforme recomendado pelo CLSI 2012 (Clinical and Laboratory Standards Institute). A cepa de *Escherichia coli*, ATCC 25922 (*American Type Culture Collection*) foi utilizada como controle de qualidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do total de 1120 isolados bacterianos pertencentes à coleção de culturas reisolados para o estudo, 841 (75%), se mostraram viáveis e foram utilizados para a detecção do elemento SXT.

O total de isolados viáveis foi composto por 423 (50 %) amostras de alimentos sendo, 198 (47 %) de bivalves, 135 (32 %) de peixes, 50 (12 %) de água e 40 (9 %) de frango; 342 (41 %) de amostras de esgoto e 76 (9%) amostras ambientais, sendo 42 (55 %) de água do mar, 18 (24 %) de água doce e 16 (21 %) de água salobra.

Os primeiros isolados, aproximadamente 10 %, do total de 841, aptos para a triagem da presença do elemento SXT, não resultaram a amplificação do sítio *attP* ou da integrase *int*_{SXT}, através dos iniciadores relacionados no quadro 6.

Devido aos resultados negativos e por tratar-se de uma região variável (RV1), procuramos favorecer a detecção de uma provável variante genética da integrase e/ou seu sítio de recombinação, empregando nas amostras de DNA que se mostraram negativas, alguns iniciadores localizados fora da região alvo, bem como iniciadores desenvolvidos para este estudo.

Os ciclos térmicos para a PCR foram realizados por intermédio do termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf®). Em cada lote de

amplificação da PCR foram empregadas as mesmas condições descritas no item 3.4.1.

No quadro 6 estão relacionados os iniciadores empregados na amplificação do sítio *attP* e da integrase *int_{SXT}*. As condições da PCR, componentes da reação – *Master Mix* e ciclos térmicos para PCR e mPCR podem ser observadas no quadro 6.1 e 6.2, respectivamente.

Quadro 6 – Sequência nucleotídica de iniciadores para pesquisa do gene *int_{SXT}*, do sítio *attP*, e regiões adjacentes, utilizados na reação de PCR, para a triagem do elemento SXT em busca ampliada.

Nome do Iniciador	Sequência nucleotídica (5' to 3')	Região	Referência
INT1	GCTGGATAGGTTAAGGGCGG	<i>Int</i>	Hochhut <i>et al.</i> , 2001b
INT2	CTCTATGGGCACTGTCCACATTG	<i>Int</i>	
INT3	TGAGCCAACCCAATCTATCC	<i>xis-s002</i>	Burrus <i>et al.</i> , 2006b
INT4	TATACGACGCTCTGGCGAAG	<i>s002-xis</i>	
VisLF	GAGTACAAATTCCGTTTTAG	<i>attL-xis</i>	Burrus e Waldor, 2004
SXT1F	ATGGCGTTATCAGTTAGCTGGC	<i>Int</i>	Bhanumathi <i>et al.</i> , 2003
SXT2F	CGAACTCGGGTGCTAAATGAC	<i>Int</i>	
IntSXT3R	GTCCGAAACGCCAGTTGA	<i>Int</i>	Este estudo
IntSXT5F	TGAGCTGGATAGGTTAAGGGC	<i>Int</i>	

Quadro 6.1: Condições de amplificação pela PCR, indicando componentes e ciclos térmicos da reação de PCR simples.

Componentes	Volume (μL)	Concentração Final	Ciclos térmicos		
			Temperatura	Tempo	Nº de Ciclos
tampão 5X ^a	5	1x (1.5mM MgCl ₂)	94°C	5 min.	1X
dNTP mix (25mM) ^b	0,2	0,2 mM (cada dNTP)	94°C	1 min.	29X
iniciador senso ^c	0,3	100 pmol/μL	58°C	1 min.	
iniciador anti-senso ^c	0,3	100 pmol/μL	72°C	1 min.	
<i>Taq</i> polimerase ^a	0,25	1U	72°C	5 min.	1X
DNA molde	5	Variável	Temperatura de manutenção 4°C		
H ₂ O ^d (ultra pura)	25 (q.s.p)	NA ^d			

^a GoTaq® DNA polimerase (Promega Corporation, Madison, USA).

^b dNTP set, 100mM (Fermentas Life Science, USA).

^c Bioneer Corporation.

^d Não aplicável.

Quadro 6.2: Condições de amplificação pela PCR, indicando componentes e ciclos térmicos da reação mPCR.

Componentes	Volume (μL)	Concentração Final	Ciclos térmicos		
			Temperatura	Tempo	Nº de Ciclos
tampão 5X ^a	5	1x (1.5mM MgCl ₂)	94°C	5 min.	1X
dNTP mix (25mM) ^b	0,2	0,2 mM (cada dNTP)	94°C	45 seg.	29X
iniciador 1 senso ^c	0,3	100 pmol/μL	53°C	45 seg.	
iniciador 1 anti-senso ^c	0,3	100 pmol/μL	72°C	3 min.	
iniciador 2 senso ^c	0,3	100 pmol/μL	72°C	5 min.	1X
iniciador 2 anti-senso ^c	0,3	100 pmol/μL	Temperatura de manutenção 4°C		
<i>Taq</i> polimerase ^a	0,25	1U			
DNA molde	5	Variável			
H ₂ O ^d (ultra pura)	25 (q.s.p)	NA ^d			

^a GoTaq® DNA polimerase (Promega Corporation, Madison, USA).

^b dNTP set, 100mM (Fermentas Life Science, USA).

^c Bioneer Corporation.

^d Não aplicável.

Os iniciadores foram empregados em ensaios de PCR simples e PCR multiplex (Reação em Cadeia pela Polimerase *multiplex* – mPCR), objetivando detectar múltiplas sequências-alvo em uma mesma reação, possibilitando uma maior oportunidade de pareamento (Figura 4).

Figura 4: Possibilidades de amplificação através de iniciadores utilizados em mPCR. Posicionamento dos iniciadores ao longo da região *xis*-int, elemento SXT e adjacências, indicando a direção de amplificação e possibilidades de amplificação. A seta rosa representa o posicionamento (anti-senso) da integrase do elemento SXT. A seta verde representa o posicionamento (senso) do sítio *xis*. A seta azul representa o posicionamento (anti-senso). Os iniciadores desenvolvidos no estudo estão sublinhados. Os tamanhos dos *amplicons* possíveis dentre as diversas combinações de iniciadores estão grafados em azul. Em destaque, o tamanho do *amplicon* resultante do par de iniciadores escolhido.

Após a nova abordagem, 48 isolados foram considerados positivos para a presença do elemento SXT, dentre os 841 isolados iniciais, pela amplificação da integrase *int*_{SXT}, através da amplificação dos iniciadores SXT1F e IntSXT3R, que resultando em um *amplicon* de 1237pb.

Na Figura 5, podem ser observados os resultados falso negativos para presença do elemento SXT gerados pela utilização do par de iniciadores IntSXTF e IntSXTB, descritos por AHMED *et al.* (2005), em 80 % (39/49) elementos encontrados no estudo.

Figura 5: Eletroforese em gel de agarose 1 %, corado com brometo de etídio, mostrando *int*_{SXT}, amplificado pela PCR, durante a triagem do elemento SXT. A amplificação pela PCR, com a utilização do par de iniciadores IntSXTF e IntSXTB apresentou resultado negativo para a maioria dos elementos SXT. Os números 7, 10, 16, 19, 20, 37 e 38 se referem aos isolados testados. M, marcador de peso molecular GeneRuler™ 100 bp plus DNA Ladder, Fermentas; C+, controle positivo; Br, controle negativo da reação.

Este resultado sugere que a maioria dos elementos SXTs isolados no Brasil, possuem uma variação nessa região, admitida como uma característica de elemento SXT (GARRIS e WALDOR, 2013), sendo necessário um estudo mais aprofundado, para a caracterização dessa região em elementos SXT brasileiros.

Após o sequenciamento do elemento SXT4, verificamos que o este, por exemplo, possui orientação geral de transcrição anti-senso (à montante ou *upstream*). Apesar de incomum, também é apresentada pelo ICE *VchBan9* (GenBank CP001485), documentado por NAIR *et al.*, (2002), em uma cepa de *Vibrio cholerae*, isolado em Matlab, Bangladesh, em 1994. Embora, possa ser o resultado de erro na montagem (*misassembly*) da cepa depositada, segundo opinião de especialistas (comunicação pessoal), essa condição, explicaria o fato dos iniciadores, terem falhado na amplificação das nossas cepas, uma vez que nesse contexto, nunca se encontrariam, por apresentarem sentidos de amplificação contrários (Figura 6).

Figura 6: Representação esquemática do par de iniciadores para o sítio attP, editada a partir da interface gráfica do programa UGENE (OKONECHNIKOV *et al.*, 2012). A régua superior mostra o tamanho aproximado do elemento SXT4 e a visão geral do posicionamento dos iniciadores attP-F e attP-B, no elemento; A régua intermediária mostra o sentido de transcrição anti-senso (*upstream*) e o posicionamento em detalhe de ambos os iniciadores; A régua inferior mostra as sequências senso e anti-senso, de nucleotídeos e aminoácidos.

Os 48 isolados considerados positivos para a presença do elemento SXT, foram nomeados provisoriamente como SXT_n, sendo “n” o número que representa a ordem em que foram detectados (quadro 7).

Incluimos no estudo, o isolado positivo para o elemento SXT (FSP561/08), pertencente à mesma coleção de culturas, descoberto por MAYER (2010). Embora a sequência da sua integrase tenha sido submetida ao GenBank (JQ180502.1), e tenha sido nomeado ICE *VfluBra1*, este elemento não foi caracterizado. Apesar de não pertencer a este estudo, recebeu o número 1 (SXT1), por três razões: não ter sido ainda caracterizado; ter sido o primeiro elemento SXT descoberto no laboratório; e por ter despertado o interesse na busca de novos elementos SXT, originando este estudo.

Quadro 7: Isolados positivos para a presença do elemento SXT utilizados no estudo, segundo gênero do organismo e dados de isolamento.

N° SXT	N° do isolado*	Organismo	Isolamento		
			Origem	Local	Ano
1	709/12	<i>Vibrio fluvialis</i>	bivalve	Bahia	2002
2	710/12	<i>Vibrio</i>	esgoto	Santos	1994
3	711/12	<i>Vibrio</i>	bivalve	Bahia	2002
4	712/12	<i>Vibrio</i>	bivalve	Bahia	2001
5	713/12	<i>Vibrio</i>	água salobra	Cubatão	2000
6	714/12	<i>Vibrio</i>	água salobra	Cubatão	2000
7	715/12	<i>Vibrio</i>	água doce	São Paulo	2000
8	716/12	<i>Morganella</i>	esgoto	Santos	2012
9	717/12	<i>Providencia</i>	esgoto	São Paulo	2012
10	718/12	<i>Providencia</i>	esgoto	São Paulo	2012
11	719/12	<i>Providencia</i>	esgoto	São Paulo	2012
12	720/12	<i>Providencia</i>	esgoto	São Paulo	2012
13	721/12	<i>Proteus</i>	esgoto	São Paulo	2012
14	722/12	<i>Morganella</i>	esgoto	São Paulo	2012
15	723/12	<i>Providencia</i>	esgoto	São Paulo	2012
16	724/12	<i>Providencia</i>	esgoto	Guarulhos	2012
17	725/12	<i>Providencia</i>	esgoto	Guarulhos	2012
18	726/12	<i>Morganella</i>	esgoto	São Paulo	2012
19	727/12	<i>Vibrio</i>	esgoto	São Paulo	2012
20	728/12	<i>Vibrio</i>	esgoto	São Paulo	2012
21	729/12	<i>Providencia</i>	esgoto	São Paulo	2012
22	730/12	<i>Providencia</i>	esgoto	São Paulo	2012
23	731/12	<i>Providencia</i>	esgoto	São Paulo	2012
24	732/12	<i>Proteus</i>	esgoto	Guarulhos	2012
25	733/12	<i>Vibrio</i>	esgoto	Santos	2012
26	734/12	<i>Vibrio</i>	esgoto	Santos	2012
27	735/12	<i>Vibrio</i>	esgoto	Santos	2012
28	736/12	<i>Vibrio</i>	esgoto	Santos	2012
29	737/12	<i>Vibrio</i>	esgoto	Santos	2012
30	738/12	<i>Vibrio</i>	esgoto	Santos	2012
31	739/12	<i>Vibrio</i>	esgoto	Santos	2012
32	740/12	<i>Providencia</i>	esgoto	São Paulo	2012
33	741/12	<i>Providencia</i>	esgoto	São Paulo	2012
34	742/12	<i>Providencia</i>	esgoto	São Paulo	2012
35	743/12	<i>Providencia</i>	esgoto	São Paulo	2012
36	744/12	<i>Morganella</i>	esgoto	São Paulo	2012
37	745/12	<i>Providencia</i>	esgoto	São Paulo	2012
38	746/12	<i>Providencia</i>	esgoto	São Paulo	2012
39	747/12	<i>Providencia</i>	esgoto	São Paulo	2012
40	748/12	<i>Providencia</i>	esgoto	São Paulo	2012
41	749/12	<i>Providencia</i>	esgoto	São Paulo	2012
42	750/12	<i>Proteus</i>	frango	São Paulo	2012
43	751/12	<i>Proteus</i>	frango	São Paulo	2012
44	752/12	<i>Proteus</i>	frango	São Paulo	2012
45	753/12	<i>Proteus</i>	frango	São Paulo	2012
46	754/12	<i>Proteus</i>	frango	São Paulo	2012
47	755/12	<i>Proteus</i>	frango	São Paulo	2012
48	756/12	<i>Proteus</i>	frango	São Paulo	2012
49	757/12	<i>Proteus</i>	frango	São Paulo	2012

*Número de identificação no freezer -80 °C.

4.1 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DO ELEMENTO SXT

Para caracterizar os 48 elementos SXT, obtidos no presente estudo e o ICE *VfluBra1* (JQ180502.1), foram realizadas as análises para a detecção da presença ou da ausência dos principais genes ou regiões intergênicas que compõem o elemento SXT, bem como seu tamanho aproximado, de modo à inferir sobre suas características.

Os elementos SXT são descritos com base nas características de SXT^{MO10} e do elemento R391, que são o padrão dos ICEs da família SXT/391. Disponíveis em banco de dados públicos estão depositadas as sequências completas de mais 12 ICEs pertencentes à essa família. Embora todos os 14 elementos SXT constituam um arcabouço para a comparação dos elementos SXT encontrados no estudo, o tripé SXT^{MO10}, elemento R391 e ICE *VchMex1* formam a nossa principal base de comparação. Acrescentamos o ICE *VchMex1* na nossa comparação devido ao fato de que esse elemento SXT foi o primeiro descrito na América.

Os ICEs pertencentes à família SXT/R391, estão organizados em uma estrutura modular formada por aglomerados de genes, “*clusters*”, com funções semelhantes. Por essa razão procuramos pesquisar os componentes mais representativos das regiões principais, previamente descritos na literatura, previamente mostrados na Figura 3. Dessa maneira, para caracterizar os elementos SXT obtidos, além do sítio attP e o gene *int*_{SXT}, utilizados para a triagem, foram pesquisadas as regiões intergênicas *s002-xis*, *s003-int*, e *attL-xis*, localizadas no módulo responsável pela

manutenção, (integração/excisão); as regiões intergênicas relacionadas à disseminação, como *rumBA*, *s026-s027* e *s043-traL*, bem como os genes de resistência à antibióticos, *sulII*, *strA*, *strB*, *dfrA1*, *dfrA18* e *floR*; as regiões intergênicas relacionadas à conjugação, *traA-s054*, *traN-s063* e *s073-traF*; e por último, uma região intergênica do módulo de regulação, *traG-setC*.

4.1.1 Região Variável – RV1

A região entre os genes *attL* e *xis*, é a região variável localizada na extremidade 5' das sequências conhecidas de ICEs da família SXT/R391. A região entre *attL*-*xis* amplificada pelos iniciadores VisLF e VisLR3 resultam em um *amplicon* de 453 pb, no elemento SXT^{MO10}; de 2380 pb, no elemento R391 e de 2381 pb, no ICE *VchMex1*. Entre os iniciadores empregados o ICE *VchMex1* e o elemento R391 amplificam um tamanho quase idêntico, diferindo apenas em um nucleotídeo (uma base timina).

No nosso estudo, apenas 2 elementos (SXT24 e o SXT41) resultaram em um *amplicon* de tamanho aproximado à 453pb, compatível com o perfil de SXT^{MO10} (Figura 7). Vinte e três elementos (SXT2, SXT5, SXT7, SXT8, SXT17, SXT18, SXT19, SXT20, SXT25, SXT26, SXT27, SXT28, SXT29, SXT30, SXT31, SXT42, SXT43, SXT44, SXT45, SXT46, SXT47, SXT48 e SXT49), resultaram em um *amplicon* com o tamanho aproximado a 2380/2381 pb, perfil típico do elemento R391/ICE *VchMex1*. Este perfil está representado pelos elementos SXT2, SXT8 e SXT17, na Figura 8.

Três elementos SXT amplificaram tamanhos diferentes dos valores esperados. Os elementos SXT1, SXT3 e SXT4 amplificaram cerca de 600 pb (Figura 7).

Vinte e um elementos (SXT6, SXT9, SXT10, SXT11, SXT12, SXT13, SXT14, SXT15, SXT16, SXT21, SXT22, SXT23, SXT32, SXT33, SXT34, SXT35, SXT36, SXT37, SXT38, SXT39 e SXT40), não amplificaram a região pesquisada, por intermédio dos iniciadores utilizados, o que pode sugerir que exista maior variabilidade nessa região.

Figura 7: Eletroforese em gel de agarose 1 %, corado com brometo de etídio, apresentando *amplicons* da reação de PCR para a região intergênica attL-xis. As setas verdes indicam bandas com tamanho esperado; as setas vermelhas indicam bandas com tamanho atípico; os números são referentes aos elementos SXT; M, marcador de peso molecular GeneRuler™ 1kb plus DNA Ladder, Fermentas; C+, controle positivo para SXT^{MO10}; Br, controle negativo da reação.

Para confirmação da sequência de nucleotídeos e comparação com os membros da família SXT/R391, o *amplicon* obtido do elemento SXT31,

além da região completa entre os genes *attL* e *xis* de SXT4 foram sequenciados.

O sequenciamento completo da região *attL-xis* do elemento SXT4 demonstrou que a distância entre o gene *xis* (198 pb) e o sítio *attL* (126 pb), é de 656 pb. Essa sequência se mostrou idêntica em 98% com o SXT^{MO10} (AY055428) e ICE *VchMex1* (GQ463143.1); 97% com R391 (AY090559) e 96% com o ICE *VflInd1* (GQ463144.1), ICE *VchInd5* (GQ463142.1), ICE *PaBan1* (GQ463139.1) e ICE *VchBan9* (CP001485.1), sendo que, este último também possui o posicionamento da sequência do elemento invertido (3'→5').

Na Figura 8, estão representados os perfis da RV1 apresentados pelo SXT4, SXTMO10, ICE *VchMex1* e o elemento R391, onde podem ser comparados.

O iniciador “VisLF” amplificou a sequência, apesar de mostrar-se inespecífico para essa região, uma vez que parece ter havido uma deleção, se comparada a mesma região de SXT^{MO10}. Talvez a temperatura de 50°C para o anelamento tenha contribuído para essa amplificação inespecífica. O iniciador VisLR3 é representado pelo seta amarela na Figura 8. As possíveis sequências inespecíficas do iniciador VisLF são representadas por *p'* e *p''*. Embora a sequência representada por *p''* contenha mais *mismatches*, curiosamente é a que provavelmente possibilitou a amplificação, uma vez que a distância entre VisLR3 e *p''* é de 544 pb, enquanto a distância entre VisLR3 e *p'* é de 310 pb (Figura 8).

Figura 8: Representação esquemática da região variável 1, editada a partir da interface gráfica do programa UGENE (OKONECHNIKOV et al., 2012). As réguas mostram o posicionamento da região no elemento SXT correspondente. As ORFs são mostradas com o respectivo comprimento (em pares de bases). Os iniciadores VisLF (seta vermelha) e VisLR3 (seta amarela) estão posicionados acima de cada sequência. Na sequência da RV1 no SXT4, *p'* corresponde à sequência GAGTACAAATCGCCATATTTA e *p''* corresponde à sequência GAGAAGATCCGTTTCA.

Após o sequenciamento do *amplicon* obtido da cepa que alberga o SXT31, não foi possível obter um alinhamento consenso, devido à má qualidade dos resultados aliada ao limite da amplificação. O iniciador senso gerou um resultado de 108 bp (Figura 9A) e o iniciador anti-senso, resultou em 179 pb (Figura 9B), de maneira que somente a sequência maior proporcionou alinhamentos significativos através do BLAST, mostrando identidade igual ou maior que 96%, com ICEVchMex1 (GQ463143.1); ICEPmiJpn1 de *Proteus mirabilis* (AB525688.1) e elemento R391 de *Providencia rettgeri* (AY090559), todos representantes da família SXT/R391.

Apesar do problema com os resultados do sequenciamento, foi possível inferir o alinhamento e demonstrar que o SXT31 deve possuir 2381 pb devido à base Timina sequenciada na fita senso, posicionando a região attL-xis do elemento SXT31 como mais relacionada com o ICE *VchMex1* (Figura 9A).

A

SXT31	1	AAATTCATGACACAACTGGCTGTA	60
GQ463143	233	GAGTACAAATTCGGTTTTAGAGGTCTTTGGCGA.....	292
AB525688	398	C.....T.....	457
AY090559	152	C.....T.....	211
SXT31	61	GGCATTGTGGTTACTAGGTTTGGCGTAAAAAGTACTACCGTTAAAAAGAGTCTCTTTTTT	120
GQ463143	293	...C...C.....G.....A.....	352
AB525688	458	...C.....G.....A.....	516
AY090559	212	...C.....T.G.....A.....	270
SXT31	121	TGGTAAATGTTTCTTCTGTACCAA	145
GQ463143	353	G....	377
AB525688	517		541
AY090559	271		295

B

SXT31	2163	GCTGAATTCCTAGTAGCTAGAGCGTGCATATCGATAAAGATGGTTTAACTTAATGCGA	2220
GQ463143	2395		2452
AB525688	2559	A.....	2616
AY090559	2313	A.....	2370
SXT31	2221	TTTTACGGCGCTTTTCGCCGTAACTGGAAATTTGGTAACTGCACAATGATACCAATGG	2280
GQ463143	2453	GG..T	2512
AB525688	2617	GG..T	2676
AY090559	2371	GG..T	2430
SXT31	2281	CATGATAAGGCTGATCTTCTGAACAAATCATGCATCTTTCTGACCATCAACAAGTGATGA	2340
GQ463143	2513		2572
AB525688	2677	T.....	2736
AY090559	2431	T.....	2490
SXT31	2341	ATCAGGCGATGATAGCTTTACATTGATTTTCAGGAGAATGC	2381
GQ463143	2573	A.....	2613
AB525688	2737	A.....	2777
AY090559	2491	A.....	2531

Figura 9: Alinhamento ClustalW da região attL-xis de SXT31, comparada com a região attL-xis de *Vibrio cholerae* ICE *VchMex1* (GQ463143); *Proteus mirabilis* ICE *PmiJpn1* (AB525688.1); *Providencia rettgeri* R391 (AY090559). Alinhamento gerado pelo Blastn (NCBI), com os iniciadores mostrados em cinza. (A) Sequência gerada pelo iniciador VisLF (senso); o nucleotídeo T (Timina), que diferencia o ICE *VchMex1*, destacado em verde. (B) Sequência gerada pelo iniciador VisLR3 (anti-senso).

4.1.2 Gene da Integrase

A sequência que codifica o gene da integrase, do elemento SXT, possui 1242 pb (contando-se com o códon de parada, *stop codon*) e localiza-se na extremidade 5' do elemento SXT, adjacente à RV2, entre o gene da excisionase, *xis* e um gene que codifica uma proteína hipotética de 89 aminoácidos, denominada s002 em SXT^{MO10}.

O gene que codifica a integrase característica do elemento SXT foi identificado em todas as 49 cepas, pela amplificação dos iniciadores INT1 e INT2 que resultaram em um *amplicon* de 592pb dos 1242pb que compõem a totalidade do gene.

Para confirmação da sequência de nucleotídeos e comparação com os membros da família SXT/R391, os *amplicons* do SXT7 e SXT8, além do gene *int* completo de SXT4 foram sequenciados.

Na representação gráfica da análise filogenética apresentada na Figura 10, que foi inferida com as sequências parciais de SXT4, SXT7 e SXT8, podem ser observados três clados distintos. Os elementos SXT4 e SXT8 compartilham, embora de maneira distinta, o clado do qual fazem parte o SXT^{MO10} e o ICE *VchMex1*, enquanto o SXT7 demonstra relação mais próxima ao elemento R391 de *Providencia rettgeri*.

Figura 10: Representação gráfica da análise filogenética inferida com base nas sequências parciais do gene *int* de SXT4, SXT7 e SXT8 alinhadas contra sequências de *int* dos ICEs da família SXT/R391, resultantes de BLAST, obtida pelo método de Neighbor-Joining, segundo modelo de Kimura 2-parâmetros, com 1.000 replicações. Os números de acesso ao *GenBank* estão indicados junto à identificação do ICE. Os números que aparecem próximos aos nós, indicam os valores, em porcentagem, de bootstrap.

O sequenciamento do gene *int* obtido em SXT4, resultou em 1242pb, que após alinhamento através do BLAST, se mostrou idêntico (identidade da sequência igual ou maior que 97%) com o gene *int* de ICE *VfluBra1* de *Vibrio fluvialis* (JQ180502.1); ICEPdaSpa1 de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (AJ870983.1); elemento R997 de *Proteus mirabilis* (AJ634266.1); ICE *VchInd4* (GQ463141.1); SXT^{MO10} (AF099172.1); ICE *VflInd1* (GQ463144.1); ICE *VchInd5* (GQ463142.1); ICE *VchBan5* (GQ463140.1);

ICE*Pa*Ban1 de *Providencia alcalifaciens* (GQ463139.1); ICE*Vch*Ban9 de *Vibrio cholerae* MJ-1236 (CP001485.1); elemento pMERPH de *Shewanella putrefaciens* (AJ634267.1); ICE*Vch*Mex1 (GQ463143.1); ICE*Pmi*Jpn1 de *Proteus mirabilis* (AB525688.1) e elemento R391 de *Providencia rettgeri* (AY090559), todos representantes da família SXT/R391.

As sequências resultantes do BLAST foram alinhadas, juntamente com a sequência total do gene *int* de SXT4 para análise da sua relação filogenética com os demais membros da família SXT (Figura 11).

Figura 11: Representação gráfica da análise filogenética inferida com base na sequência total do gene *int* de SXT4 e sequências de *int* dos ICEs da família SXT/R391, obtida pelo método de Neighbor-Joining, segundo modelo de Kimura 2-parâmetros, com 1.000 replicações. Os números de acesso ao *GenBank* estão indicados junto à identificação do ICE. Os números que aparecem próximos aos nós, indicam os valores, em porcentagem, de bootstrap.

Na representação gráfica da análise filogenética apresentada na Figura 11, podem ser observados dois clados distintos, um deles formado por R391 e ICEs relacionados e outro mais diversificado, do qual fazem parte o SXT^{MO10} e o ICE *VchMex1* e no qual a integrase do SXT4 está mais relacionada, confirmando se tratar de uma integrase típica do elemento SXT.

4.1.3 Região Variável 2 – RV2

Na região entre os genes *s002* e *xis*, amplificada pelos iniciadores INT3 e INT4, o elemento R391 apresenta um comprimento de 1528 pb, diferindo em duas bases à mais que os elementos SXT^{MO10} e ICE *VchMex1*, sendo portanto, uma região pouco discriminatória, sem a utilização do sequenciamento de cada um dos *amplicons*, ferramenta que poderia detectar essa diferença tão pequena.

No nosso estudo, a amplificação da região *s002-xis*, através dos iniciadores propostos inicialmente, foi positiva em 16 elementos SXT (SXT2, SXT5, SXT6, SXT7, SXT8, SXT17, SXT18, SXT19, SXT20, SXT24, SXT26, SXT29, SXT30, SXT31, SXT41 e SXT45), que apresentaram cerca de 1500 pb, tamanho compatível com a região pesquisada.

Onze elementos SXT apresentaram um tamanho de banda atípico, com cerca de 4000pb (SXT13) e 2000 pb, (SXT9, SXT10, SXT11, SXT12,

SXT14, SXT15, SXT16, SXT21, SXT22 e SXT23), utilizando os mesmos iniciadores.

Em 22, dos elementos pesquisados, não ocorreu a amplificação dessa região, através do par de iniciadores INT3 e INT4, inicialmente propostos (SXT1, SXT3, SXT4, SXT25, SXT27, SXT28, SXT32, SXT33, SXT34, SXT35, SXT36, SXT37, SXT38, SXT39, SXT40, SXT42, SXT43, SXT44, SXT46, SXT47, SXT48 e SXT49).

Por tratar-se de uma região que contém a integrase, a qual já tinha sido amplificada parcialmente, além de ser considerada uma região variável, foi desenvolvido um iniciador (s2Int-F) para a amplificação da região s002-xis, nos elementos que se mostraram negativos. O iniciador s2Int-F, utilizado com o INT4 resulta em um *amplicon* de 1532pb.

Após submeter os 22 elementos, nos quais não ocorreu a amplificação da região s002-xis, à nova PCR, utilizando o par de iniciadores s2Int-F e INT4, 10 elementos foram positivos (SXT1, SXT3, SXT4, SXT42, SXT43, SXT44, SXT46, SXT47, SXT48 e SXT49), apresentando um *amplicon* do tamanho esperado (1532 pb). Também foram positivos 7 elementos SXT (SXT32, SXT33, SXT34, SXT35, SXT37, SXT39 e SXT40), porém apresentando um tamanho de banda atípico, com cerca de 2000 pb. No entanto, 5 elementos SXT permaneceram negativos para a amplificação desta região (SXT25, SXT27, SXT28, SXT36 e SXT38) e deverão ser submetidos a outros ensaios.

Foram também submetidos à nova amplificação por intermédio dos iniciadores s2Int-F e INT4, os 27 elementos positivos (típicos e atípicos) pela amplificação do par de iniciadores INT3 e INT4. Dentre os 16 elementos SXT, com tamanho típico, 10 foram positivos (SXT2, SXT5, SXT6, SXT7, SXT17, SXT24, SXT26, SXT29, SXT31 e SXT45), e 6 mostraram resultado falso negativo (SXT8, SXT18, SXT19, SXT20, SXT30 e SXT41). Dentre os 11 elementos atípicos, todos confirmaram o mesmo resultado.

A amplificação da região s002-xis através do par de iniciadores INT3 e INT4 gerou 17 (35 %) de resultados falso negativos, enquanto que a substituição do iniciador INT3, pelo s2Int-F, desenhado para este estudo, embora não tenha eliminado o problema, reduziu este resultado para 12 %.

Para confirmação da sequência de nucleotídeos e comparação com os membros da família SXT/R391, os *amplicons* resultantes da amplificação da região s002-xis, dos elementos SXT4, SXT7 e SXT13 foram sequenciados.

Através do sequenciamento completo da região s002-xis do elemento SXT 4 foi possível obter uma sequência consenso, apresentando um comprimento de 1532 pb. A análise através do BLAST, considerando apenas alinhamentos com *e-value* zero, mostrou 98 % de identidade (100 % de cobertura) com ICEPdaSpa1 (AJ870986.2) e ICEVchInd4 (GQ463141.1); 97 % de identidade (100 % de cobertura) com SXT^{MO10} (AY055428.1), ICESpuPO1 (CP000503.1) e ICEVchMex1 (GQ463143.1); 96 % de

identidade (100 % de cobertura) ICE*PmiJpn1* (AB525688.1) e elemento R391 (AY090559.1).

Através do sequenciamento parcial da região s002-xis do elemento SXT7 foi possível obter uma sequência consenso, apresentando um comprimento de 1439 pb. A análise desta sequência, através do BLAST, considerando apenas *e-value* zero, mostrou 99% de identidade, em 99% de cobertura, com o elemento R391 (AY090559); 96% de identidade (98% de cobertura), com ICE*VchMex1* (GQ463143.1); 96% de identidade (99% de cobertura), com ICE*VchInd4* (GQ463141.1) e ICE*SpuPO1* (CP000503.1); 96% de identidade (97% de cobertura), com ICE*VflInd1* (GQ463144.1), ICE*VchInd5* (GQ463142.1), ICE*VchBan5* (GQ463140.1), ICE*PaBan1* (GQ463139.1), ICE*VchBan9* (CP001485.1).

Após o sequenciamento da região s002-xis do elemento SXT13, não foi possível obter uma sequência consenso, devido à má qualidade dos resultados aliada ao limite da amplificação. O iniciador senso gerou um resultado de 890 bp (Figura 12A) e o iniciador anti-senso, resultou em 886 pb (Figura 12B).

A análise sequência de 890 pb, através do BLAST, considerando apenas *e-value* zero, mostrou 99% de identidade, em 99% de cobertura, com ICE*PmiJpn1* de *Proteus mirabilis* (AB525688.1), elemento R391 de *Providencia rettgeri* (AY090559); mostrou 96% de identidade, em 98% de cobertura, com ICE*VchMex1* (GQ463143.1); 96% de identidade (em 99% de cobertura), com ICE*VchInd4* (GQ463141.1), ICE*PdaSpa1* (AJ870986),

ICESpuPO1 (CP000503.1), SXT^{MO10} (AY055428); 96% de identidade (em 97% de cobertura), com ICEVflInd1 (GQ463144.1), ICEVchInd5 (GQ463142.1), ICEVchBan5 (GQ463140.1), ICEPaBan1 (GQ463139.1) e ICEVchBan9 (CP001485.1).

Figura 12: Representação esquemática da sequência de 886 pb, amplificada pelo iniciador anti-senso, no elemento SXT13, editada a partir da interface gráfica do programa UGENE (OKONECHNIKOV et al., 2012). (A) As réguas mostram o posicionamento teórico da região s002-xis, tendo como modelo o elemento R391. As sequências parciais são mostradas com o respectivo comprimento (em pares de bases). Os iniciadores INT4 e s02Int-F estão representados por setas vermelha e azul, respectivamente. Os genes estão representados por setas, indicando o sentido de leitura. (B) Sequência dos iniciadores, inseridos na sequência. (orientação 5' → 3')

A análise da sequência de 886 pb, através do BLAST, não resultou valores satisfatórios considerando *e-value*, devido à baixa cobertura, que não ultrapassou 38 %. Porém mostrou identidade mínima de 96 % (38% de

cobertura) com ICE *SpuPO1* (CP000503.1), 95 % (38% de cobertura) com ICE *PmiJpn1* (AB525688.1), ICE *VchMex1* (GQ463143.1), elemento R391 (AY090559), ICE *VflInd1* (GQ463144.1), ICE *VchInd5* (GQ463142.1), ICE *VchInd4* (GQ463141.1), ICE *VchBan5* (GQ463140.1), ICE *PalBan1* (GQ463139.1), ICE *VchBan9* (CP001485.1) e ICE *PdaSpa1* (AJ870986); 95 % (37% de cobertura) com SXT^{MO10} (AY055428).

O alinhamento das sequências parciais com os hits encontrados através do BLAST, mostra uma região de 540 pb (Figura 12A), inserida entre *xis* e *int*, a qual não possui similaridade significativa com as sequências depositadas no GenBank.

4.1.4 Região Variável 3 – Rv3

4.1.4.1 Operon *rumB-rumA*

A região entre os genes *rumB* e *rumA*, é a RV3 que normalmente abriga genes de resistência, por essa razão, pode ser extensa como no elemento SXT^{MO10}, ou concisa como no elemento R391 e no ICE *VchMex1*, que possuem, ambos, 1305 pb. A região *rumBA* amplificada pelos iniciadores LeftF3 e RumA, resultam teoricamente em um *amplicon* de 19.182 pb, no elemento SXT^{MO10}; e de 911 pb, no elemento R391 e no ICE *VchMex1*.

Dos 49 elementos SXT estudados, 11 não amplificaram a região pesquisada, por intermédio dos iniciadores utilizados. Nos 38 elementos SXT restantes, a amplificação resultou um tamanho aproximado de 911 pb perfil compatível com o elemento R391 e o ICE *VchMex1*.

Este resultado pode indicar que os 11 elementos SXT (SXT1, SXT3, SXT4, SXT5, SXT18, SXT19, SXT20, SXT46, SXT47, SXT48 e SXT49), que não tiveram a região amplificada, possuam o gene *rumB* truncado, ou seja, contendo genes, inclusive genes de resistência, inseridos entre *rumB'* e *'rumB*. Por outro lado os 38 elementos que tiveram amplificação positiva, possuem o gene *rumB* inteiro, ou seja, não possui genes inseridos dentro dele.

Para confirmação da sequência de nucleotídeos e comparação com os membros da família SXT/R391, os *amplicons* do SXT8, SXT10 e SXT21, além do gene *rumB* completo de SXT4, foram sequenciados e a sequência consenso foi submetida ao BLAST.

Através do sequenciamento total da região entre os genes *rumB* e *rumA* do elemento SXT4 foi possível obter uma sequência consenso, apresentando um comprimento de 1305 nucleotídeos. A análise desta sequência, através do BLAST, considerando apenas *e-value* zero, mostrou 96 % de identidade (100 % de cobertura), com ICE *VchMex1* (GQ463141.1), ICE *SpuPO1* (CP000503), ICE *PmiJpn1* (AB525688.1), R391 (AY090559), ICE *VflInd1* (GQ463144.1), ICE *VchInd5* (GQ463142.1), ICE *VchBan5* (GQ463140.1), ICE *PaBan1* (GQ463139), ICE *VchBan9* (CP001485.1),

ICE*PdaSpa1* (AJ870986), SXT^{MO10} (AY055428) e ICE*VchInd4* (GQ463141.1).

Ao contrário do que se havia pensado, região entre os genes *rumB* e *rumA* do elemento SXT4 mostrou-se íntegra, e similar à mesma região no ICE*VchMex1* e no elemento R391 (Figura 13). Provavelmente a amplificação não ocorreu por causa de iniciadores inadequados.

Figura 13: Representação esquemática do gene *rumB*. As setas indicam a orientação da transcrição. Os números dentro das setas representam a posição do gene nas respectivas sequências; os números entre parênteses indicam o tamanho do fragmento. Os números entre parênteses, fora das setas, indicam o intervalo entre os fragmentos *rumB'* e *'rumB*. Os números na coluna à direita indicam o tamanho total do gene *rumB*. Na coluna à esquerda estão os elementos SXT: SXT4; ICE*VchMex1* (GQ463143); ICE*PmiJpn1* (AB525688.1); elemento R391 (AY090559); ICE*VchInd4* (GQ463141); SXT^{MO10} (AY055428); ICE*PdaSpa1* (AJ870986); ICE*VchBan9* (CP001485); ICE*Pa/Ban1* (GQ463139); ICE*VchBan5* (GQ463140); ICE*VchInd5* (GQ463142); ICE*VflInd1* (GQ463144).

Através do sequenciamento parcial da região entre os genes *rumB* e *rumA* do elemento SXT8 foi possível obter uma sequência consenso, apresentando um comprimento de 902 nucleotídeos. A análise desta sequência, através do BLAST, considerando apenas *e-value* zero, mostrou 97 % de identidade (95 % de cobertura), com ICE *Vch*Ind5 (GQ463142.1), ICE *Vch*Ind4 (GQ463141.1), ICE *Vch*Ban5 (GQ463140.1), ICE *Vch*Ban9 (CP001485.1), SXT^{MO10} (AY055428); 95 % de identidade (100 % de cobertura), com a CDS (sequência codificadora) parcial do gene *rumB* e *rum* do ICE *Vch*Mex1 (DQ180350.1); 96 % de identidade (95 % de cobertura), com ICE *Vfl*Ind1 (GQ463144.1), ICE *Pda*Spa1 (AJ870986) e 96 % de identidade (97 % de cobertura), com ICE *Pmi*Jpn1 (AB525688.1) e R391 (AY090559).

Através do sequenciamento parcial da região entre os genes *rumB* e *rumA* do elemento SXT10 foi possível obter uma sequência consenso, apresentando um comprimento de 869 nucleotídeos. A análise desta sequência, através do BLAST, considerando apenas *e-value* zero, mostrou 98 % de identidade (96 % de cobertura), com ICE *Vch*Ind5 (GQ463142.1), ICE *Vch*Ind4 (GQ463141.1), ICE *Vch*Ban5 (GQ463140.1), ICE *Vch*Ban9 (CP001485.1), SXT^{MO10} (AY055428); 96 % de identidade (99 % de cobertura), com ICE *Pmi*Jpn1 (AB525688.1) e R391 (AY090559), com a CDS (sequência codificadora) parcial do gene *rumB* e *rum* do ICE *Vch*Mex1 (DQ180350.1); 97 % de identidade (99 % de cobertura), com ICE *Pda*Spa1 (AJ870986); 97 % de identidade (96 % de cobertura), com ICE *Vfl*Ind1

(GQ463144.1) e 95 % de identidade (99 % de cobertura), com ICE *VchBan8* (JQ345361.1).

Através do sequenciamento parcial da região entre os genes *rumB* e *rumA* do elemento SXT21 foi possível obter uma sequência consenso, apresentando também um comprimento de 869 nucleotídeos. A análise desta sequência, através do BLAST, considerando apenas *e-value* zero, mostrou 98 % de identidade (98 % de cobertura), com ICE *VchInd5* (GQ463142.1), ICE *VchInd4* (GQ463141.1), ICE *VchBan5* (GQ463140.1), ICE *VchBan9* (CP001485.1), SXT^{MO10} (AY055428); 97 % de identidade (98 % de cobertura), com ICE *PdaSpa1* (AJ870986) e ICE *VflInd1* (GQ463144.1); 96 % de identidade (100 % de cobertura), com a CDS (sequência codificadora) parcial do gene *rumB* e *rum* do ICE *VchMex1* (DQ180350.1), ICE *PmiJpn1* (AB525688.1), R391 (AY090559) e ICE *SpuPO1* (CP000503).

4.1.4.2 Genes de resistência a antibióticos

Os 49 isolados positivos para o elemento SXT foram investigados para a presença dos genes *sulII*, *strA*, *strB*, *floR*, *dfrA1* e *dfrA18*, que conferem resistência ao sulfametoxazol, estreptomicina A e B, cloranfenicol e trimetoprim, respectivamente.

Destes, 28 (57 %) possuem o gene *dfrA1*, 26 (53 %) possuem o gene *sulII*, 17 (35 %) possuem o gene *dfrA18*, 6 (12 %) possuem o gene *strA*, 4 (8 %) possuem o gene *strB* e 3 (6 %) possuem o gene *floR*.

Além disso, 2 isolados (albergando o SXT 13 e o SXT 24) foram positivos para os 6 genes pesquisados (*sulll*, *strA*, *strB*, *dfrA1*, *dfrA18* e *floR*); 2 isolados (albergando o SXT 14 e o SXT 21) foram positivos para os 5 genes pesquisados (*sulll*, *strA*, *dfrA1*, *dfrA18* e *floR* e *sulll*, *strA*, *strB*, *dfrA1* e *dfrA18*, respectivamente), dois isolados foram positivos para 3 genes, nove isolados foram positivos para 2 genes e quatorze isolados foram positivos para 1 o gene *dfrA1* (quadro 8).

Nos elementos positivos para os genes de resistência pesquisados, nos quais o elemento SXT não mostrou amplificação para o operon *rumBA*, como os elementos SXT2 e SXT5 (positivos para *sull*), os elementos SXT 29 e SXT20 (positivos para *dfrA18*), os elementos 48 e 49 (positivos para *dfrA1*), e principalmente os elementos SXT21 e SXT47 (positivos para *sulll*, *strA*, *strB*, *dfrA1* e *dfrA18*, e positivo para *sulll*, *strA*, *strB* e *dfrA1*, respectivamente) é provável que o gene *rumB* esteja truncado pelo *cluster* de resistência que formam o operon *rumBA*.

O SXT4 mostrou, através do sequenciamento, que está íntegro, por essa razão acreditamos que provavelmente o gene *sull* deve estar posicionado no cromossomo, fora do elemento transponível. Alguns elementos SXT são caracterizados pela perda do *cluster* de resistência inserido no operon *rumB-rumA* e a presença do gene *dfr1* no hotspot 3 (região intergênica *s073-traF*), como por exemplo, o ICE *Vchlnd1*, (HOCHHUT *et al.*, 2001b).

Somente o sequenciamento completo do elemento SXT ou do genoma da cepa, pode esclarecer estas questões.

Aparentemente, 10 (20 %) isolados (albergando os elementos SXT6, SXT25T, SXT26, SXT27, SXT28, SXT29, SXT31, SXT42, SXT45 e SXT46), não possuem o cassete de resistência típico do elemento SXT, ou pelo menos não abrigam os genes de resistência característicos dessa região, pesquisados no estudo.

Quadro 8: Características de resistência do elemento SXT, segundo número e tipo de gene de resistência a antibióticos.

Nº de cepas	Nº do SXT*	Genótipo de resistência
10	32, 33,34, 35, 37, 39, 43, 44, 48 e 49	<i>dfrA1</i>
9	8, 9, 10, 11, 12, 15,16, 22 e 23	<i>sulIII</i> , <i>dfrA1</i> , <i>dfrA18</i>
7	2, 3, 4, 5, 7, 30 e 41	<i>SulIII</i>
3	1, 36 e 40	<i>sulIII</i> , <i>dfrA1</i>
2	13 e 24	<i>sulIII</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>dfrA1</i> , <i>dfrA18</i> , <i>floR</i>
2	19 e 20	<i>dfrA18</i>
1	14	<i>sulIII</i> , <i>strA</i> , <i>dfrA1</i> , <i>dfrA18</i> , <i>floR</i>
1	21	<i>sulIII</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>dfrA1</i> , <i>dfrA18</i>
1	47	<i>sulIII</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>dfrA1</i>
1	18	<i>sulIII</i> , <i>dfrA18</i>
1	17	<i>dfrA1</i> , <i>dfrA18</i>
1	38	<i>sulIII</i> , <i>strA</i>

Legenda: *Nº do SXT correspondente ao isolado estudado. *sulIII*, gene de resistência ao sulfametoxazol; *strA*, gene de resistência a estreptomicina A; *strB*, gene de resistência a estreptomicina B; *floR*, gene de resistência ao cloranfenicol; *dfrA1* e *dfrA18*, genes de resistência ao trimetoprim.

4.1.3 Hotspot 5

Região intergênica s026-s027

A região entre os genes *s026* e *s027*, é uma região de aquisição de genes, conhecida como “hotspot” 5 (HS5). A região *s026-s027* amplificada pelos iniciadores SO26F e SO27R resultam em um *amplicon* de 408 pb, no elemento SXT^{MO10}; e de 4189 pb, no elemento R391. No ICE *VchMex1* esta região não foi detectada.

Dos 49 elementos SXT estudados, 13 amplificaram a região *s026-s027*, com um tamanho aproximado de 408 pb, perfil típico do elemento SXT^{MO10} (SXT13, SXT14, SXT17, SXT21, SXT36, SXT42, SXT43, SXT44, SXT45, SXT46, SXT47, SXT48 e SXT49). Nos 36 elementos SXT restantes, não houve amplificação, por intermédio dos iniciadores utilizados. Podendo significar que os iniciadores foram inadequados para amplificar essas sequências ou ainda sinalizar maior similaridade com o ICE *VchMex1*, uma vez que este elemento não apresenta esses genes.

Para confirmação da sequência de nucleotídeos e comparação com os membros da família SXT/R391, o *amplicon* do SXT13, SXT14, SXT17 e SXT21 foram sequenciados e a sequência consenso total com 408 nucleotídeos foi submetida ao BLAST.

As sequências consenso de SXT13 e SXT14 mostraram-se exatamente idênticas. A análise destas sequências, através do BLAST, considerando apenas *e-value* zero, mostrou 99% de identidade, em 100 %

de cobertura, com ICE*PmiJpn1* (AB525688.1), ICE*Vchlnd4* (GQ463141.1), ICE*VchBan9* (CP001485.1), plasmídeo pEFER de *Escherichia fergusonii* (ATCC 35469) e ICE*PdaSpa1* (AJ870986); também mostrou 98 % de identidade, em 100 % de cobertura, com SXT^{MO10} (AY055428); e *e-value* de 4e-125, 98 % de identidade (em 100 % de cobertura), com o elemento R391 de *Providencia rettgeri* (AY090559).

O alinhamento da região s026-s027 de SXT13 através do ClustalW, comparada à região homóloga em *Proteus mirabilis* ICE*PmiJpn1* (AB525688.1); ICE*Vchind4* (GQ463141.1); ICE*VchBan9* (CP001485.1); plasmídeo de *Escherichia fergusonii*, pEFER (CU928144.1); ICE*PdaSpa1* de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, (AJ870986.2), no SXT^{MO10} (AY055428.1) e no elemento R391 (AY090559.1) é apresentada na figura 14.

A análise da sequência do SXT17, através do BLAST, considerando apenas *e-value* zero, mostrou 99% de identidade, em 100 % de cobertura, com ICE*PmiJpn1* (AB525688.1), ICE*PdaSpa1* (AJ870986.2), ICE*Vchlnd4* (GQ463141.1), ICE*VchBan9* (CP001485.1), plasmídeo pEFER de *Escherichia fergusonii* (ATCC 35469); 98 % de identidade (100 % de cobertura) com SXT^{MO10} (AY055428); e *e-value* de 4e-130, 98 % de identidade (100 % de cobertura), com o elemento (AY090559).

SXT13	1	GAGCAATGGGCGAGAGTTCC ATTTAGCACTTAAAAATCCAGAAGCACTATACGGCGTTGA	60
ICEPmiJpn1	25267		25326
ICEVchInd4	22894		22953
ICEVchBan9	3036446		3036387
pEFER	13712		13771
ICEPdaSpa1	19860		19919
SXT MO10	27071		27130
R391	10713		10772
SXT13	61	CAATGCTGCACTCGCTCCTGGATATAGCGAATCGTGAGATGAATTTATGAATATAAAAGA	120
ICEPmiJpn1	25327		25386
ICEVchInd4	22954	G.....	23013
ICEVchBan9	3036386		3036327
pEFER	13772		13831
ICEPdaSpa1	19920		19979
SXT MO10	27131	G.....	27190
R391	10773		10832
SXT13	121	ATATTTAGGCGATCTTATC-GGAGGCAGTTTATTGATAACTGAATCTAGAATAATCGCAG	179
ICEPmiJpn1	25387	-...A.....	25445
ICEVchInd4	23014	-...A.....	23072
ICEVchBan9	3036326	-...A.....	3036268
pEFER	13832	-...A.....	13890
ICEPdaSpa1	19980	-...A.....	20038
SXT MO10	27191	G.....	27250
R391	10833	-...A.....	10866
R391	14640		14672
SXT13	180	AATC-GCTATTGAAAAAACTTCCAGAAGATGAGTGGAGTCGCTGATCGTTGAGCAAAAT	238
ICEPmiJpn1	25446	-...C.....	25504
ICEVchInd4	23073	-...C.....	23131
ICEVchBan9	3036267	-A...C.....	3036209
pEFER	13891	-...C.....	13949
ICEPdaSpa1	20039	-...C.....	20097
SXT MO10	27251	G...C.....	27310
R391	14673	-...C.....	14731
SXT13	239	GTTCCTCAGAAAAATCCGGTCAGACGGCTATTTCGTTATGCCAGAACAAATCCGTTGGCGT	298
ICEPmiJpn1	25505		25564
ICEVchInd4	23132		23191
ICEVchBan9	3036208		3036149
pEFER	13950		14009
ICEPdaSpa1	20098		20157
SXT MO10	27311		27370
R391	14732		14791
SXT13	299	ATTGAAGGTCTGGGTGATGAGTTTATGACTGATCTTTAGTCGCGAGTGAACGCGCCTAT	358
ICEPmiJpn1	25565	C.....C.....T.....	25624
ICEVchInd4	23192	C.....C.....	23251
ICEVchBan9	3036148	C.....C.....T.....	3036089
pEFER	14010	C.....C.....T.....	14069
ICEPdaSpa1	20158	C.....C.....T.....	20217
SXT MO10	27371	C.....C.....	27430
R391	14792	C.....AC.....T.....	14851
SXT13	359	GTCCAAATGCTGATGATGTCATTACTCATT CATTCTCCGGTTGTCGCTGA	408
ICEPmiJpn1	25625		25674
ICEVchInd4	23252		23301
ICEVchBan9	3036088		3036039
pEFER	14070	A.....	14119
ICEPdaSpa1	20218		20267
SXT MO10	27431		27480
R391	14852		14901

Figura 14: Alinhamento ClustalW da região s026-s027 de SXT13, comparada às regiões homólogas encontradas no GenBank. Alinhamento gerado pelo Blastn (NCBI), com os iniciadores s026F (senso) e s027R (anti-senso) mostrados em cinza e ponto de inserção destacado em verde. Os números que aparecem flanqueando as sequências se referem ao seu posicionamento no genoma.

A análise da sequência do SXT21, através do BLAST, considerando apenas *e-value* zero, mostrou 100 % de identidade, em 100 % de cobertura, com o ICE *Vch*Ban9 (CP001485.1); 99 % de identidade, em 100 % de cobertura, com ICE *Vch*Ind4 (GQ463141.1), ICE *Pda*Spa1 (AJ870986), SXT^{MO10} (AY055428) e plasmídeo pEFER de *Escherichia fergusonii* (ATCC 35469). Ainda apresentou, 98 % de identidade (100 % de cobertura, *e-value* de 1e-126), com o elemento (AY090559).

4.1.4 Hotspot 1

Região intergênica s043-traL

A região entre os genes *s043* e *traL*, é outra região de aquisição de genes, conhecida como “hotspot” 1 (HS1). A região *s043-traL* amplificada pelos iniciadores HS1F e HS1R resultam em um *amplicon* de 998 pb, no elemento SXT^{MO10}, 1627 pb no ICE *Vch*Mex1 e 1096 pb no elemento R391.

Dos 49 elementos SXT estudados, 41 foram positivos para amplificação da região *s043-traL*. Dos elementos positivos, 1 amplificou a região *s043* e *traL*, com um tamanho aproximado de 998 pb, perfil típico do elemento SXT^{MO10} (SXT8), 4 amplificaram com um tamanho de 1627 pb, compatível com ICE *Vch*Mex1 (SXT2, SXT18, SXT19 e SXT20), 31 amplificaram com um tamanho de 1096 pb, compatível com o elemento R391 (SXT9, SXT10, SXT11, SXT12, SXT13, SXT14, SXT15, SXT16, SXT17, SXT21, SXT22, SXT23, SXT24, SXT32, SXT33, SXT34, SXT35,

SXT36, SXT37, SXT38, SXT39, SXT40, SXT41, SXT42, SXT43, SXT44, SXT45, SXT46, SXT47, SXT48 e SXT49).

Um elemento SXT apresentou um tamanho de banda atípico, com cerca de 2000 pb (SXT7) e 4 elementos SXT apresentaram uma banda com tamanho aproximado de 1300pb (SXT1, SXT3, SXT4 e SXT26), valor entre os 1627pb do ICE *VchMex1* e 1096 pb do elemento R391.

Nos 8 elementos SXT restantes (SXT5, SXT6, SXT25, SXT27, SXT28, SXT29, SXT30 e SXT31), não houve amplificação, por intermédio dos iniciadores utilizados. Podendo significar que os iniciadores foram inadequados para amplificar essas sequências ou que a região apresenta mutação.

A diversidade de perfis apresentados pela região entre os genes *s043* e *traL*, pode ser verificada através da figura 15.

Figura 15: Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, mostrando produto amplificado da reação de PCR para a região intergênica *s043-traL*. Os elementos SXT 1, 3 e 4, mostrando banda atípica entre 1018 e 1636pb; o elemento SXT7, mostrou banda atípica de ≈ 2000 pb; os elementos SXT 2, 18 e 19, mostraram banda típica do ICE *VchMex1*; os elementos SXT 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16 e 17 apresentam banda típica do elemento R391; o elemento SXT 8 apresenta banda com tamanho típico do SXT^{MO10}; os elementos SXT 5 e 6, foram negativos para a reação. Setas verdes, bandas de tamanho típico; setas vermelhas, bandas de tamanho atípico; os números indicam os respectivos elementos; M, marcador de peso molecular 1kb DNA Ladder (Life Technologies);

Para confirmação da sequência de nucleotídeos e comparação com os membros da família SXT/R391, os amplicons do SXT8 e SXT13, foram sequenciados e a sequência consenso foi submetida ao BLAST.

A sequência consenso do SXT8, que resultou em 1533 aminoácidos, mostrou 99% de identidade (100% de cobertura; *e-value* zero), com a CDS (sequência codificadora) parcial da proteína hipotética (gene *s043*), CDS completa da proteína hipotética (gene *mex01*) e com a CDS parcial da proteína TraL do ICE *VchMex1* (DQ180351.1). Embora o perfil de banda apresentado pelo elemento SXT8 (Figura 15), mostre um valor aproximado aos 998 pb, do elemento SXT^{MO10}, após o sequenciamento esse perfil não foi confirmado.

A sequência consenso do SXT13, que resultou em 1015 aminoácidos, mostrou 97% de identidade (99% de cobertura; *e-value* zero), com a CDS completa de genes de *Vibrio cholerae* (AB185252.1) para proteínas hipotéticas similares as ORFs 37 (AY090559.1_cdsid_AAM08045.1) e 38 (AY090559.1_cdsid_AAM08075.1) do elemento R391 de *Providencia rettgeri* (AY090559), confirmando que o perfil mostrado pelo tamanho da banda é realmente similar ao do elemento R391.

4.1.5 Hotspot 2

Região intergênica traA-s054

A região entre os genes *traA* e *s054*, é a região de aquisição de genes, conhecida como “hotspot” 2 (HS2). A região traA-s054 amplificada pelos iniciadores HotS2F e HotS2R resultam em um *amplicon* de 2069 pb, no elemento SXT^{MO10}, 1354 pb no ICE *VchMex1* e 7021 pb no elemento R391.

Dos 49 elementos SXT estudados, 13 tiveram a região traA-s054, amplificada com um tamanho aproximado de 2069 pb, perfil típico do elemento SXT^{MO10} (SXT13, SXT21, SXT24, SXT29, SXT31, SXT41, SXT42, SXT43, SXT44, SXT45, SXT46, SXT48 e SXT49). A região traA-s054 foi amplificada em 8 elementos (SXT2, SXT7, SXT8, SXT17, SXT18, SXT19, SXT20 e SXT26), com um tamanho de 1354 pb, compatível com ICE *VchMex1* e em 3 elementos (SXT1, SXT3 e SXT4), com um tamanho de 7021 pb, compatível com o elemento R391 (Figura 16).

Os elementos SXT5 e SXT6, apresentaram um tamanho de banda atípico, com 1000 pb, como pode ser observado na Figura 16. Também apresentaram um tamanho de bandas atípico, com aproximadamente 3000pb, os elementos SXT25, SXT28, SXT32, SXT33 e SXT34.

Nos 18 elementos SXT restantes (SXT9, SXT10, SXT11, SXT12, SXT14, SXT15, SXT16, SXT22, SXT23, SXT27, SXT30, SXT35, SXT36, SXT37, SXT38, SXT39, SXT40 e SXT47), não houve amplificação, por

intermédio dos iniciadores utilizados. Podendo significar que os iniciadores foram inaptos para amplificar essas sequências ou que a região apresenta mutação.

Figura 16: Eletroforese em gel de agarose 1,2%, corado com brometo de etídio, apresentando *amplicons* da reação de PCR para a região intergênica traA-s054. As setas verdes indicam bandas com tamanho esperado; as setas vermelhas indicam bandas com tamanho atípico, as setas pretas indicam bandas inespecíficas; os números são referentes aos elementos SXT; M, marcador de peso molecular GeneRuler™ 1kb DNA Ladder; C+, controle positivo para SXT^{MO10}; Br, controle negativo da reação.

Para confirmação da sequência de nucleotídeos e comparação com os membros da família SXT/R391, os amplicons dos elementos SXT4, SXT7 e SXT17, foram sequenciados e a sequência consenso foi submetida ao BLAST para análise filogenética.

O sequenciamento completo da região entre os genes *traA* e *s054* de SXT4, apresentou um comprimento de 7296 nucleotídeos (excluído o códon de parada), que abrigam 4 ORFs, todas anti-senso, como ilustra a figura 17.

Figura 17: Esquema linear mostrando os quadros abertos de leitura (*open reading frames* – ORF), da sequência de 7296 pb encontrada no SXT4. Esquema baseado na resposta da interface gráfica do programa UGENE (OKONECHNIKOV et al., 2012). Destaque para as 4 ORFs.

A primeira ORF possui 909 aminoácidos (aa), semelhante à proteína hipotética de *Vibrio cholerae* MJ-1236 (WP001901413.1) (ICE *Vch*Ban9), proteína hipotética de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (CCD10428.1), uma helicase putativa de *Vibrio nigripulchritudo* (CCN43187.1) e uma proteína transportadora de metal pesado (CzcA) em uma cepa de *Pseudoalteromonas* (NJ631)

A quarta ORF apresentou um suposto domínio conservado, AAA (*e-value* 1,31e-36), que integra a superfamília AAA, da qual fazem parte muitas das proteínas de transferência conjugativa. Também apresentou semelhança a COG1112, da superfamília I de DNA e RNA helicases e subunidades de helicase, ligadas à replicação, recombinação e reparação do DNA (não é atribuído a qualquer superfamília domínio).

Através do sequenciamento parcial da região entre *traA* e *s054* do elemento SXT7 foi possível obter uma sequência consenso, apresentando um comprimento de 1283 nucleotídeos. A análise desta sequência, através do BLAST, resultou exclusivamente no alinhamento com o ICE *VchMex1* (DQ180351.1); CDS parcial da proteína hipotética (gene *s043*); CDS completo da proteína hipotética (gene *mex01*); e CDS parcial da proteína like-TraL (gene *traL*), com 99% de identidade (*e-value* zero, 100% de cobertura).

A sequência consenso do SXT17, apresentando um comprimento de 1271 nucleotídeos, foi analisada e resultou, considerando apenas os *e-value* zero, em 99 % de identidade (99 % de cobertura), com ICE *VspPor2* de *Vibrio splendidus* (HE577629.1), e em 98 % de identidade (99 % de cobertura), com ICE *VaIPor1* de *Vibrio alginolyticus* (HE577623.1) e ICE *VchBan8* (JQ345361.1). Sendo que os dois primeiros ICEs não possuem sequência completa depositada.

4.1.6 Hotspot 4

Região intergênica traN-s063

A região entre os genes *traN* e *s063*, é uma região de aquisição de genes, conhecida como “hotspot” 4 (HS4). A região *traN-s063* amplificada pelos iniciadores HS4-F e HS4-R resultam em um *amplicon* de 5567 pb, no elemento SXT^{MO10} e 3047 pb no elemento R391. No elemento ICE *VchMex1*

esta região possui 9307 pb, porém os iniciadores utilizados não resultam amplificação.

Dos 49 elementos SXT estudados, 29 amplificaram a região traN-s063, sendo que os elementos SXT1, SXT3, SXT4, SXT5, SXT13, SXT25, SXT26, SXT28 e SXT44, resultaram em um *amplicon* com cerca de 3700 pb, próximo ao perfil apresentado pelo elemento R391.

Os elementos SXT9, SXT10, SXT11, SXT14, SXT15, SXT16, SXT21, SXT22, SXT23, SXT24, SXT29, SXT31, SXT32, SXT33, SXT34, SXT35, SXT37, SXT40, SXT42 e SXT45 resultaram em um *amplicon* com cerca de 6000pb, tamanho aproximado ao perfil típico do elemento SXT^{MO10} (Figura 18).

Nos 20 elementos SXT restantes, não houve amplificação, por intermédio dos iniciadores utilizados (SXT2, SXT6, SXT7, SXT8, SXT12, SXT17, SXT18, SXT19, SXT20, SXT27, SXT30, SXT36, SXT38, SXT39, SXT41, SXT43, SXT46, SXT47, SXT48 e SXT49). Podendo significar que os iniciadores foram inaptos para amplificar essas sequências ou que a região apresenta mutação.

Figura 18: Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, mostrando produto amplificado da reação de PCR para a região intergênica *traN-s063*. As setas verdes indicam bandas com tamanho esperado; os elementos SXT estão indicados pelos respectivos números; M, marcador de peso molecular GeneRuler™ 1Kb plus DNA Ladder; C+, controle positivo para SXT^{MO10}; Br, controle negativo da reação.

Para confirmação da sequência de nucleotídeos e comparação com os membros da família SXT/R391, o *amplicon* do elemento SXT4, foi sequenciado e a sequência consenso foi submetida ao BLAST.

Através do sequenciamento total da entre os genes *traN* e *s063* do elemento SXT4 foi possível obter uma sequência consenso, apresentando um comprimento de 6313 nucleotídeos. A análise desta sequência, através do BLAST, considerando apenas *e-value* zero, mostraram 97% de identidade, em 68 % de cobertura, com o elemento R391 (AY090559); 96% de identidade com SXT^{MO10} (AY055428), ICE *SpuPO1* (CP000503), ICE *PdaSpa1* (AJ870986) e ICE *VchBan8* (JQ345361.1), com 80, 79, 68 e 66 % de cobertura, respectivamente; 95% de identidade (68 % de cobertura), com o ICE *VchBan9* (CP001485.1).

Nesta sequência foram identificadas 4 ORFs, sendo que a maior, com 3042 nucleotídeos, mostrou 96% de identidade (100 % de cobertura, *e-value* zero), com a proteína hipotética TraN do elemento R391 (AY090559), ICE *Spu*PO1 (CP000503); 96% de identidade (99 % de cobertura, *e-value* zero), com SXT^{MO10} (AY055428), 96% de identidade (98 % de cobertura, *e-value* zero), com ICE *Vch*Ban8 (JQ345361.1) e 95% de identidade (100 % de cobertura, *e-value* zero), com ICE *Vch*Ban9 (CP001485.1).

A segunda ORF, apresentando 600 nucleotídeos, mostrou 98% de identidade (100 % de cobertura, *e-value* zero), com a proteína hipotética like-*s063* de ICE *Pda*Spa1 (AJ870986); 97% de identidade (100 % de cobertura, *e-value* zero), com o gene *s063* de SXT^{MO10} (AY055428); 96% de identidade (100 % de cobertura, *e-value* zero), com o elemento R391 (AY090559), ICE *Vch*Ban9 (CP001485.1) e ICE *Spu*PO1 (CP000503); e 96% de identidade (90 % de cobertura, *e-value* zero), com ICE *Vch*Ban8 (JQ345361.1).

A terceira ORF, apresentando 684 nucleotídeos, mostrou 90% de identidade (97 % de cobertura, *e-value* zero), com a proteína hipotética like-*s062* de ICE *Spu*PO1 (CP000503) e 94% de identidade (97 % de cobertura, *e-value* zero), com o gene *s062* de SXT^{MO10} (AY055428).

A quarta ORF, apresentando 1095 nucleotídeos, não apresentou alinhamentos significantes através do BLAST. A sequência de aminoácidos resultante desta ORF apresentou 98% de identidade (66 % de cobertura, *e-value* 2e-170), com sequência parcial da proteína hipotética, AUPMB_20787, de *Pasteurella multocida* subsp. *multocida* (EJS85228.1).

4.1.7 Hotspot 3

Região intergênica s073-traF

A região entre os genes *s073* e *traF*, é a região de aquisição de genes, conhecida como “hotspot” 3 (HS3). A região *s073-traF* amplificada pelos iniciadores HotS3F e TraF2R resultam em um *amplicon* de 5992 pb, no elemento SXT^{MO10}, 9587 pb no ICE *VchMex1* e 1885 pb no elemento R391.

Dos 49 elementos SXT estudados, em apenas 4 foi observada a amplificação da região *s073-traF*, com um tamanho aproximado de 5992 pb, perfil típico do elemento SXT^{MO10} (SXT6, SXT22, SXT25 e SXT28). Além disso, em 1 elemento (SXT26), foi observado o tamanho de 1885 pb, compatível com o elemento R391.

Alguns elementos apresentaram um tamanho de banda atípico, sendo que em 2 elementos (SXT7 e SXT24), a região foi amplificada com um tamanho de aproximadamente 5000 pb, em 22 elementos (SXT14, SXT15, SXT16, SXT17, SXT23, SXT32, SXT33, SXT34, SXT35, SXT36, SXT37, SXT38, SXT39, SXT40, SXT42, SXT43, SXT44, SXT45, SXT46, SXT47, SXT48 e SXT49), a região foi amplificada com um tamanho de aproximadamente 4000 pb, e em 2 elementos (SXT 20 e SXT21), a região foi amplificada com um tamanho de aproximadamente 3000 pb. Além disso, 4 elementos apresentaram um tamanho de banda atípico, com

aproximadamente 300 pb (SXT1, SXT3, SXT4 e SXT5), como pode ser observado na Figura 19.

Nos 14 elementos SXT restantes (SXT2, SXT8, SXT9, SXT10, SXT11, SXT12, SXT13, SXT18, SXT19, SXT27, SXT29, SXT30, SXT31 e SXT41), não houve amplificação, por intermédio dos iniciadores utilizados. Podendo significar que os iniciadores foram inaptos para amplificar essas sequências ou que a região apresenta mutação.

Figura 19: Eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, mostrando produto amplificado da reação de PCR para a região intergênica s073-traF. As setas vermelhas indicam bandas com tamanho atípico; os números são referentes ao elemento SXT; M, marcador de peso molecular GeneRuler™ 1kb plus DNA Ladder; Br, controle negativo da reação. O controle positivo para SXT^{MO10} foi utilizado embora não mostrado.

Para confirmação da sequência de nucleotídeos e comparação com os membros da família SXT/R391, os amplicons dos elementos SXT1, SXT4

e SXT7, foram sequenciados e a sequência consenso foi submetida ao BLAST para análise filogenética.

Através do sequenciamento total da região s073-traF, dos elementos SXT1 e SXT4 foi possível obter uma sequência consenso, apresentando um comprimento de 344 nucleotídeos. A análise desta sequência, através do BLAST, mostrou *e-value* entre 1e-115 a 9e-52, identidade entre 93 e 95 %, e cobertura igual (41 %), entre diversos membros da família SXT/R391. A única cobertura de 100 % (96 % de identidade; *e-value* 1e-115) ocorreu entre ICE *Vch*Ban8 (JQ345361.1). No entanto, as sequências que flanqueiam as extremidades da região sequenciada mostraram identificação com TraF e o gene s073. A análise da sequência de 942 nucleotídeos, apresentando 100 % de cobertura, além de *e-value* zero, mostrou 96 % de identidade com ICE *Vch*Ban9 (CP001485.1), 95 % de identidade com ICE *Pda*Spa1 (AJ870986), TraF do elemento SXT(ET), *V. cholerae* biovar El Tor (AY035340.1), R391 (AY090559) e SXT^{MO10} (AY055428); 94 % de identidade com ICE *Spu*PO1 (CP000503) e 93 % de identidade com ICE *Vch*Ban8 (JQ345361.1). A análise da sequência de 702 nucleotídeos, levando em consideração apenas *e-value* zero, mostrou 95 % de identidade (100 % de cobertura) com ICE *Vch*Ban8 (JQ345361.1) e 94 % de identidade e 75 % de cobertura, com R391 (AY090559), ICE *Spu*PO1 (CP000503), ICE *Vch*Ban9 (CP001485.1) e SXT^{MO10} (AY055428).

Estes resultados mostram que o elemento SXT1 e SXT4, possuem o hotspot 3, vazio, ou seja, sem inserções, uma vez que os genes s073 e traF

se mantêm próximos. Podemos inferir que ocorra o mesmo, com os elementos SXT3 e SXT5.

Através do sequenciamento parcial da região s073-traF, do elemento SXT7 não foi possível obter uma sequência consenso. No entanto, a análise individual das sequências obtidas foi realizada. A primeira sequência, apresentando um comprimento de 729 nucleotídeos, foi analisada através do BLAST, considerando apenas *e-value* zero, mostrou 97% de identidade, em 56 % de cobertura com a proteína hipotética (gene s073) e like-TraF (DQ180352.1) do ICE *VchMex1* (GQ463143.1). A segunda sequência, apresentando um comprimento de 759 nucleotídeos, resultou em *e-value* de 7e-86, e 99 % de identidade, além de 24 % de cobertura, com ICE *VchBan9* (CP001485.1), com a proteína hipotética (gene s073) e like-TraF (DQ180352.1) do ICE *VchMex1* (GQ463143.1) e com SXT^{MO10} (AY055428).

4.1.8 Região Variável 3 – RV3

Região intergênica traG-setC

A região entre os genes *traG* e *setC*, faz parte do módulo de regulação e está localizada tipicamente, mais próximo à extremidade 3', portando no final do elemento SXT. A região *traG-setC* amplificada pelos iniciadores 13TA4 e MerR resultam em um *amplicon* de mesmo tamanho nos elementos SXT^{MO10} e ICEVChMex1, 765pb, porém difere muito no elemento R391, o qual apresenta um *amplicon* com 4227 pb.

Dos 49 elementos SXT estudados, apenas o SXT41 amplificou a região traG-setC, com um tamanho aproximado de 4447 pb, perfil típico do elemento R391. Os elementos SXT7 e SXT31 amplificaram uma sequência atípica, com cerca de 2000 pb. Todos os demais 46 elementos SXT restantes, amplificaram uma sequência, com cerca de 760 pb, compatível com o perfil dos elementos SXT^{MO10}, também observado no ICEVChMex1.

Na Figura 20, pode ser observada a diferença entre os perfis típicos de bandas da região traG-setC em uma cepa com o elemento SXT^{MO10}, e em um isolado que apresenta características do elemento ICEVChMex1, representada por C₁ e C₄, respectivamente.

Figura 20: Eletroforese em gel de agarose 1 %, corado com brometo de etídio, apresentando *amplicons* da reação de PCR para a região intergênica traG-setC. As setas verdes indicam bandas com tamanho esperado; a seta vermelha indica banda com tamanho atípico; os números são referentes aos elementos SXT; M, marcador de peso molecular GeneRuler™ 1kb plus DNA Ladder, Fermentas; C+, controle positivo para SXT^{MO10}; Br, controle negativo da reação.

Para confirmação da sequência de nucleotídeos e comparação com os membros da família SXT/R391, os amplicons dos elementos SXT4, SXT11 e SXT31, foram sequenciados e a sequência consenso foi submetida ao BLAST para análise filogenética.

Através do sequenciamento parcial da região traG-setC do elemento SXT4 foi possível obter uma sequência consenso, apresentando um comprimento de 768 nucleotídeos. A análise desta sequência, através do BLAST, considerando apenas *e-value* zero e 100% de cobertura, mostrou 100 % de identidade, com ICE *Vch*Ind5 (GQ463142.1), ICE *Vch*Ban5 (GQ463140.1), ICE *Vch*Ban9 (CP001485.1) e CDS completa do gene *eexR1* nos elementos ICE *Vch*Ind3 (EF434310.1), ICE *Vch*Ind2 (EF434309.1), ICE *Vch*Ind1 (EF434308.1), ICE *Vch*Ban6 (EF434307.1), ICE *Vch*Ban5 (EF434306.1), além de 99 % de identidade, com o gene *eexR3* de ICE *Vch*Mex1 (EF434312.1).

Através do sequenciamento parcial da região traG-setC do elemento SXT11 foi possível obter uma sequência consenso, apresentando um comprimento de 763 nucleotídeos. A análise desta sequência, através do BLAST, considerando apenas *e-value* zero, mostrou 95 % de identidade e 99 % de cobertura, com ICE *Pa*Ban1 (GQ463139); 94 % de identidade e 99 % de cobertura, com ICE *Vch*Ind5 (GQ463142.1), ICE *Vch*Ban5 (GQ463140.1) e ICE *Vch*Ban9 (CP001485.1); 93 % de identidade e 100 % de cobertura, com ICE *Vch*Mex1 (GQ463141.1); 90 % de identidade e 100 % de

cobertura, com ICE *Vch*Ind4 (GQ463141.1); 87 % de identidade e 99 % de cobertura, com ICE *Vfl*Ind1 (GQ463144.1) e ICE *Spu*PO1 (CP000503).

Através do sequenciamento parcial da região traG-setC do elemento SXT31 não foi possível obter uma sequência consenso. No entanto, a análise individual das sequências obtidas foi realizada. A primeira sequência, apresentando um comprimento de 304 nucleotídeos, foi analisada através do BLAST, e não resultou similaridade significativa. A segunda sequência apresentou um comprimento de 473 nucleotídeos e considerando apenas *e-value* zero e 99 % de cobertura, mostrou 99 % de identidade com ICE *Vch*Mex1 (GQ463141.1); 98 % de identidade, com a proteína TraG de ICE *Vch*Ban9; 96 % de identidade com os genes *merA*, *merC*, *merP* e *merT* de *P. putrefaciens* (Z49196.1); 95 % de identidade, com R391 (AY090559); 94 % de identidade, com ICE *Vch*Ban8 (JQ345361.1); 94 % de identidade (96 % de cobertura), com ICE *Pda*Spa1 (AJ870986); e 93% de identidade (96 % de cobertura), com SXT^{MO10} (AY055428) e ICE *Spu*PO1 (CP000503). Além disso apresentou *e-value* entre 1e-140 a 1e-135, cobertura de 58% e 99% de identidade com CDS completa do gene *eexR3* de ICE *Vch*Mex1 (EF434312.1); gene *eexR1* nos elementos ICE *Vch*Ind3 (EF434310.1), ICE *Vch*Ind2 (EF434309.1), ICE *Vch*Ind1 (EF434308.1), ICE *Vch*Ban6 (EF434307.1), ICE *Vch*Ban5 (EF434306.1), ICE *Vch*Ban4 (EF434305.1), ICE *Vch*Ban3 (EF434304.1) e ICE *Vch*Ban2 (EF434303.1).

Os elementos da família SXT/R391 carregam genes para um sistema de exclusão. Os sistemas de exclusão de entrada funcionam para inibir

4.2 IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIE por 16S rDNA

Para a identificação da espécie dos 48 isolados bacterianos, que carregam o elemento SXT, o gene 16S rDNA foi amplificado por PCR e os *amplicons* foram purificados e sequenciados.

A análise *in silico* das sequências parciais de nucleotídeos foi realizada e os micro-organismos foram classificados, totalizando 9 espécies diferentes, sendo, 8 *Vibrio cholerae*, 3 *Vibrio fluvialis*, 3 *Vibrio navarrensis*, 1 *Vibrio parahaemolyticus*, 4 *Morganella morganii*, 19 *Providencia rettgeri*, 5 *Proteus vulgaris*, 4 *Proteus mirabilis* e 1 *Proteus penneri* (quadro 9), de acordo com os resultados obtidos através do banco de dados público de sequências 16S ribossomal RNA, GenBank (NCBI – National Center for Biotechnology Information).

As análises também foram realizadas através do sistema SILVA, porém os resultados não foram totalmente congruentes com aqueles apresentados pelo GenBank (dados não apresentados). Mantivemos o resultado da análise realizada através do GenBank, por irem ao encontro dos dados da análise fenotípica dos isolados (dados não apresentados).

A análise filogenética construída com base na sequência parcial do gene rDNA16S das cepas dos 48 isolados bacterianos foi realizada. Os resultados para o gênero *Morganella*, *Providencia* e *Proteus*, podem ser vistos através das figuras 22, 23 e 24.

Quadro 9: Espécie de micro-organismo identificado pelo 16S rDNA, segundo o isolado e o respectivo elemento SXT.

Espécie	Nº do isolado* (Nº SXT)
<i>Vibrio cholerae</i>	710/12 (2), 715/12(7), 727/12 (19), 728/12 (20), 735/12 (27), 737/12 (29), 738/12 (30), 739/12 (31)
<i>V. fluvialis</i>	711/12 (3), 712/12 (4), 713/12 (5)
<i>V. navarrensis</i>	714/12 (6), 733/12 (25), 736/12 (28)
<i>V. parahaemolyticus</i>	734/12 (26)
<i>Morganella morganii</i>	716/12 (8), 722/12 (14), 726/12 (18), 744/12 (36)
<i>Providencia rettgeri</i>	717/1 (29), 718/12 (10), 719/12 (11), 720/12 (12), 723/12 (15), 724/12 (16), 725/12 (17), 729/12 (21), 730/12 (22), 731/12 (23), 740/12 (32), 741/12 (33), 742/12 (34), 743/12 (35), 745/12 (37), 746/12 (38), 747/12 (39), 748/12 (40), 749/12 (41)
<i>Proteus vulgaris</i>	721/12 (13), 751/12 (43), 755/12 (47), 756/12 (48), 757/12 (49)
<i>P. mirabilis</i>	750/12 (42), 752/12 (44), 753/12 (45), 754/12 (46)
<i>P. penneri</i>	732/12 (24)

*Número de identificação no freezer -80 °C.

Gênero *Providencia*

Figura 22: Representação gráfica da análise filogenética inferida com base na sequência parcial do gene rDNA16S das cepas do gênero *Providencia*, positivas para o elemento SXT, obtida pelo método de Neighbour-Joining, segundo modelo de máxima verossimilhança composta, com 1.000 replicações. Os números de acesso ao GenBank estão indicados entre parêntesis. Os números que aparecem próximos aos nós, indicam os valores, em porcentagem, de bootstrap. Número de substituições de nucleotídeos.

Gênero *Morganella morganii*

Figura 23: Representação gráfica da análise filogenética inferida com base na sequência parcial do gene rDNA16S das cepas do gênero *Morganella*, positivas para o elemento SXT, obtida pelo método de de Neighbour-Joining, segundo modelo de máxima verossimilhança composta, com 1.000 replicações. Os números de acesso ao GenBank estão indicados entre parêntesis. Os números que aparecem próximos aos nós, indicam os valores, em porcentagem, de bootstrap. Número de substituições de nucleotídeos.

Gênero *Proteus*

Figura 24: Representação gráfica da análise filogenética inferida com base na sequência parcial do gene rDNA16S das cepas do gênero *Proteus*, positivas para o elemento SXT, obtida pelo método de de Neighbour-Joining, segundo modelo de máxima verossimilhança composta, com 1.000 replicações. Os números de acesso ao GenBank estão indicados entre parêntesis. Os números que aparecem próximos aos nós, indicam os valores, em porcentagem, de bootstrap. Número de substituições de nucleotídeos.

4.3 PERFIL GENOTÍPICO DO ELEMENTO SXT

De acordo com os resultados obtidos, todos os 49 elementos SXT estudados foram confirmados como Elementos Integrativos e Conjugativos pertencentes à família SXT/R391.

Os elementos SXT obtidos neste estudo foram agrupados, segundo o gênero dos micro-organismos que os abrigam. Além disso, tendo como base os genes e regiões intergênicas que apresentaram, foram dispostos de maneira hipotética, formando um perfil, representado por um esquema linear construído de maneira a obter uma visão geral da sua diversidade. No anexo 1 é apresentada a compilação das características dos elementos SXT obtidos neste estudo, segundo os resultados da PCR para cada gene ou região intergênica pesquisada.

4.3.1 Perfil Genotípico do Elemento SXT em *Morganella morganii*

Na figura 25, podem ser observados os perfis dos 4 elementos SXT, observados neste estudo em *Morganella morganii*. Nos elementos SXT14 e SXT36 não houve a amplificação das regiões attL-xis e traA-s054. Os elementos apresentam as regiões rumB-rumA e traG-setC, comuns no elemento R391 e no elemento SXT^{MO10}, respectivamente, ambas também presentes no ICE *VchMex1*. Adicionalmente, ambos apresentam a região s026-s027, específica do elemento SXT^{MO10}. Os genes de resistência ao

sulfametoxazol, *sulII* e trimetoprim, *dfr18*, estão presentes também nos dois elementos.

Figura 25. Representação esquemática (sem escala) dos genes e regiões intergênicas amplificados por PCR de elementos SXT8, SXT14, SXT18 e SXT36 encontrados em isolados de *Morganella morganii*. As setas representam a região attL-xis (roxa), o gene da integrase (azul), a região s002-xis (verde), a região rumBA (bege); os genes *dfr18* e *floR* (listras vermelhas); os genes *strA* e *sulII* (vermelha); a região s026-027 (lavanda). As barras representam as regiões intergênicas s043-traL (verde claro), traA-s054 (azul claro) e traG-setC (rosa). A linha cinza representa a região do genoma que não foi sequenciada no estudo.

O elemento SXT14 possui adicionalmente, os genes de resistência ao cloranfenicol e a estreptomicina, *floR* e *strA*, respectivamente. Os elementos SXT4 e SXT36, diferem também quanto à região s043-traL, apresentando identidade com o elemento R391 e com o elemento SXT^{MO10}, respectivamente. A região s002-xis, embora não tenha potencial discriminatório entre os elementos SXT^{MO10} e R391, uma vez que diferem apenas em 2 nucleotídeos, mostrou um perfil típico no SXT36 e atípico no SXT14 (cerca de 2000 pb). Outra diferença entre os dois elementos é a amplificação da região s073-traF, com cerca de 1885 pb, típico do elemento R391, no elemento SXT36 e ausência de amplificação da região no elemento SXT14.

Os elementos SXT18 e SXT8 possuem perfil semelhante, entre si, apresentando as regiões attL-xis e rumBA compatíveis com o elemento R391, também presente no ICE *VchMex1*; as regiões s043-traL e traA-s054, típicas do ICE *VchMex1*; a região traG-setC compatível com o elemento SXT^{MO10}, também presente no ICE *VchMex1*. Também possuem a região s002-xis, que não é discriminatória, uma vez que difere apenas em 2 nucleotídeos.

Nenhum dos elementos apresentou a região s026-s027. Os dois elementos possuem, ainda, o gene de resistência ao sulfametoxazol, *sulII*. A única diferença notada entre eles é a presença no SXT18, do gene de resistência ao trimetoprim, *dfr18*, ausente no SXT8.

Curiosamente, os elementos SXT8 e SXT18 apesar de apresentarem um perfil semelhante, são de origem distinta, enquanto os elementos SXT14 e SXT36 apresentam um perfil diverso e possuem a mesma origem, embora tenham sido coletados em períodos diferentes.

4.3.2 Perfil Genotípico do Elemento SXT em *Proteus* spp.

Na figura 26, podem ser observados os perfis dos 10 elementos SXT encontrados em bactérias do gênero *Proteus*. No elemento SXT13 não ocorreu a amplificação das regiões attL-xis, traA-s054 e s073-traF. No entanto, apresenta as regiões rumB-rumA e s043-traL, encontradas no elemento R391, além de traG-setC e s026-s027, encontradas no elemento

SXT^{MO10}, sendo esta última uma região específica do elemento. O elemento SXT13 apresentou ainda, os genes *floR*, *strA* e *sulII*, que codificam a resistência ao cloranfenicol, estreptomicina e sulfametoxazol, respectivamente. O elemento SXT13 apresentou também a região s002-xis, embora atípica, com cerca de 2000 pb.

Figura 26. Representação esquemática (sem escala) dos genes e regiões intergênicas amplificadas por PCR de elementos SXT encontrados em isolados do gênero *Proteus*. As setas representam a região attL-xis (roxo), o gene da integrase (azul), a região s002-xis (verde), a região rumBA (bege); os genes *dfr18* e *floR* (listras vermelhas); os genes *strA* e *sulII* (vermelha); a região s026-027 (lavanda). As barras representam as regiões intergênicas s043-traL (verde claro), traA-s054 (azul claro), s073-traF (contorno laranja) e traG-setC (rosa). A linha cinza representa a região do genoma que não foi sequenciada no estudo. A seta branca representa uma região de rumBA de 19K.

O elemento SXT24 somente não apresentou amplificação para as regiões s026-s027 e s073-traF, porém apresenta as regiões attL-xis, traA-s054 e traG-setC, encontradas no elemento SXT^{MO10}, além das regiões rumB-rumA e s043-traL, encontradas no elemento R391. O elemento

SXT24, assim como o SXT13, também apresentou a região s002-xis atípica, com o mesmo tamanho (2000 pb). Além disso, apresentou todos os genes de resistência pesquisados (*dfr18*, *floR*, *strA* e *sulII*).

Nos elementos SXT13 e SXT24 possivelmente os genes de resistência encontrados, não estejam dentro da região entre rumA-rumB, uma vez que essa região apresentou um tamanho de 911 pb. Isso significa que o gene rumB está inteiro, não ocorrendo nenhuma inserção de genes.

Os elementos SXT42, SXT43, SXT44, SXT45, SXT46, SXT47, SXT48 e SXT49, apresentaram a região s043-traL, típica do elemento R391, além das regiões attL-xis, encontrada no elemento R391 e ICE *VchMex1*; a região traG-setC, encontrada no elemento SXT^{MO10}, e a região s026-s027, específica do SXT^{MO10}.

Os elementos SXT42, SXT43, SXT44, SXT45 e SXT48 apresentaram a região traA-s054 típica do SXT^{MO10} e se diferenciam dos demais por apresentarem a região s073-traF, atípica com cerca de 3500 pb. Nesse grupo, os elementos SXT42, SXT43, SXT44 e SXT45 apresentam a região rumB-rumA semelhante ao R391 e não apresentaram genes de resistência. Também não foi amplificada nesses elementos a região s002-xis, não discriminatória, com exceção do SXT45. Os elementos SXT46, SXT48 e SXT49 não amplificaram a região rumB-rumA, o que pode significar um tamanho muito grande como em SXT^{MO10} ou uma variação na região, embora não tenham sido detectados genes de resistência.

O elemento SXT47 também não apresentou a região de rumB-rumA, porém mostrou-se positivo para os genes de resistência a estreptomicina e sulfametoxazol (*strA* e *sulII*). Esse elemento também não apresentou a região traA-s054.

Os elementos SXT42, SXT43 e SXT44 parecem ser muito semelhantes, se comparados apenas por suas características gerais, assim como os elementos SXT46 e SXT49, que também possuem características semelhantes entre si, podendo constituir clones.

4.3.3 Perfil Genotípico do Elemento SXT em *Providencia* spp.

Na figura 27, podem ser observados os perfis do elemento SXT encontrados em 19 bactérias do gênero *Providencia*. No grupo de elementos SXT identificados em bactérias do gênero *Providencia*, todos apresentaram a região s043-traL. Nos elementos SXT9, SXT10, SXT11, SXT12, SXT15 e SXT16 que apresentaram o mesmo perfil, mais os elementos SXT17, SXT21, SXT22 e SXT23, a amplificação da região s043-traL resultou em 1096 pb, que é típica do elemento R391. Enquanto nos elementos SXT33, SXT34, SXT35, SXT37 e SXT39, que compartilham o mesmo perfil, mais os elementos SXT38 e SXT40, também apresentando o mesmo perfil entre si, mais os elementos SXT32 e SXT41, a amplificação da região s043-traL apresentou 1096 pb, típica do SXT^{MO10}.

Figura 27. Representação esquemática (sem escala) dos genes e regiões intergênicas amplificadas por PCR de elementos SXT encontrados em isolados do gênero *Providencia*. As setas representam a região attL-xis (roxo), o gene da integrase (azul), a região s002-xis (verde), a região rumBA (bege); o gene *fdr18* (listras vermelhas); o gene *strA* (vermelha menor); o gene *sulII* (vermelha maior); a região s026-027 (lavanda). As barras representam as regiões intergênicas s043-traL (verde claro), traA-s054 (azul claro), s073-traF (laranja) e traG-setC (rosa). A linha cinza representa a região do genoma que não foi sequenciada no estudo. A seta branca representa uma região de rumBA de 19K não sequenciada. As barras que apresentam apenas contorno representam tamanhos atípicos.

No perfil único apresentado pelos elementos SXT9, SXT10, SXT11, SXT12, SXT15 e SXT16, os iniciadores para a região s002-xis amplificaram cerca de 2000 pb, valor acima dos 1526/28 pb característicos do SXT^{MO10}, ICE *VchMex1* e do elemento R391. A região entre rumB-rumA apresentou 911 pb, portanto típica do elemento R391. A região entre traG-setC, porém é característica do SXT^{MO10} e do ICE *VchMex1*. Além disso, o perfil apresentou

os genes de resistência a trimetoprim e sulfametoaxil, *dfr18* e *sulII*, respectivamente. As regiões attL-xis, s026-s027, traA-s054 e s073-traF, não foram amplificadas.

Os elementos SXT22 e SXT23 apresentam características idênticas àquelas apresentadas pelo grupo formado pelos elementos SXT9, SXT10, SXT11, SXT12, SXT15 e SXT16, diferindo apenas quanto à região s073-traF, que no elemento SXT22 apresenta cerca de 5992 pb, característica do SXT^{MO10} e no elemento SXT23 apresenta um tamanho atípico de cerca de 7000 pb.

Os elementos SXT33, SXT34, SXT35, SXT37 e SXT39, também exibiram o mesmo perfil, o qual é composto pela região s002-xis, com a amplificação esperada, entre 1526/28 pb; pelas regiões entre rumB-rumA de 911 pb, e entre s073-traF com um tamanho de 1885 pb, ambas típicas do elemento R391; e pela região entre traG-setC, de 765 pb, característica do SXT^{MO10} e do ICE *VchMex1*. Além disso, o perfil não apresentou os genes de resistência a antibióticos, bem como as regiões attL-xis, s026-s027 e traA-s054 e s073-traF.

Compartilham também o mesmo perfil os elementos SXT38 e SXT40, diferindo das características do perfil descrito anteriormente, por apresentarem os genes de resistência à estreptomicina e ao sulfametoxazol (*strA* e *sulII*).

O elemento SXT17 apresentou a região attL-xis com cerca de 2380 pb, tamanho observado no ICE *VchMex1* e R391; a região s002-xis com tamanho típico; a região entre rumB-rumA de 911 pb, semelhante ao elemento R391; a região s026-s027, com 408 pb, típica do SXT^{MO10}; a região traA-s054, com cerca de 1354 pb, característica do ICE *VchMex1*; a região s073-traF atípica com cerca de 3500 pb; a região traG-setC com 765 pb, típica de SXT^{MO10} e ICE *VchMex1*. O elemento também foi positivo para o gene *dfr18*.

O elemento SXT21 apresentou a região s002-xis com tamanho típico de cerca de 1526/28 bp; a região s026-s027, com 408 pb, típica do SXT^{MO10}; a região traA-s054, com cerca de 2069 pb, característica do SXT^{MO10}; a região s073-traF com cerca de 5992 pb também característica do SXT^{MO10}; a região traG-setC com 765 pb, típica de SXT^{MO10} e ICE *VchMex1*. Não apresentou amplificação da região attL-xis e da região entre rumB-rumA, porém apresentou-se positivo para os genes *dfr18*, *strA* e *sullI*, o que pode sugerir que estes genes estejam inseridos no gene rumB, e por essa razão não tenha ocorrido a amplificação. O elemento SXT21 é até o momento o mais conservado em comparação ao SXT^{MO10}.

O elemento SXT41 apresentou a região attL-xis com cerca de 453 pb, tamanho observado no SXT^{MO10}; a região s002-xis com tamanho atípico de 2000 pb, aproximadamente, valor acima dos 1526/28 pb característicos do SXT^{MO10}, ICE *VchMex1* e do elemento R391; além das regiões traA-s054, com cerca de 2069 pb, característica do SXT^{MO10} e traG-setC com cerca de

4227 pb, típica do elemento R391. Não apresentou amplificação das regiões s026-s027, s073-traF e rumB-rumA. Porém, possui os genes *strA* e *sulII*, o que pode sugerir que estes genes estejam inseridos no gene rumB, e por essa razão não tenha havido amplificação.

O elemento SXT32 apresentou amplificação de três regiões, além do gene da integrase: a região entre rumB-rumA com 911 pb, típica do elemento R391 e do ICE *VchMex1*, a região s073-traF, com 1885 pb, também típica do elemento R391 e a região traG-setC de 765, típica do SXT^{MO10} e do ICE *VchMex1*.

4.3.4 Perfil Genotípico do Elemento SXT em *Vibrio* spp.

Na figura 28, podem ser observados os perfis dos 16 elementos SXT encontrados em bactérias do gênero *Vibrio*. Dentre este grupo de ICEs, podemos observar que apenas no elemento SXT6 não foi amplificada a região attL-xis, enquanto nos elementos SXT1, SXT3 e SXT4 a ampliação resultou uma banda atípica com cerca de 300 pb, podendo significar uma deleção na região típica de SXT^{MO10}, que possui 453 pb. Nos demais elementos a região attL-xis apresentou um tamanho compatível com o elemento R391 e o ICE *VchMex1*.

O elemento SXT6 além de não mostrar amplificação da região attL-xis, também não amplificou a região entre s026-s027, a região entre s043-traL e a região entre s073-traF, bem como não apresentou os genes de

resistência pesquisados. Apresentou a região s002-xis, não discriminatória, a região rumB-rumA, com o mesmo tamanho encontrado nos elementos R391 e ICE *VchMex1* e a região traG-setR no tamanho idêntico ao SXT^{MO10} e ICE *VchMex1*. Também apresentou a região entre traA-s054, porém um tamanho atípico, com cerca de 1000 pb, próximo dos 1354 pb esperados para o ICE *VchMex1*, podendo significar uma deleção.

Figura 28. Representação esquemática (sem escala) dos genes e regiões intergênicas amplificadas por PCR de elementos SXT encontrados em isolados do gênero *Vibrio*. As setas representam a região attL-xis (roxa), o gene da integrase (azul), a região s002-xis (verde), a região rumBA (bege); o gene *dfr18* (listras vermelhas); o gene *floR* (vermelha); a região s026-027 (lavanda). As barras representam as regiões intergênicas s043-traL (verde claro), traA-s054 (azul claro), s073-traF (laranja) e traG-setC (rosa). A linha cinza representa a região do genoma que não foi sequenciada no estudo. A seta branca representa uma região de rumBA de 19K não sequenciada. As barras sólidas representam tamanhos típicos, e as barras abertas (somente contorno) representam tamanhos atípicos.

Os elementos SXT 1, SXT3 e SXT4 apresentaram amplificação atípica da região attL-xis, com cerca de 600 pb, parecendo ter ocorrido uma mutação na região, quando comparada com a mesma região no SXT^{MO10}, anteriormente discutida, tendo como base o SXT4. Os mesmos elementos também compartilham uma amplificação da região entre s073-traF, com cerca de 344 pb, demonstrando que não existem genes inseridos nesse *hotspot*.

No elemento SXT1 não houve amplificação das regiões entre s002-xis, rumB-rumA, e s026-s027, assim como não apresentou os genes de resistência pesquisados. A região entre s043-traL foi amplificada, com o tamanho aproximado de 1096 pb, e a região entre traA-s054 com cerca de 7021 pb, ambas típicas do elemento R391. Este elemento também não mostrou amplificação da região entre traG-setC, porém com característica semelhante ao SXTMO10, também apresentada pelo ICE *VchMex1*.

Os elementos SXT3 e SXT4, também não apresentaram amplificação das regiões entre s002-xis, rumBA, e s026-s027, porém, ambos apresentaram o gene *suIII*. Apresentaram a região entre s043-traL, com o tamanho aproximado de 1096 pb, e a região entre traG-setC com cerca de 765 pb, típicas do elemento R391 e do SXT^{MO10}, respectivamente. A única diferença notada entre ambos foi a amplificação da região entre traA-s054, com cerca de 7021 pb, típica do elemento R391, no elemento SXT4, não ocorrida no SXT3.

Os elementos SXT19 e SXT20, também compartilham muitas semelhanças, dentre as quais, a amplificação da região entre attL-xis, com cerca de 2380/1 pb, da região entre s002-xis, não discriminatória, a região entre s043-traL com cerca de 1627 pb, típica do ICE *VchMex1*, a região traA-s054 com 1354 pb, típica do ICE *VchMex1* e a região traG-setR, com 765 pb, compartilhável com o SXTMO10 e com o ICE *VchMex1*. Nos dois elementos SXT não houve amplificação da região entre rumB-rumA, no entanto ambos foram positivos para o gene que codifica resistência ao trimetoprim, *dfr18*, o que pode significar que haja uma inserção no gene rumB. Também não foi amplificada a região entre s026 e s027. A única diferença entre os dois elementos é uma amplificação atípica da região s073-traF, com cerca de 2500 pb, que ocorre no elemento SXT20, mas não no SXT19.

Os demais elementos SXT, albergados por cepas do gênero *Vibrio*, possuem perfis muito heterogêneos, sugerindo uma grande diversidade de características, que somente poderão ser conclusivamente descritas após o sequenciamento completo do elemento.

De acordo com os resultados obtidos, dos 49 elementos SXT estudados, 43 possuem características distinguíveis pelos métodos empregados, sendo nomeados de acordo com a nomenclatura proposta por BURRUS *et al.* (2006) onde, após o prefixo ICE é colocada a abreviação da espécie de origem, seguida de três letras as quais indicam o país de origem e um número para designar diferentes isolados da mesma espécie e do mesmo país (quadro 10).

Quadro 10: Elemento Conjugativo e Integrativo, segundo organismo de origem, local e ano de isolamento cepa.

N° SXT	ICE	Organismo	Isolamento		
			Origem	Local	Ano
1	ICE VflBra1	<i>Vibrio fluvialis</i>	bivalve	Camaçari – BA	2002
2	ICE VchBra1	<i>Vibrio cholerae</i>	esgoto	José Menino, Santos	1994
3	ICE VflBra2	<i>Vibrio fluvialis</i>	bivalve	Camaçari – BA	2002
4	ICE VflBra3	<i>Vibrio fluvialis</i>	bivalve	Valença – BA	2001
5	ICE VflBra4	<i>Vibrio fluvialis</i>	água salobra	Mangue, Cubatão	2000
6	ICE VnaBra1	<i>Vibrio navarrensis</i>	água doce	Rio Tietê, São Paulo	2000
7	ICE VchBra2	<i>Vibrio cholerae</i>	esgoto	EE Rebouças, Santos	2012
8	ICE MmoBra1	<i>Morganella morganii</i>	esgoto	EE Rebouças, Santos	2012
9	ICE PreBra1	<i>Providencia rettgeri</i>	esgoto	Congonhas, S. Paulo	2012
10		<i>Providencia rettgeri</i>			
11		<i>Providencia rettgeri</i>			
12		<i>Providencia rettgeri</i>			
13	ICE PvuBra1	<i>Proteus vulgaris</i>	esgoto	Cumbica, Guarulhos	2012
14	ICE MmoBra2	<i>Morganella morganii</i>			
15	ICE PreBra1	<i>Providencia rettgeri</i>			
16	ICE PreBra1	<i>Providencia rettgeri</i>			
17	ICE PreBra2	<i>Providencia rettgeri</i>	esgoto	Cumbica, Guarulhos	2012
18	ICE MmoBra3	<i>Morganella morganii</i>	esgoto	Barra Funda, S. Paulo	2012
19	ICE VchBra3	<i>Vibrio cholerae</i>			
20	ICE VchBra4	<i>Vibrio cholerae</i>			
21	ICE PreBra3	<i>Providencia rettgeri</i>			
22	ICE PreBra4	<i>Providencia rettgeri</i>	esgoto	Congonhas, S. Paulo	2012
23	ICE PreBra5	<i>Providencia rettgeri</i>	esgoto	Cumbica, Guarulhos	2012
24	ICE PpeBra1	<i>Proteus penneri</i>			
25	ICE VnaBra2	<i>Vibrio navarrensis</i>			
26	ICE VpaBra1	<i>V. parahaemolyticus</i>			
27	ICE VchBra5	<i>Vibrio cholerae</i>	esgoto	Porto, Santos	2012
28	ICE VnaBra3	<i>Vibrio navarrensis</i>	esgoto	EE Rebouças, Santos	2012
29	ICE VchBra6	<i>Vibrio cholerae</i>			
30	ICE VchBra7	<i>Vibrio cholerae</i>			
31	ICE VchBra8	<i>Vibrio cholerae</i>			
32	ICE PreBra6	<i>Providencia rettgeri</i>	esgoto	Congonhas, S. Paulo	2012
33	ICE PreBra7	<i>Providencia rettgeri</i>			
34		<i>Providencia rettgeri</i>			
35		<i>Providencia rettgeri</i>			
36	ICE MmoBra4	<i>Morganella morganii</i>	esgoto	Congonhas, S. Paulo	2012
37	ICE PreBra7	<i>Providencia rettgeri</i>			
38	ICE PreBra8	<i>Providencia rettgeri</i>			
39	ICE PreBra7	<i>Providencia rettgeri</i>			
40	ICE PreBra8	<i>Providencia rettgeri</i>	esgoto	TR Tietê, São Paulo	2012
41	ICE PreBra9	<i>Providencia rettgeri</i>			
42	ICE PmiBra1	<i>Proteus mirabilis</i>			
43	ICE PvuBra2	<i>Proteus vulgaris</i>			
44	ICE PmiBra2	<i>Proteus mirabilis</i>	frango	Mercado, São Paulo	2012
45		<i>Proteus mirabilis</i>			
46		<i>Proteus mirabilis</i>			
47	ICE PvuBra3	<i>Proteus vulgaris</i>			
48	ICE PvuBra4	<i>Proteus vulgaris</i>			
49	ICE PvuBra5	<i>Proteus vulgaris</i>			

Legenda: EE, estação de esgoto; TR, terminal rodoviário.

4.4 ANÁLISE FENOTÍPICA DE SENSIBILIDADE A ANTIBIÓTICOS

Foram realizados testes de sensibilidade por meio de um painel composto por representantes de diferentes classes de antibióticos nas 49 cepas positivas para o elemento SXT.

A interpretação dos resultados foi baseada na medida do diâmetro das zonas de inibição de crescimento e foram consideradas como: sensíveis, intermediárias ou resistentes, de acordo com os padrões do CLSI e critérios do EUCAST 2013. Os resultados quantitativos e qualitativos estão disponíveis nos anexos 2 e 3, respectivamente.

A cepa de *Escherichia coli*, ATCC 25922, utilizada como controle de qualidade apresentou os limites aceitáveis preconizados pelo NCCLS.

Todas as cepas de *Morganella morganii* se mostraram resistentes à ampicilina (AMP), à amoxicilina/clavulanato (AMC), à cefazolina (CFZ), à cefalotina (CFL), à tetraciclina (TET), à doxiciclina (DOX), ao co-trimoxazol (SXT) e a sulfonamida (SUL), e sensíveis à piperacilina (PIP), à piperacilina/tazobactam (PPT), ao cefepime (CPM), ao aztreonam (ATM), ao ertapenem (ERT), ao meropenem (MER), à gentamicina (GEN) e à amicacina (AMI).

Todas as cepas de *Morganella morganii* apresentaram fenótipo característico do elemento SXT. O SXT14, albergado pela cepa 722/12, possui todos os genes de resistência tipicamente associados ao elemento SXT. Os elementos SXT18 e SXT36, apesar de não conter o gene *strA*, que

confere resistência a estreptomicina, expressa resistência à esse antibiótico, podendo significar que o gene *strB* esteja atuando. O elemento SXT8, apesar de possuir apenas o gene *sulII*, expressou resistência ao trimetoprim e à estreptomicina, sinalizando a existência de outros genes de resistência, não pesquisados. O perfil fenotípico de resistência, aos demais antibióticos avaliados, é mostrado no quadro 11.

Quadro 11: Perfil de resistência a antibióticos, apresentados por cepas de *Morganella morganii* positivas para a presença de elemento SXT.

SXT	CEPA	PERFIL FENOTÍPICO DE RESISTÊNCIA
8	716/12	AMP, AMC, CFZ, CFL, TET, DOX, IMP, <u>EST</u> (I), MH, <u>SXT</u> , <u>SUL</u> , <u>TRI</u>
18	726/12	AMP, AMC, CFZ, CFL, TET, DOX, APS, <u>EST</u> , MH(I), OFX(I), NAL(I), <u>SXT</u> , <u>SUL</u>
14	722/12	AMP, AMC, CFZ, CFL, TET, DOX, APS(I), IMP(I), <u>EST</u> , MH, CIP, LEV, OFX, NOR, NAL, <u>SXT</u> , <u>SUL</u> , <u>TRI</u> , <u>CLO</u>
36	744/12	AMP, AMC, CFZ, CFL, TET, DOX, APS, CTX, CFO, CAZ, <u>EST</u> , MH, CIP, LEV, OFX, NOR, NAL, <u>SXT</u> , <u>SUL</u> , <u>TRI</u> , <u>CLO</u>

Legenda: APS, ampicilina-sulbactam; CTX, cefotaxima; CFO, Cefoxitina; CAZ, ceftazidima; IMP, imipenem; EST, estreptomicina; MH, minociclina; CIP, ciprofloxacina; LEV, levofloxacina; OFX, ofloxacina; NOR, norfloxacina; NAL, ácido nalidíxico; SXT, co-trimoxazol; SUL, sulfonamida; TRI, Trimetoprim; CLO, cloranfenicol. Os antibióticos típicos do cassete de resistência do elemento SXT estão sublinhados. (I) resistência intermediária.

Todas as cepas de *Proteus* spp. se mostraram sensíveis ao meropenem (MER) e ao cefepime (CPM). Do modo geral se mostraram resistente às tetraciclina, com exceção de *P. vulgaris*, 721/12, albergando o elemento SXT3, que mostrou sensibilidade a tetraciclina e a doxiciclina, à despeito da resistência intrínseca do gênero *Proteus*.

As cepas pertencentes ao gênero *Proteus*, avaliados foram de maneira geral, resistentes ao grupo da fluoroquinolonas, ao sulfametoxazol e ao trimetoprim. O perfil fenotípico de resistência, aos demais antibióticos avaliados, é mostrado no quadro 12.

Quadro 12: Perfil de resistência a antibióticos, apresentados por cepas de *Proteus* spp. positivas para a presença de elemento SXT.

SXT	CEPA	PERFIL FENOTÍPICO DE RESISTÊNCIA
13	721/12	CPM, MER, AMP, PIP, CFZ, CFL, IMP, <u>SXT(I)</u> , <u>TRI</u>
43	751/12	CPM, MER, AMP(I), CFZ, IMP(I), TET, DOX, MH, <u>SUL</u>
47	755/12	CPM, MER, CFZ(I), <u>EST</u> , TET, DOX, MH, NAL, <u>SXT</u> , <u>SUL</u> , <u>TRI</u>
49	757/12	CPM, MER, AMC, CFZ(I), IMP(I), <u>EST</u> , TET, DOX, MH, CIP(I), <u>SUL</u> , <u>CLO</u>
42	750/12	CPM, MER, AMP, CFZ(I), ATM, GEN(I), TET, DOX, MH, CIP, LEV, OFX, NOR, NAL, <u>SXT</u> , <u>SUL</u> , <u>TRI</u> , <u>CLO</u>
46	754/12	CPM, MER, AMP, AMC, CFZ, CFL, IMP(I), GEN, TET, DOX, MH, CIP, OFX, NOR, NAL, <u>SXT</u> , <u>SUL</u> , <u>TRI</u> , <u>CLO(I)</u>
45	753/12	CPM, MER, AMP(I), CFZ, IMP, GEN, <u>EST(I)</u> , TET, DOX, MH, CIP(I), LEV, OFX, NOR, NAL, <u>SXT</u> , <u>SUL</u> , <u>TRI</u> , <u>CLO</u>
44	752/12	CPM, MER, AMP, PIP, AMC, APS, PPT, CFZ, CFL, CFO, CAZ, ERT, IMP, <u>EST</u> , TET, DOX, MH, CIP, LEV, OFX, NOR, <u>CLO</u>
24	732/12	CPM, MER, AMP, PIP, APS(I), CFZ, CFL, IMP(I), GEN, <u>EST</u> , TET, DOX, CIP, LEV(I), OFX, NOR, NAL, <u>SXT</u> , <u>SUL</u> , <u>TRI</u> , <u>CLO</u>
48	756/12	CPM, MER, AMP, AMC, APS, CFZ, CFL, CTX(I), CFO, CAZ(I), ATM, ERT(I), IMP, GEN(I), AMI, <u>EST</u> , TET, DOX, MH, CIP(I), LEV(I), OFX(I), NOR, NAL, <u>SXT</u> , <u>SUL</u> , <u>TRI</u>

Legenda: AMP, ampicilina; PIP, piperacilina; AMC, amoxicilina/clavulanato; APS, ampicilina/sulbactam; PPT, piperacilina/tazobactam; CFZ, cefazolina; CFL, cefalotina; CPM, cefepime; CTX, cefotaxima; CFO, Cefoxitina; CAZ, ceftazidima; ATM, aztreonam; ERT ertapenem; IMP, imipenem; GEN, gentamicina; AMI, amicacina; EST, estreptomicina; TET, tetraciclina DOX, doxiciclina; MH, minociclina; CIP, ciprofloxacina; LEV, levofloxacina; OFX, ofloxacina; NOR, norfloxacina; NAL, ácido nalidíxico; SXT, co-trimoxazol; SUL, sulfonamida; TRI, Trimetoprim; CLO, cloranfenicol. Os antibióticos típicos do cassete de resistência do elemento SXT estão sublinhados. (I) resistência intermediária.

Todas as cepas de *Providencia* spp. avaliadas, se mostraram sensíveis ao cefepime (CPM), à cefoxitina (CFO) e ao aztreonam (ATM). Todas as cepas se mostraram sensíveis à piperacilina (PIP) e à cefotaxima (CTX), exceto as cepas 749/12 e 731/12, que mostraram resistência intermediária, a PIP e CTX, respectivamente. Do mesmo modo, todas as cepas se mostraram sensíveis a piperacilina/tazobactam (PPT), ao ertapenem (ERT) e ao meropenem (MER), exceto a cepa 743/12, que se mostrou resistente ao PPT e a cepa 741/12 que se mostrou resistente ao ERT e MER.

Todas as cepas se mostraram resistentes à amoxicilina/clavulanato (AMC) e à cefalotina (CFL). Além disso, todas as cepas se mostraram resistentes à doxiciclina (DOX), à tetraciclina (TET) e ao cloranfenicol (CLO), exceto a cepa 749/12, que mostrou resistência intermediária à DOX e se mostrou sensível à TET e ao CLO. Adicionalmente, Todas as cepas se mostraram resistentes à ofloxacina (OFX), à norfloxacin (NOR), ao co-trimoxazol (SXT), a sulfonamida (SUL) e ao trimetoprim (TRI), exceto a cepa 725/12, que se mostrou sensível a todos esses antibióticos.

Apesar de todas as cepas se mostrarem resistentes ao co-trimoxazol, as cepas que albergam os elementos SXT32, SXT33, SXT34, SXT35, SXT37, SXT39, não apresentaram o gene *sulIII* ou *dfr18*, que conferem resistência ao sulfametoxazol e ao trimetoprim, respectivamente. Por outro lado, essas mesmas cepas se mostraram sensíveis à estreptomicina,

resultado coerente com a ausência do gene *strA*, pesquisado; com exceção da cepa 745/12, que alberga o elemento SXT37, que apresentou resistência intermediária à estreptomicina. O perfil fenotípico de resistência, aos antibióticos testados, é mostrado no quadro 13.

Dentro da família *Enterobacteriaceae*, os gêneros *Morganella*, *Proteus* e *Providencia* são membros da tribo *Proteeae*. Todos *Proteeae* são naturalmente resistentes a colistina e polimixina B. Em geral, cepas de *Morganella* são resistentes à eritromicina, penicilina, ampicilina e à cefalotina, e são geralmente sensíveis ao ácido nalidíxico, carbenicilina, aos aminoglicosídeos e cloranfenicol. Além disso, há uma variação de susceptibilidade entre as cepas desta tribo à sulfonamidas e tetraciclinas (LIVERMORE, et al., 2001).

Quadro 13: Perfil de resistência a antibióticos, apresentados por cepas de *Providencia* spp. positivas para a presença de elemento SXT.

SXT	CEPA	PERFIL FENOTÍPICO DE RESISTÊNCIA
17	725/12	AMP, AMC, APS, CFZ, CFL, IMP, TET, DOX, MH(I), <u>CLO</u>
40	748/12	AMC, APS(I), CFZ, CFL, TET, DOX, MH, CIP, OFX, NOR, NAL, <u>SXT</u> , <u>SUL</u> , <u>TRI</u> , <u>CLO</u>
34	742/12	AMC, APS, CFZ, CFL, IMP, TET, DOX, MH, CIP, LEV, OFX, NOR, <u>SXT</u> , <u>SUL</u> , <u>TRI</u> , <u>CLO</u>
39	747/12	AMP, AMC, APS, CFZ, CFL, TET, DOX, MH, CIP, OFX, NOR, NAL, <u>SXT</u> , <u>SUL</u> , <u>TRI</u> , <u>CLO</u>
32	740/12	AMC, APS, CFZ, CFL, IMP, TET, DOX, MH, CIP, LEV, OFX, NOR, NAL, <u>SXT</u> , <u>SUL</u> , <u>TRI</u> , <u>CLO</u>
35	743/12	AMP(I), AMC, APS, PPT, CFZ, CFL, TET, DOX, MH, CIP, OFX, NOR, NAL, <u>SXT</u> , <u>SUL</u> , <u>TRI</u> , <u>CLO</u>
38	746/12	AMP, AMC, CFL, CAZ, GEN, <u>EST</u> (I), TET, DOX, MH, CIP, OFX, NOR, NAL, <u>SXT</u> , <u>SUL</u> , <u>TRI</u> , <u>CLO</u>
16	724/12	AMP, AMC, CFL, IMP, <u>EST</u> (I), TET, DOX, MH, CIP, LEV, OFX, NOR, NAL, <u>SXT</u> , <u>SUL</u> , <u>TRI</u> , <u>CLO</u>
15	723/12	AMC, APS, CFZ, CFL, IMP, GEN, TET, DOX, MH, CIP, LEV, OFX, NOR, NAL, <u>SXT</u> , <u>SUL</u> , <u>TRI</u> , <u>CLO</u>
41	749/12	AMP, PIP(I), AMC, APS, CFZ, CFL, IMP(I), DOX(I), MH (I), CIP(I), OFX, NOR, NAL, <u>SXT</u> , <u>SUL</u> , <u>TRI</u>
12	720/12	AMP, AMC, CFL, CAZ(I), IMP, <u>EST</u> (I), TET, DOX, MH, CIP, LEV, OFX, NOR, NAL, <u>SXT</u> , <u>SUL</u> , <u>TRI</u> , <u>CLO</u>
9	717/12	AMP, AMC, APS, CFZ, CFL, IMP, TET, DOX, MH, CIP, LEV, OFX, NOR, NAL, <u>SXT</u> , <u>SUL</u> , <u>TRI</u> , <u>CLO</u>
10	718/12	
11	719/12	
21	729/12	AMP, AMC, CFL, IMP, AMI, <u>EST</u> , TET, DOX, MH, CIP, LEV, OFX, NOR, NAL, <u>SXT</u> , <u>SUL</u> , <u>TRI</u> , <u>CLO</u>
22	730/12	
23	731/12	AMP, AMC, CFL, CTX(I), IMP(I), <u>EST</u> (I), TET, DOX, MH, CIP, LEV, OFX, NOR, NAL, <u>SXT</u> , <u>SUL</u> , <u>TRI</u> , <u>CLO</u>
37	745/12	AMP, AMC, APS, CFZ, CFL, IMP(I), GEN, <u>EST</u> (I), TET, DOX, MH, CIP, OFX, NOR, NAL, <u>SXT</u> , <u>SUL</u> , <u>TRI</u> , <u>CLO</u>
33	741/12	AMP, AMC, APS, CFZ, CFL, ERT, IMP(I), MER, TET, DOX, MH, CIP, LEV, OFX, NOR, NAL, <u>SXT</u> , <u>SUL</u> , <u>TRI</u> , <u>CLO</u>

Legenda: AMP, ampicilina; PIP, piperacilina; AMC, amoxicilina/clavulanato; APS, ampicilina/sulbactam; PPT, piperacilina/tazobactam; CFZ, cefazolina; CFL, cefalotina; CTX, cefotaxima; CFO, Cefoxitina; CAZ, ceftazidima; ATM, aztreonam; ERT ertapenem; IMP, imipenem; GEN, gentamicina; AMI, amikacina; EST, estreptomicina; TET, tetraciclina DOX, doxiciclina; MH, minociclina; CIP, ciprofloxacina; LEV, levofloxacina; OFX, ofloxacina; NOR, norfloxacina; NAL, ácido nalidíxico; SXT, co-trimoxazol; SUL, sulfonamida; TRI, Trimetoprim; CLO, cloranfenicol. Os antibióticos típicos do cassete de resistência do elemento SXT estão sublinhados. (I) resistência intermediária.

Todas as cepas de *Vibrio* spp. se mostraram sensíveis à gentamicina (GEN), à amicacina (AMI), à tetraciclina (TET), à minociclina (MH), à levofloxacina (LEV), à ofloxacina (OFX), ao cloranfenicol (CLO) e a tigeciclina (TIG). Além disso, todas as cepas se mostraram sensíveis ao cefepime (CPM) e à ampicilina/sulbactam (APS), exceto a cepa 709/12 que apresentou respectivamente, resistência e resistência intermediária a esses antibióticos. Além do mais, todas as cepas foram sensíveis ao ertapenem (ERT) e ao meropenem, exceto as cepas 713/12 e 711/12, que se mostraram resistentes a esses antibióticos, respectivamente. Ainda, enquanto todas as cepas foram sensíveis à ciprofloxacina (CIP), a cepa 727/12, mostrou resistência intermediária à esse antibiótico.

As cepas que albergam os elementos SXT3 e SXT4 confirmaram a expressão do gene *sulII*. Da mesma forma, as cepas 727/12 e 728/12, confirmaram a presença do gene *dfr18*, nos elementos SXT19 e SXT20, expressando resistência ao trimetoprim. A cepa 727/12, ainda se mostrou resistente ao sulfametoxazol e à estreptomicina, apesar de não apresentar esses genes, podendo significar uma variedade não pesquisada desses genes ou a atuação de outros mecanismos de resistência. O mesmo pode ter ocorrido com a cepa 738/12, que alberga o elemento SXT30, tendo se mostrado resistente ao trimetoprim e à estreptomicina, sem ter amplificado esses genes.

As cepas 709/12, 714/12, 715/12, 735/12 e 737/12, que albergam os elementos SXT1, SXT6, SXT7, SXT27 e SXT29, respectivamente, apresentaram resistência discreta ao sulfametoxazol, sem no entanto,

mostrar a presença do gene *sulII*. O perfil fenotípico de resistência, aos antibióticos testados, é mostrado no quadro 14.

Perfil de sensibilidade a antibióticos apresentado por cepas positivas para a presença de elemento SXT, os genes pesquisados, bem como a origem de cada amostra, estão disponíveis no Anexo 5.

Quadro 14: Perfil de resistência a antibióticos, apresentados por cepas de *Vibrio* spp. e *Vibrio cholerae* positivas para a presença de elemento SXT.

SXT	CEPA	PERFIL FENOTÍPICO DE RESISTÊNCIA
1	709/12	AMP(I), PIP, APS(I), PPT(I), CFZ, CFL, CPM, ATM(I), <u>SUL</u> , ERI, OXA, RIF(I)
3	711/12	AMP, PIP(I), PPT(I), CFZ, CFL, CTX(I), <u>SUL</u> , ERI(I), OXA, RIF(I)
4	712/12	PPT(I), <u>SUL</u> , ERI, OXA, RIF
5	713/12	CFO(I), NOR, OXA
6	714/12	CFZ(I), <u>SUL</u> , OXA
25	733/12	CFZ(I), CFL(I), CFO(I), ATM(I), <u>SUL</u> , ERI, OXA, POL, RIF
26	734/12	AMP, PIP(I), CFZ(I), CTX(I), ATM(I), <u>EST</u> (I), <u>SUL</u> , <u>TRI</u> (I), ERI, MFX(I), OXA, RIF
28	736/12	CFZ(I), ERI(I), OXA, POL, RIF(I)
2	710/12	AMP, <u>EST</u> (I), ERI(I), OXA
7	715/12	AMP, <u>EST</u> (I), <u>SUL</u> , ERI(I), POL, RIF
19	727/12	AMP, PIP, CFZ, <u>EST</u> (I), CIP(I), NOR, NAL, <u>SXT</u> , <u>SUL</u> , <u>TRI</u> , ERI(I), MFX(I), OXA
20	728/12	AMP, NAL, <u>SXT</u> , <u>SUL</u> , <u>TRI</u> , ERI, MFX(I), OXA, RIF(I)
27	735/12	CFZ, CAZ(I), IMP(I), <u>EST</u> (I), <u>SUL</u> , ERI(I), OXA, POL, RIF
29	737/12	IMP, <u>EST</u> (I), NAL, <u>SUL</u> , MFX(I), OXA, RIF(I)
30	738/12	AMP, <u>EST</u> , <u>SXT</u> , <u>SUL</u> , <u>TRI</u> , ERI(I), OXA
31	739/12	AMP, NAL, OXA, RIF

Legenda: AMP, ampicilina; PIP, piperacilina; AMC, amoxicilina/clavulanato; APS, ampicilina/sulbactam; PPT, piperacilina/tazobactam; CFZ, cefazolina; CFL, cefalotina; CTX, cefotaxima; CFO, Cefoxitina; CAZ, ceftazidima; ATM, aztreonam; ERT ertapenem; IMP, imipenem; GEN, gentamicina; AMI, amicacina; EST, estreptomicina; TET, tetraciclina DOX, doxiciclina; MH, minociclina; CIP, ciprofloxacina; LEV, levofloxacina; OFX, ofloxacina; NOR, norfloxacina; NAL, ácido nalidíxico; SXT, co-trimoxazol; SUL, sulfonamida; TRI, Trimetoprim; CLO, cloranfenicol. Os antibióticos típicos do cassete de resistência do elemento SXT estão sublinhados. (I) resistência intermediária.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A resistência a antibióticos constitui atualmente um problema de grande impacto na Saúde Pública. O abuso na utilização de antibióticos na medicina humana e veterinária, e na agricultura, tem originado um incremento na diversidade de micro-organismos resistentes, refletindo em falha terapêutica (WHO, 2001).

Durante décadas o estudo da resistência a antibióticos vem focando o isolamento de patógenos no ambiente hospitalar e testemunhando o crescimento do número de patógenos multi-resistentes (GUPTA, 2007). Porém infecções comunitárias têm despertado a atenção devido à rápida disseminação de cepas resistentes e de genes de resistência entre humanos, animais e alimentos (ANGULO, 2004).

Os avanços nos estudos de biologia molecular permitem comprovar que o ambiente hospitalar é um nicho ecológico em constante intercâmbio genético com diversos outros. A maioria dos antibióticos disponíveis na clínica médica e veterinária tem origem em micro-organismos ambientais, portanto é natural que os genes de resistência também devam ter origem ambiental. Nos primórdios da quimioterapia, Waksman já havia observado o antagonismo microbiano, que é o papel ecológico primário do antibiótico, qual seja inibir o crescimento de competidores (GREENWOOD, 1998). Por essa razão a resistência aos antibióticos deve ser abordada também sob um

prisma ecológico, enfatizando os mecanismos que interferem na estrutura molecular e influenciam na adaptação dos micro-organismos, contribuindo para a biodiversidade.

A pressão seletiva de diversos agentes antibióticos pode favorecer a seleção de elementos genéticos móveis com elevada capacidade de circulação entre espécies bacterianas filogeneticamente distintas. A transferência horizontal parece ter um papel crucial na adaptação bacteriana aos nichos ecológicos específicos, na disseminação e na persistência de genes de resistência aos antibióticos no ambiente. A prevalência de determinados elementos móveis que carregam genes de resistência a antibióticos e sua ocorrência em distintas áreas geográficas, como por exemplo, o que ocorre com o elemento SXT, pode determinar a disseminação de um novo repertório de resistência a partir do êxito adaptativo dessas estirpes entre microrganismos comensais.

O conhecimento da interação entre bactérias e elementos de transmissão horizontal tem sido pouco explorado no Brasil. O conhecimento da evolução bacteriana nesse sentido é uma ferramenta importante para estabelecer estratégias eficazes de controle e tratamento de infecções, sem aumentar a pressão seletiva sobre os micro-organismos. Esse conhecimento é também uma ferramenta precisa para subsidiar estudos epidemiológicos.

Um elemento SXT, o ICE*PreBra*1, repetiu-se em duas cepas de *Providencia rettgeri* isoladas de amostras diferentes de esgoto. Isso pode sugerir que esse elemento está circulando no meio ambiente, porém uma

confirmação somente seria possível se houvessem mais achados do mesmo elemento, que proporcionassem significado estatístico. Uma caracterização definitiva dos elementos SXT encontrados no estudo somente será possível mediante sequenciamento completo das cepas. A descrição aqui exposta é apenas uma predição do perfil dos elementos encontrados.

6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, 48 elementos integrativos e conjugativos, ICEs pertencentes à família SXT/R391 estavam presentes dentre os isolados bacterianos estudados em amostras originárias do Brasil.

A identificação do ICE *VchBra1* demonstrou que ICEs pertencentes à família SXT/R391 estão circulando em nosso país desde 1994.

Dentre os ICEs pertencentes à família SXT/R391 brasileiros, foram identificados pelo menos 45 perfis diferentes, sendo que no mundo todo existem 51 sequências parciais e 14 completas, depositadas, do total de 89 ICEs registrados.

Foram identificados ICEs albergados por *Morganella morganii*, espécie nunca antes reportada na literatura associada ao ICE pertencente à família SXT/R391 .

O ICE *PreBra1* e o ICE *PreBra8*, observados em *Providencia rettgeri*, repetiram-se em duas amostras isoladas em locais e datas distintas, demonstrando a circulação desse perfil, no ambiente.

Comparando-se as características dos ICEs da família SXT/R391, obtidas no estudo, com os ICEs da mesma família disponíveis em banco de dados públicos, o elemento ICE *PreBra3* é o mais conservado, se comparado ao SXT^{MO10}.

Alguns pontos de amostragem apresentaram maior variedade de ICEs em diferentes espécies, como por exemplo, Congonhas, onde foi observada a presença do ICE*PreBra1* em *Providencia rettgeri*, ICE*PvuBra2* em *Proteus vulgaris* e ICE*MmoBra2* em *Morganella morganii*.

A resistência às diferentes classes de antibióticos, mesmo em bactérias comensais, que albergam elementos genéticos móveis é preocupante, do ponto de vista de Saúde Pública.

Considerando a presença do elemento SXT também em espécies de *Vibrio*, não *cholerae*, é apropriado dar também atenção à presença dessas bactérias no monitoramento de esgoto.

Será necessário o sequenciamento completo dos ICEs pertencentes à família SXT/R391, identificados no Brasil, para a caracterização definitiva destes elementos.

7. REFERÊNCIAS

- Aarestrup FM, Seyfarth AM, Emborg HD, Pedersen K, Hendriksen RS, Bager F. Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal enterococci from food animals in Denmark. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45(7): 2054-9.
- Ahmed AM, Shinoda S, Shimamoto T. A variant type of *Vibrio cholerae* SXT element in a multidrug-resistant strain of *Vibrio fluvialis*. *FEMS Microbiol Lett.* 2005; 242(2): 241-7.
- Albert MJ, Siddique AK, Islam MS, Faruque ASG, Ansaruzzaman M, Faruque SM, *et al.* Large outbreak of clinical cholera due to *Vibrio cholerae* non-O1 in Bangladesh. *Lancet.* 1993; 341: 704.
- Alterthum F. Mecanismo de ação dos antibacterianos e mecanismos de resistência. In Trabulsi LR, Alterthum F. *Microbiologia.* 5.ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2010. p. 79-85.
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1997; 25(17): 3389-402.
- Amita CSR, Thungapathra M, Ramamurthy T, Nair GB, Ghosh A. Class I integrons and SXT elements in El Tor strains isolated before and after

- 1992 *Vibrio cholerae* O139 outbreak, Calcutta, India. *Emerg Infect Dis.* 2003; 9(4): 500-2.
- Angulo FJ, Baker NL, Olsen SJ, Anderson A, Barrett TJ. Antimicrobial use in agriculture: controlling the transfer of antimicrobial resistance to humans. *Semin Pediatr Infect Dis.* 2004; 15(2):78-85.
- Anthony KG, Kathir P, Moore D, Ippen-Ihler K, Frost LS. Analysis of the *traLEKBP* sequence and the TraP protein from three F-like plasmids: F, R100-1 and ColB2. *J Bacteriol.* 1996; 178(11): 3194-200.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, *et al.* Short Protocols in Molecular Biology. USA: John Wiley & Sons; 1995.
- Baquero F, Martínez JL, Cantón R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr Opin Biotechnol.* 2008; 19(3): 260-5.
- Barbosa TM, Levy SB. The impact of antibiotic use on resistance development and persistence. *Drug Resist Updat.* 2000; 3(5): 303-311.
- Beaber J W, Burrus V, Hochhut B, Waldor MK. Comparison of SXT and R391, two conjugative integrating elements: definition of a genetic backbone for the mobilization of resistance determinants. *Cell Mol Life Sci.* 2002a; 59(12): 2065-70.
- Beaber JW, Hochhut B, Waldor MK. Genomic and functional analyses of SXT, an integrating antibiotic resistance gene transfer element derived from *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol.* 2002b; 184(15): 4259–69.

Beaber JW, Hochhut B, Waldor MK. SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes Nature. 2004; 427: 72-4.

Bhanumathi R, Sabeena F, Isac SR, Shukla BN, Singh DV. Molecular characterization of *Vibrio cholerae* O139 bengal isolated from water and the aquatic plant *Eichhornia crassipes* in the River Ganga, Varanasi, India. Appl Environ Microbiol. 2003; 69(4): 2389-94.

Bhattacharya MK, Bhattacharya SK, Garg S, Saha PK, Dutta D, Nair GB, *et al.* Outbreak of *Vibrio cholerae* non-O1 in India and Bangladesh. Lancet. 1993; 341: 1346-7.

Bik EM, Bunschoten AE, Gouw RD, Mooi FR. Genesis of the novel epidemic *Vibrio cholerae* O139 strain: evidence for horizontal transfer of genes involved in polysaccharide synthesis. EMBO. 1995; 14(2): 209-216.

Burrus V, Marrero J, Waldor MK. The current ICE age: biology and evolution of SXT-related integrating conjugative elements. Plasmid. 2006; 55(3):173-83.

Burrus V, Pavlovic G, Decaris B, Guedon G. Conjugative transposons: the tip of the iceberg. Mol Microbiol. 2002; 46(3): 601-10.

Burrus V, Quezada-Calvillo R, Marrero J, Waldor, MK. SXT-related integrating conjugative element in New World *Vibrio cholerae*. Appl Environ Microbiol. 2006b; 72(4): 3054-57.

Burrus V, Waldor MK. Control of SXT Integration and Excision. *J Bacteriol.* 2003; 185(17): 5045–54.

Burrus V, Waldor MK. Shaping bacterial genomes with integrative and conjugative elements. *Res Microbiol.* 2004; 155(5): 376-86.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Cholera Outbreak — Haiti, October 2010. *MMWR.* 2010; 59(43): 1411.

Ceccarelli D, Salvia AM, Sami J, Cappuccinelli P, Colombo MM. New cluster of plasmid-located class 1 integrons in *Vibrio cholerae* O1 and a *dfrA15* cassette-containing integron in *Vibrio parahaemolyticus* isolated in Angola. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50(7): 2493-9.

Ceccarelli D, Daccord A, René M, Burrus V. Identification of the origin of transfer (*oriT*) and a new gene required for mobilization of the SXT/R391 family of integrating conjugative elements. *J Bacteriol.* 2008; 190(15): 5328-38.

Ceccarelli D, Spagnoletti M, Bacciu D, Danin-Poleg Y, Mendiratta DK, Kashi Y, *et al.* ICE *VchInd5* is prevalent in epidemic *Vibrio cholerae* O1 El Tor strains isolated in India. *Int J Med Microbiol.* 2011; 301(4): 318-24.

Chapman PA, Ellin M, Ashton R, Shafique W. Comparison of culture, PCR and immunoassays for detecting *Escherichia coli* O157 following enrichment culture and immunomagnetic separation performed on

naturally contaminated raw meat products. *Int J Food Microbiol.* 2001; 68: 11–20.

Chin CS, Sorenson J, Harris JB, Robins WP, Charles RC, Jean-Charles RR, *et al.* The origin of the Haitian cholera outbreak strain. *N Engl J Med.* 2011; 364(1): 33-42.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute (NCCLS). Methods for antimicrobial dilution and susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria. Approved guideline. Second Edition. CLSI document M45-A2, Clinical Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne Pennsylvania 19087, USA, 2010.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute (NCCLS). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-first Informational Supplement. CLSI document M100-S23, Clinical Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne Pennsylvania 19087, USA, 2013.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute (NCCLS). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved Standard – eleventh edition. CLSI document M02 – A11, 2012.

Dalsgaard A, Forslund AN, Tam DX, Vinh DX, Cam PD: Cholera in Vietnam: changes in genotypes and emergence of class 1 integrons containing aminoglycoside resistance gene cassettes in *Vibrio cholerae* O1 strain isolated from 1979 to 1996. *J Clin Microbiol.* 1999; 37: 734-41.

Dalsgaard A, Forslund A, Sandvang D, Arntzen L, Keddy K. *Vibrio cholerae* O1 outbreak isolates in Mozambique and South Africa in 1998 are multiple-drug resistant, contain the SXT element and the *aadA2* gene located on class 1 integrons. J Antimicrob Chemother. 2001; 48(6): 827-838.

Ehara M, Nguyen BM, Nguyen DT, Toma C, Higa N, Iwanaga M. Drug susceptibility and its genetic basis in epidemic *Vibrio cholerae* O1 in Vietnam. Epidemiol Infect. 2004; 132(4): 595-600.

EUCAST - European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. V. 3.1,
February 11, 2013. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/Breakpoint_table_v_3.1.pdf

Felsenstein J. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. J. Mol. Evol. 1981; 17: 368-76.

Fleming A. On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. Br J Exp Pathol. 1929; 10: 226-36, Reprinted in: Rev. Infect. Dis. 1980; 2(1): 129-39 and Bull WHO. 2001; 79(8): 780-90.

Fleming A. Penicillin. Nobel Lecture, December 11, 1945.

Garriss G, Burrus V. Integrating Conjugative Elements of the SXT/R391 Family. In Roberts AP, Mullany P. Bacterial Integrative Mobile Genetic

Elements. Publisher: Landes Bioscience, Editors: Adam P. Roberts, Peter Mullany, 2013. p. 217-234. http://www.landesbioscience.com/pdf/13Roberts_Burrus.pdf (acessado em julho de 2013).

Glase JA. Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios. *Biotechniques*. 1995; 18(1): 62-3.

Greenwood D. Antibiotics and chemotherapeutic agents used in the therapy of bacterial infection. In: Collier L, Barlow A, Sussman M, eds. *Topley & Wilson's Microbiology and microbial infections*, ninth edn. London: Arnold, 1998. p.195–230.

Gupta V. An update on newer β -lactamases. *Indian J Med Res*. 2007; 126: 417-27.

Gyles CL. Antimicrobial resistance in selected bacteria from poultry. *Anim Health Res Rev*. 2008; 9(2): 149-58.

Hall RM, Collis CM. Antibiotic resistance in gram-negative bacteria: the role of gene cassettes and integrons. *Drug Resistance Updates*. 1998; 1: 109-19.

Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser*. 1999; 41: 95-8.

Hassani L, Imzilen B, Boussaid A, Gauthier MJ. Seasonal incidence of and antibiotic resistance among *Aeromonas* species isolated from domestic

wastewater before and after treatment in stabilization ponds. *Microbial Ecology*. 1992; 23: 227-37.

Hochhut B, Beaber JW, Woodgate R, Waldor MK. Formation of chromosomal tandem arrays of the SXT element and R391, two conjugative chromosomally integrating elements that share an attachment site. *J Bacteriol*. 2001a.; 183: 1124–1132.

Hochhut B, Lotfi Y, Mazel D, Faruque SM, Woodgate R, Waldor MK. Molecular analysis of antibiotic resistance gene clusters in *Vibrio cholerae* O139 and O1 SXT constins. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001b; 45(11): 2991-3000.

Hochhut B, Waldor MK. Site-specific integration of the conjugal *Vibrio cholerae* SXT element into *prfC*. *Mol Microbiol*. 1999; 32(1): 99-110.

Imzilin B, Lafdal YMO, Jana M. Effect of wastewater stabilization ponds on antimicrobial susceptibility and haemolysin occurrence among motile *Aeromonas* strains. *World J Microbiol Biotechnol*. 1996; 12: 385-90.

Iwanaga M, Toma C, Miyazato T, Insisiengmay S, Nakasone N, Ehara M. Antibiotic resistance conferred by a class 1 integron and SXT constin in *Vibrio cholerae* O1 strains isolated in Laos. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48: 2364–9.

- Jain R, Rivera MC, Moore JE, Lake JA. Horizontal gene transfer accelerates genome innovation and evolution. *Mol Biol Evol.* 2003; 20(10):1598-602.
- Janda JM, Abbott SL. Evolving concepts regarding the genus *Aeromonas*: an expanding panorama of species, disease presentations, and unanswered questions. *Clin Infect Dis.* 1998; 27: 332-44
- Kitiyodom S, Khemtong S, Wongtavatchai J, Chuanchuen R. Characterization of antibiotic resistance in *Vibrio* spp. isolated from farmed marine shrimps (*Penaeus monodon*). *FEMS Microbiol Ecol.* 2010; 72(2): 219-27.
- Levy SB. The Antibiotic Paradox. How the Misuse of Antibiotics Destroys Their Curative powers, 2nd ed. Perseus Publishing Services, Cambridge, MA, 2002.
- Livermore DM, Winstanley TG, Shannon KP. Interpretative reading: recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. *J Antimicrob Chemother.* 2001; 48 Suppl 1: 87-102.
- Livermore DM. Introduction: the challenge of multiresistance. *Int J Antimicrob Agents* 2007, 29 Suppl. 3 S1–S7
- Martínez JL. Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. *Science.* 2008; 321: 365-7.

- Marrero J, Waldor MK. The SXT/R391 family of integrative conjugative elements is composed of two exclusion groups. *J Bacteriol.* 2007; 189(8): 3302-5.
- Matté MH. Pesquisa de *Aeromonas* spp potencialmente patogênicas em alguns pontos da represa de Guarapiranga destinados à recreação e captação para abastecimento público. [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 1995.
- Mayer CCS. Detecção molecular e resistência a antimicrobianos no grupo *V. fluvialis* – *V. furnissii*. [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2010.
- McDermott PF, Walker RD, White DG. Antimicrobials: modes of action and mechanisms of resistance. *Int J Toxicol.* 2003; 22(2): 135-43.
- Mezrioui N, Baleux B. Resistance patterns of *E. coli* strains isolated from domestic sewage before and after treatment in both aerobic lagoon and activated sludge. *Water Resources.* 1994; 28(11): 2399-2406.
- Mira A, Klasson L, Andersson SGE. Microbial genome evolution: sources of variability. *Curr Opin Microbiol.* 2002, 5: 506–12.
- Mohapatra H, Mohapatra SS, Mantri CK, Colwell RR, Singh DV. *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 strains isolated before 1992 from Varanasi, India are multiple drug resistant, contain intSXT, *dfr18* and *aadA5* genes. *Environ Microbiol.* 2008; 10(4): 866-873.

- Murray MG, Thompson WF. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 1980; 8(19): 4321-4325.
- Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. *Microbiologia Médica*. 4^a. ed. Rio de Janeiro: Ed Guanabara/Koogan, 2004.
- Nair GB, Faruque SM, Bhuiyan NA, Kamruzzaman M, Siddique AK, Sack DA. New variants of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor with attributes of the classical biotype from hospitalized patients with acute diarrhea in Bangladesh. *J Clin Microbiol.* 2002; 40(9): 3296-9.
- Nair GB, Ramamurthy T, Bhattacharya SK, Mukhopadhyay AK, Garg S, Bhattacharya MK, *et al.* Spread of *Vibrio cholerae* O139 Bengal in India. *J Infect Dis.* 1994; 169: 1029-34.
- Ng LK, Martin I, Alfa M, Mulvey M. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. *Mol Cell Probes.* 2001; 15(4): 209-15.
- Norman A, Hansen LH, Sørensen SJ. Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2009; 364: 2275-89.
- Okoh AI, Igbinosa EO. Antibiotic susceptibility profiles of some *Vibrio* strains isolated from wastewater final effluents in a rural community of the Eastern Cape Province of South Africa. *BMC Microbiol.* 2010; 10: 143.
- Okonechnikov K, Golosova O, Fursov M, UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics.* 2012; 28: 1166–1167.

- Pavlov D, De Wet CM, Grabow WO, Ehlers MM. Potentially pathogenic features of heterotrophic plate count bacteria isolated from treated and untreated drinking water. *Int J Food Microbiol.* 2004; 92(3): 275-87.
- Pruesse E, Peplies J, Glöckner FO. SINA: accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. *Bioinformatics.* 2012; 28: 1823-9.
- Ramachandran D, Bhanumathi R, Singh DV. Multiplex PCR for detection of antibiotic resistance genes and the SXT element: application in the characterization of *Vibrio cholerae*. *J Med Microbiol.* 2007; 56: 346–351.
- Ramamurthy T, Garg S, Sharma R, Bhattacharya SK, Nair GB, Shimada T, *et al.* Emergence of novel strain of *Vibrio cholerae* with epidemic potential in southern and eastern India. *Lancet.* 1993; 341: 703–4.
- Saitou N, Imanishi T. Relative efficiencies of the Fitch-Margoliash, maximum-parsimony, maximum-likelihood, minimum-evolution, and neighbor-joining methods of phylogenetic tree construction in obtaining the correct tree. *Mol Biol Evol.* 1989; 6(5): 514-25.
- Song Y, Yu P, Li B, Pan Y, Zhang X, Cong J, *et al.* The mosaic accessory gene structures of the SXT/R391-like integrative and conjugative elements derived from *Vibrio* spp. isolated from aquatic products and environment in the Yangtze River Estuary, China. *BMC Microbiol.* 2013; 13: 214.

- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol and Evol.* 2007; 24: 1596-9.
- 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. *Mol Biol Evol.* 2011; 28: 2731-9.
- Tavares W. Manual de antibióticos e quimioterápicos antinfeciosos. 3ª. Ed. São Paulo (SP): Atheneu, 2002.
- Thompson FL, Hoste B, Vandemeulebroecke K, Swings J. Genomic diversity amongst *Vibrio* isolates from different sources determined by fluorescent amplified fragment length polymorphism. *System Appl Microbiol.* 2001; 24: 520-538.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 1994; 22: 4673-80.
- Toma C, Nakasone N, Song T, Iwanaga M. *Vibrio cholerae* SXT Element, Laos. *Emerg Infect Dis.* 2005; 11(2): 346-7.
- Toussaint A, Merlin C. Mobile Elements as a Combination of Functional Modules. *Plasmid.* 2002, 47(1): 26-35.

- Venieri D, Vantarakis A, Komninou G, Papapetropoulou M. Microbiological evaluation of bottled non-carbonated ("still") water from domestic brands in Greece. *Int J Food Microbiol*. 2006; 107(1): 68-72.
- Waldor MK, Mekalanos JJ. ToxR regulates virulence gene expression in non-O1 strains of *Vibrio cholerae* that cause epidemic cholera. *Infect Immun*. 1994; 62(1): 72–78.
- Waldor MK, Tschape H, Mekalanos JJ. A new type of conjugative transposon encodes resistance to sulfamethoxazole, trimethoprim, and streptomycin in *Vibrio cholerae* O139. *J Bacteriol*. 1996; 178: 4157–4165
- WHO (World Health Organization). Antibiotic resistance: synthesis of recommendations by expert policy groups. 2001. WHO/CDS/CSR/DRS/2001.10. In: <http://www.who.int/drugresistance/guidance/en/index.html>.
- Wozniak RAF, Fouts DE, Spagnoletti M, Colombo MM, Ceccarelli D, Garriss G, *et al*. Comparative ICE genomics: insights into the evolution of the SXT/R391 family of ICEs. *PLoS Genet*. 2009; 5(12): e1000786.
- Wright GD. Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic? *Curr Opin Microbiol*. 2010; 13: 589–594.
- Yamamoto T, Nair GB, Albert MJ, Parodi CC, Takeda Y. Survey of in vitro susceptibilities of *Vibrio cholerae* O1 and O139 to antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995; 39: 241–4.

Yokota T, Kuwahara S. Temperature-sensitive R plasmid obtained from naturally isolated drug-resistant *Vibrio cholerae* (biotype El Tor). Antimicrob Agents Chemother. 1977; 11(1): 13-20.

ANEXO 1 – Características dos elementos SXT encontrados no estudo, segundo presença e tamanho da região pesquisada.

Região amplificada	Tamanho do <i>amplicon</i> (pb)			Elemento SXT																
	A	B	C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
attL–xis	453	2.381	2.380	>A	B/C	>A	>A	B/C	-	B/C	B/C	-	-	-	-	-	-	-	-	B/C
s026–s027	408	ND	4.189	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	A	-	-	A
s043–traL	998	1.627	1096	C	B	C	C	-	-		B	C	C	C	C	C	C	C	C	C
traA–s054	2.069	1.354	7.021	C	B	-	>C	<B	<B	B	B	-	-	-	-	-	-	-	-	B
traN–s063	5567	9307	3047	<C	-	<C	<C	<C	-	-	-	A	A	A	-	C	A	A	A	-
s073–traF	5.992	9.587	1.885	<C	-	<C	<C	<C	A	~A	-	-	-	-	-	-	~4K	~4K	~4K	~4K
s002–xis *	1.526	1.528		+	-	+	-	+	+	+	+	>	>	>	>	>	>	>	>	+
s002–xis [§]		1532		+	+	+	+	+	+	+	-	~2K	~2K	~2K	~2K	~4K	~2K	~2K	~2K	+
traG–setC **	765		4.227	A/B	A/B	A/B	A/B	A/B	A/B	A/B	A/B	A/B	A/B	A/B	A/B	A/B	A/B	A/B	A/B	A/B
rumBA *	19.182	911		B/C	-	B/C	-	-	B/C	B/C	B/C	B/C	B/C	B/C	B/C	B/C	B/C	B/C	B/C	B/C

Legenda: A = tamanho do *amplicon* no SXT^{MO10} (*V. cholerae* O139, cepa MO10); B = tamanho do *amplicon* no ICE *VchMex1* (*V. cholerae* O139, cepa mexicana); C = tamanho do *amplicon* no R391 (*Providencia rettgeri*); – = região do elemento SXT ausente; *B e C possuem o mesmo n° de nucleotídeos; ** A e B possuem o mesmo n° de nucleotídeos; [§] região amplificada com iniciadores desenvolvidos para o estudo; K, mil pares de bases (pb); <, menor número de nucleotídeos que a variedade de SXT indicada; >, maior número de nucleotídeos que a variedade de SXT indicada.

Continua na página seguinte

Continuação

ANEXO 1 – Características dos elementos SXT encontrados no estudo, segundo presença e tamanho da região pesquisada.

Região amplificada	Tamanho do amplicon (bp)			Elemento SXT																
	A	B	C	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	
attL–xis	453	2.381	2.380	B/C	B/C	B/C	-	-	-	A	B/C	B/C	B/C	B/C	B/C	B/C	B/C	-	-	
s026–s027	408	ND	4.189	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
s043–traL	998	1.627	1096	B	B	B	C	C	C	C	-	<B	-	-	-	-	-	C	C	
traA–s054	2.069	1.354	7.021	B	B	B	A	-	-	A	A	A	-	A	A	-	A	-	-	
traN-s063	5567	9307	3047	-	-	-	A	A	A	<A	<C	<C	-	<C	>C	-	>C	A	<A	
s073–traF	5.992	9.587	1.885	-	-	~3K	~3K	A	~4K	~5K	A	C	-	A	-	-	-	~4K	~4K	
s002–xis *	1.526	1.528		+	+	+	>	>	>	+	-	+	-	-	+	+	+	-	-	
s002–xis [§]		1532		-	-	-	~2K	~2K	~2K	+	-	+	-	-	+	-	+	~2K	~2K	
traG–setC ^{**}	765	4.227		A/B	A/B	A/B	A/B	A/B	A/B	A/B	A/B	A/B	A/B	A/B	A/B	A/B	>A/B	A/B	A/B	
rumBA *	19.182	911		B/C	-	-	-	B/C	B/C	B/C	B/C	B/C	B/C	B/C	B/C	B/C	B/C	B/C	B/C	

Legenda: A = tamanho do *amplicon* no SXT^{MO10} (*V. cholerae* O139, cepa MO10); B = tamanho do *amplicon* no ICE *VchMex1* (*V. cholerae* O139, cepa mexicana); C = tamanho do *amplicon* no R391 (*Providencia rettgeri*); – = região do elemento SXT ausente; *B e C possuem o mesmo n° de nucleotídeos; ** A e B possuem o mesmo n° de nucleotídeos; [§] região amplificada com iniciadores desenvolvidos para o estudo; <, menor número de nucleotídeos que a variedade de SXT indicada; >, maior número de nucleotídeos que a variedade de SXT indicada.

Continua na página seguinte

Continuação

ANEXO 1 – Características dos elementos SXT encontrados no estudo, segundo ausência, presença e tamanho da região pesquisada.

Região amplificada	Tamanho do amplicon (bp)			Elemento SXT															
	A	B	C	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49
attL–xis	453	2.381	2.380	-	-	-	-	-	-	-	A	B/C	B/C	B/C	B/C	B/C	B/C	B/C	B/C
s026–s027	408	ND	4.189	-	-	A	-	-	-	-	-	A	A	A	A	A	A	A	A
s043–traL	998	1.627	1096	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
traA–s054	2.069	1.354	7.021	-	-	-	-	-	-	-	A	A	A	A	A	A	-	A	A
traN–s063	5567	9307	3047	A	A		A	-	-	A	-	A	-	C	A	-	<C	-	<C
s073–traF	5.992	9.587	1.885	~4K	~4K	~4K	~4K	~4K	~4K	~4K	-	~4K	~4K	~4K	~4K	~4K	~4K	~4K	~4K
s002–xis *	1.526	1.528		-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-
s002–xis [§]		1532		~2K	~2K	-	~2K	-	~2K	~2K	-	+	+	+	+	+	+	+	+
traG–setC **	765		4.227	A/B	A/B	A/B	A/B	A/B	A/B	A/B	C	A/B	A/B	A/B	A/B	A/B	A/B	A/B	A/B
rumBA *	19.182	911		B/C	B/C	B/C	B/C	B/C	B/C	B/C	B/C	B/C	B/C	B/C	B/C	-	-	-	-

Legenda: A = tamanho do *amplicon* no SXT^{MO10} (*V. cholerae* O139, cepa MO10); B = tamanho do *amplicon* no ICE *VchMex1* (*V. cholerae* O139, cepa mexicana); C = tamanho do *amplicon* no R391 (*Providencia rettgeri*); – = região do elemento SXT ausente; *B e C possuem o mesmo n° de nucleotídeos; ** A e B possuem o mesmo n° de nucleotídeos; [§] região amplificada com iniciadores desenvolvidos para o estudo; <, menor número de nucleotídeos que a variedade de SXT indicada; >, maior número de nucleotídeos que a variedade de SXT indicada.

ANEXO 2A – Perfil de sensibilidade a antibióticos obtidos a partir de teste de disco difusão, em cepas de *Morganella morganii* e *Proteus* spp. positivas para o elemento SXT, segundo tamanho do halo (mm).

SXT	8	14	18	36	13	43	47	48	49	42	44	45	46	24
Cepa antB	<i>M. morganii</i>				<i>P. vulgaris</i>					<i>P. mirabilis</i>				<i>P.p</i>
	716/12	722/12	726/12	744/12	721/12	751/12	755/12	756/12	757/12	750/12	752/12	753/12	754/12	732/12
AMP	0	0	0	0	0	14	24	0	25	0	0	14	9	0
PIP	26	24	25	22	17	30	30	25	29	30	0	30	32	17
AMC	0	0	0	0	18	24	18	11	18	18	12	24	0	18
APS	15	13	10	0	17	17	25	0	25	24	0	15	21	12
PPT	26	26	27	28	22	28	30	26	30	28	12	30	30	23
CFZ	0	0	0	0	8	19	21	7	22	22	0	20	0	0
CFL	0	0	0	0	0	23	25	0	23	20	0	24	0	0
CTX	32	30	30	18	36	27	36	24	30	28	28	34	36	30
CAZ	25	25	28	14	32	30	31	18	30	24	10	29	31	30
CPM	29	30	28	30	30	31	32	26	31	29	21	29	34	28
CFO	18	18	18	0	21	24	24	13	23	24	0	23	22	23
ATM	32	32	33	25	36	35	36	0	35	0	33	32	38	36
ERT	23	31	32	30	27	28	32	21	26	32	16	27	30	28
IMP	13	22	24	23	19	22	24	15	21	24	0	20	22	20
MER	30	30	30	31	28	27	30	25	29	30	27	25	28	27
GEN	19	16	20	17	18	18	19	13	19	13	18	0	0	11
AMI	21	21	23	20	21	21	23	12	6	21	22	18	19	21
EST	13	0	0	0	16	16	0	0	0	16	0	13	15	7
TET	8	7	0	0	18	8	7	0	0	7	8	7	7	9
DOX	0	0	0	0	16	0	0	0	0	0	0	0	0	10
MH	12	9	14	0	17	10	10	0	8	9	11	8	10	17
CIP	30	9	23	0	30	30	21	18	18	11	10	17	13	11
LEV	27	0	20	0	28	35	22	14	22	13	12	11	17	14
OFX	25	0	15	0	30	30	18	13	22	0	0	0	0	8
NOR	23	0	21	0	27	30	18	10	25	11	8	0	12	9
NAL	24	0	15	0	28	25	0	0	25	0	20	0	0	0
SXT	0	0	0	0	15	22	0	0	29	0	24	0	0	0
SUL	0	0	0	0	21	0	0	0	0	0	17	0	0	0
TRI	0	0	17	0	0	20	0	0	20	0	20	0	0	0
CLO	24	12	21	0	23	23	22	18	0	20	7	0	15	0

Legenda: *P.p.*, *Proteus penneri*; AMP, ampicilina; PIP, piperacilina; AMC, amoxicilina/clavulanato; APS, ampicilina/sulbactam; PPT, piperacilina/tazobactam; CFZ, cefazolina; CFL, cefalotina; CPM, cefepime; CTX, cefotaxima; CFO, ceftazidima; ATM, aztreonam; ERT, ertapenem; IMP, imipenem; MER, meropenem; GEN, gentamicina; AMI, amicacina; EST, estreptomicina; TET, tetraciclina; DOX, doxiciclina; MH, minociclina; CIP, ciprofloxacina; LEV, levofloxacina; OFX, ofloxacina; NOR, norfloxacina; NAL, ácido nalidíxico; SXT, trimetoprim/sulfonamida (co-trimoxazol); SUL, sulfonamida; TRI, trimetoprim; CLO, cloranfenicol.

ANEXO 2B – Perfil de sensibilidade a antibióticos obtidos a partir de teste de disco difusão, em cepas de *Providencia* spp. positivas para o elemento SXT, segundo tamanho do halo (mm).

SXT	9	10	11	12	15	16	17	21	22	23	32	33	34	35	37	38	39	40	41
Cepa antB	717/12	718/12	719/12	720/12	723/12	724/12	725/12	729/12	730/12	731/12	740/12	741/12	742/12	743/12	745/12	746/12	747/12	748/12	749/12
AMP	0	0	12	0	19	0	0	0	0	0	20	12	22	14	0	0	0	18	0
PIP	27	28	26	22	27	23	24	24	24	22	26	24	28	26	24	24	28	26	18
AMC	0	0	0	8	8	8	12	0	0	7	8	8	6	8	7	12	0	8	0
APS	0	0	10	17	10	17	0	16	17	20	10	8	10	7	0	18	0	12	8
PPT	27	28	25	25	29	26	24	30	30	30	26	24	28	6	24	28	28	26	28
CFZ	8	0	12	25	0	24	0	23	24	26	12	16	19	18	8	24	0	19	18
CFL	0	0	0	7	0	0	0	0	10	8	0	0	0	0	0	8	0	0	0
CTX	32	33	35	28	36	28	30	26	26	25	30	32	30	36	32	26	32	36	32
CAZ	30	28	28	20	30	24	28	23	26	23	26	30	24	30	26	2	28	30	30
CPM	30	30	30	32	36	36	31	30	34	30	32	32	32	34	30	34	32	32	30
CFO	23	22	23	23	24	23	23	24	25	26	24	24	24	24	20	24	22	25	24
ATM	35	32	34	32	36	36	36	30	32	32	34	34	30	36	32	32	36	38	36
ERT	33	30	31	30	32	35	30	37	34	34	30	8	30	26	30	26	30	30	32
IMP	16	17	16	17	16	18	13	16	16	22	16	22	16	23	22	23	24	24	22
MER	30	30	28	32	28	30	29	34	34	34	28	6	28	28	30	28	30	30	30
GEN	22	22	21	19	12	19	18	16	18	18	22	20	22	22	2	2	22	23	22
AMI	26	26	24	25	25	26	24	0	0	28	26	24	26	26	24	26	26	28	24
EST	16	16	16	14	16	12	16	10	10	14	16	16	16	18	14	14	16	17	18
TET	0	0	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	22
DOX	0	0	0	0	0	0	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12
MH	0	0	0	0	0	7	14	8	10	10	0	0	0	0	0	8	0	0	14
CIP	10	8	10	12	10	12	22	8	7	10	10	10	10	14	12	12	10	14	20
LEV	0	0	0	0	0	0	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16
OFX	0	0	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
NOR	0	0	12	0	0	0	19	0	0	0	10	0	8	10	8	7	8	12	8
NAL	0	0	0	0	0	0	23	0	0	0	0	0	25	0	0	0	0	0	0
SXT	0	0	0	0	0	0	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SUL	0	0	0	0	0	0	22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TRI	0	0	0	0	0	0	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CLO	8	10	10	12	10	9	7	10	12	8	8	0	12	8	0	10	10	12	28

Legenda: AMP, ampicilina; PIP, piperacilina; AMC, amoxicilina/clavulanato; APS, ampicilina/sulbactam; PPT, piperacilina/tazobactam; CFZ, cefazolina; CFL, cefalotina; CPM, cefepime; CTX, cefotaxima; CFO, ceftazidima; CAZ, ceftazidima; ATM, aztreonam; ERT, ertapenem; IMP, imipenem; MER, meropenem; GEN, gentamicina; AMI, amikacina; EST, estreptomicina; TET, tetraciclina; DOX, doxiciclina; MH, minociclina; CIP, ciprofloxacina; LEV, levofloxacina; OFX, ofloxacina; NOR, norfloxacina; NAL, ácido nalidíxico; SXT, trimetoprim/sulfonamida (co-trimoxazol); SUL, sulfonamida; TRI, trimetoprim; CLO, cloranfenicol.

ANEXO 2C – Perfil de sensibilidade a antibióticos obtidos a partir de teste de disco difusão, em cepas de *Vibrio* spp. e *Vibrio cholerae* positivas para o elemento SXT, segundo tamanho do halo (mm).

SXT	1	3	4	5	6	25	26	28	2	7	19	20	27	29	30	31
Cepa antB	<i>Vibrio</i> spp.								<i>Vibrio cholerae</i>							
	709/12	711/12	712/12	713/12	714/12	733/12	734/12	736/12	710/12	715/12	727/12	728/12	735/12	737/12	738/12	739/12
AMP	14	12	19	18	20	18	10	32	0	8	0	0	18	22	12	0
PIP	22	20	24	30	30	28	20	32	23	22	16	22	26	30	24	26
OXA	0	0	0	18	8	12	0	16	8	20	0	0	12	0	13	0
AMC	19	20	19	22	24	22	18	22	22	22	20	22	20	24	18	26
APS	12	16	18	19	20	18	20	22	24	22	16	18	18	22	24	22
PPT	20	20	18	32	30	28	26	35	34	32	26	30	26	30	32	36
CFZ	12	10	18	18	17	16	15	16	30	26	19	24	18	24	28	28
CFL	0	0	22	18	19	17	12	18	36	30	26	28	22	28	30	34
CTX	28	22	30	30	30	28	22	28	40	36	32	36	30	36	36	42
CAZ	24	22	26	24	24	24	22	26	34	30	26	28	20	22	24	34
CPM	24	24	28	24	24	22	22	24	36	32	28	32	28	30	30	36
CFO	20	20	19	16	18	16	18	18	30	30	24	26	20	24	30	30
ATM	20	22	24	24	22	20	18	22	30	30	26	30	22	28	30	34
ERT	24	28	26	28	30	30	32	28	36	32	28	30	24	30	30	32
IMP	20	20	24	21	23	22	30	20	26	26	24	24	22	5	26	24
MER	24	26	24	24	30	24	32	24	34	30	28	28	26	30	26	32
GEN	18	20	20	18	18	18	18	20	24	18	20	20	20	20	18	24
AMI	20	22	22	20	22	22	18	24	24	24	22	24	22	20	22	28
EST	17	16	16	16	18	16	12	19	14	14	14	16	14	14	8	18
TET	22	26	24	24	28	26	26	26	30	26	18	24	24	30	28	32
DOX	22	24	25	26	24	25	22	NR	30	24	24	26	24	26	22	34
MH	24	24	24	24	28	24	23	26	30	24	24	26	24	28	26	32
TIG	19	22	20	22	20	20	18	23	24	18	20	18	20	18	20	26

Legenda: AMP, ampicilina; PIP, piperacilina; AMC, amoxicilina/clavulanato; APS, ampicilina/sulbactam; PPT, piperacilina/tazobactam; CFZ, cefazolina; CFL, cefalotina; CPM, cefepime; CTX, cefotaxima; CFO, ceftazidima; CAZ, ceftazidima; ATM, aztreonam; ERT, ertapenem; IMP, imipenem; MER, meropenem; GEN, gentamicina; AMI, amicacina; EST, estreptomicina; TET, tetraciclina; DOX, doxiciclina; MH, minociclina; CIP, ciprofloxacina; LEV, levofloxacina; OFX, ofloxacina; NOR, norfloxacina; NAL, ácido nalidíxico; SXT, trimetoprim/sulfonamida (co-trimoxazol); SUL, sulfonamida; TRI, trimetoprim; CLO, cloranfenicol; ERI, eritromicina; FUR, furazolidona; MFX, moxifloxacina; OXA, oxacilina ; POL, polimixina B; RIF, rifampicina; TIG, tigeciclina.

Continua na página seguinte

ANEXO 2C (continuação)

SXT	1	3	4	5	6	25	26	28	2	7	19	20	27	29	30	31
Cepa antB	<i>Vibrio</i> spp.								<i>Vibrio cholerae</i>							
	709/12	711/12	712/12	713/12	714/12	733/12	734/12	736/12	710/12	715/12	727/12	728/12	735/12	737/12	738/12	739/12
CIP	26	24	24	30	30	30	26	30	36	30	18	22	30	24	30	26
LEV	24	24	26	32	30	30	22	26	36	30	18	18	24	24	30	24
OFX	20	22	24	28	30	29	18	28	32	30	20	16	28	19	28	23
NOR	22	24	24	26	30	28	24	28	32	26	12	18	26	22	30	24
MFX	24	24	22	32	30	26	18	26	30	28	18	18	26	19	30	24
NAL	24	26	24	30	32	28	24	26	36	30	0	0	30	0	30	10
SXT	24	26	24	24	24	24	20	26	30	26	0	0	24	24	0	32
SUL	20 ^a	18 ^a	12 ^a	18	18 ^a	8	12 ^a	18	18	18 ^a	0	0	18 ^a	18 ^a	0	30
TRI	22	24	22	18	20	20	14	23	28	22	0	0	22	26	8	32
CLO	26	32	30	30	30	28	32	30	36	30	18	18	30	31	30	36
ERI	12	16	12	18	20	12	10	16	16	14	14	0	14	18	16	18
FUR	22	24	24	24	26	24	18	24	29	24	20	22	25	24	24	30
POL	14	14	14	12	12	8	12	10	14	10	13	14	8	14	14	18
RIF	17	18	16	20	22	18	14	18	20	18	20	18	16	18	24	16

Legenda: AMP, ampicilina; PIP, piperacilina; AMC, amoxicilina/clavulanato; APS, ampicilina/sulbactam; PPT, piperacilina/tazobactam; CFZ, cefazolina, CFL, cefalotina; CPM, cefepime; CTX, cefotaxima; CFO, ceftazidima; CAZ, ceftazidima; ATM, aztreonam; ERT, ertapenem; IMP, imipenem; MER, meropenem; GEN, gentamicina; AMI, amicacina, EST, estreptomicina; TET, tetraciclina; DOX, doxiciclina; MH, minociclina; CIP, ciprofloxacina; LEV, levofloxacina; OFX, ofloxacina; NOR, norfloxacina; NAL, ácido nalidixico; SXT, trimetoprim/sulfonamida (co-trimoxazol); SUL, sulfonamida; TRI, trimetoprim; CLO, cloranfenicol; ERI, eritromicina; FUR, furazolidona; MFX, moxifloxacina; OXA, oxacilina ; POL, polimixina B; RIF, rifampicina; TIG, tigeciclina. (a) crescimento discreto (quase imperceptível).

ANEXO 3A – Perfil de sensibilidade a antibióticos obtidos a partir de teste de disco difusão, em cepas de *Morganella morganii* e *Proteus* spp. positivas para o elemento SXT, segundo resultados qualitativos interpretados como sensível, intermediário ou resistente.

SXT	8	14	18	36	13	43	47	48	49	42	44	45	46	24
Cepa antB	<i>M. morganii</i>				<i>P. vulgaris</i>					<i>P. mirabilis</i>				<i>P.p</i>
	716/12	722/12	726/12	744/12	721/12	751/12	755/12	756/12	757/12	750/12	752/12	753/12	754/12	732/12
AMP	R	R	R	R	R	I	S	R	S	R	R	I	R	R
PIP	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	R
AMC	R	R	R	R	S	S	S	R	R	S	R	S	R	S
APS	S	I	R	R	S	S	S	R	S	S	R	S	S	I
PPT	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
CFZ	R	R	R	R	R	R	I	R	I	I	R	I	R	R
CFL	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	R	S	R	R
CTX	S	S	S	R	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S
CAZ	S	S	S	R	S	S	S	I	S	S	R	S	S	S
CPM	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CFO	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S
ATM	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S
ERT	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	R	S	S	S
IMP	R	I	S	S	R	I	S	R	I	S	R	I	I	I
MER	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
GEN	S	S	S	S	S	S	S	I	S	I	S	R	R	R
AMI	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S
EST	I	R	R	R	S	S	R	R	R	S	R	I	S	R
TET	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
DOX	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R
MH	R	R	I	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S
CIP	S	R	S	R	S	S	S	I	I	R	R	I	R	R
LEV	S	R	S	R	S	S	S	I	S	R	R	R	S	I
OFX	S	R	I	R	S	S	S	I	S	R	R	R	R	R
NOR	S	R	S	R	S	S	S	R	S	R	R	R	R	R
NAL	S	R	I	R	S	S	R	R	S	R	S	R	R	R
SXT	R	R	R	R	I	S	R	R	S	R	S	R	R	R
SUL	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R
TRI	R	R	S	R	R	S	R	R	S	R	S	R	R	R
CLO	S	R	S	R	S	S	S	S	R	S	R	R	I	R

Legenda: *P.p*, *Proteus penneri*; AMP, ampicilina; PIP, piperacilina; AMC, amoxicilina/ clavulanato; APS, ampicilina/sulbactam; PPT, piperacilina/tazobactam; CFZ, cefazolina; CFL, cefalotina; CPM, cefepime; CTX, cefotaxima; CFO, ceftaxima; CAZ, ceftazidima; ATM, aztreonam; ERT, ertapenem; IMP, imipenem; MER, meropenem; GEN, gentamicina; AMI, amicacina; EST, estreptomicina; TET, tetraciclina; DOX, doxiciclina; MH, minociclina; CIP, ciprofloxacina; LEV, levofloxacina; OFX, ofloxacina; NOR, norfloxacina; NAL, ácido nalidíxico; SXT, trimetoprim/sulfonamida (co-trimoxazol); SUL, sulfonamida; TRI, trimetoprim; CLO, cloranfenicol. S, sensível; I, intermediário; R resistente.

ANEXO 3B – Perfil de sensibilidade a antibióticos obtidos a partir de teste de disco difusão, em cepas de *Providencia* spp. positivas para o elemento SXT, segundo resultados qualitativos interpretados como sensível, intermediário ou resistente.

SXT	9	10	11	12	15	16	17	21	22	23	32	33	34	35	37	38	39	40	41
Cepa	717/12	718/12	719/12	720/12	723/12	724/12	725/12	729/12	730/12	731/12	740/12	741/12	742/12	743/12	745/12	746/12	747/12	748/12	749/12
antB																			
AMP	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	S	I	R	R	R	S	R
PIP	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
AMC	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
APS	R	R	R	S	R	S	R	S	S	S	R	R	R	R	R	S	R	I	R
PPT	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
CFZ	R	R	R	S	R	S	R	S	S	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R
CFL	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
CTX	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CAZ	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
CPM	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CFO	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ATM	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ERT	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
IMP	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	I	R	S	I	S	S	S	I
MER	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
GEN	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S
AMI	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
EST	S	S	S	I	S	I	S	R	R	I	S	S	S	S	I	I	S	S	S
TET	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S
DOX	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I
MH	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I
CIP	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I
LEV	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I
OFX	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
NOR	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
NAL	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R
SXT	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
SUL	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
TRI	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
CLO	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S

Legenda: AMP, ampicilina; PIP, piperacilina; AMC, amoxicilina/clavulanato; APS, ampicilina/sulbactam; PPT, piperacilina/tazobactam; CFZ, cefazolina, CFL, cefalotina; CPM, cefepime; CTX, cefotaxima; CFO, ceftazidima; CAZ, ceftazidima; ATM, aztreonam; ERT, ertapenem; IMP, imipenem; MER, meropenem; GEN, gentamicina; AMI, amikacina, EST, estreptomicina; TET, tetraciclina; DOX, doxiciclina; MH, minociclina; CIP, ciprofloxacina; LEV, levofloxacina; OFX, ofloxacina; NOR, norfloxacina; NAL, ácido nalidíxico; SXT, trimetoprim/sulfonamida (co-trimoxazol); SUL, sulfonamida; TRI, trimetoprim; CLO, cloranfenicol. S, sensível; I, intermediário; R resistente.

ANEXO 3C – Perfil de sensibilidade a antibióticos obtidos a partir de teste de disco difusão, em cepas de *Vibrio* spp. e *Vibrio cholerae* positivas para o elemento SXT, segundo resultados qualitativos interpretados como sensível, intermediário ou resistente.

SXT	1	3	4	5	6	25	26	28	2	7	19	20	27	29	30	31
Cepa	<i>Vibrio</i> spp.								<i>Vibrio cholerae</i>							
	709/12	711/12	712/12	713/12	714/12	733/12	734/12	736/12	710/12	715/12	727/12	728/12	735/12	737/12	738/12	739/12
antB																
AMP	I	R	S	S	S	S	R	S	R	R	R	R	S	S	R	R
PIP	R	I	S	S	S	S	I	S	S	S	R	S	S	S	S	S
OXA	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R
AMC	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
APS	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
PPT	I	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CFZ	R	R	S	S	I	I	I	I	S	S	R	S	R	S	S	S
CFL	R	R	S	S	S	I	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CTX	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CAZ	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S
CPM	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CFO	S	S	S	I	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ATM	I	S	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ERT	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
IMP	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	R	S	S
MER	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
GEN	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
AMI	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
EST	S	S	S	S	S	S	I	S	I	I	I	S	I	I	R	S
TET	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
DOX	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
MH	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
TIG	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Legenda: AMP, ampicilina; PIP, piperacilina; AMC, amoxicilina/clavulanato; APS, ampicilina/sulbactam; PPT, piperacilina/tazobactam; CFZ, cefazolina; CFL, cefalotina; CPM, cefepime; CTX, cefotaxima; CFO, ceftoxitina; CAZ, ceftazidima; ATM, aztreonam; ERT, ertapenem; IMP, imipenem; MER, meropenem; GEN, gentamicina; AMI, amicacina, EST, estreptomicina; TET, tetraciclina; DOX, doxiciclina; MH, minociclina; CIP, ciprofloxacina; LEV, levofloxacina; OFX, ofloxacina; NOR, norfloxacina; NAL, ácido nalidíxico; SXT, trimetoprim/sulfonamida (co-trimoxazol); SUL, sulfonamida; TRI, trimetoprim; CLO, cloranfenicol; ERI, eritromicina; FUR, furazolidona; MFX, moxifloxacina; OXA, oxacilina; POL, polimixina B; RIF, rifampicina; TIG, tigeciclina. S, sensível; I, intermediário; R resistente.

Continua na página seguinte

ANEXO 3C (continuação)

SXT	1	3	4	5	6	25	26	28	2	7	19	20	27	29	30	31
Cepa	<i>Vibrio</i> spp.								<i>Vibrio cholerae</i>							
	709/12	711/12	712/12	713/12	714/12	733/12	734/12	736/12	710/12	715/12	727/12	728/12	735/12	737/12	738/12	739/12
antB																
CIP	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S
LEV	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
OFX	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
NOR	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
MFX	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	I	I	S	I	S	S
NAL	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	R	S	R
SXT	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	S
SUL	R ^a	R ^a	R	S	R ^a	R	R	S	S	R ^a	R	R	R ^a	R ^a	R	S
TRI	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	R	R	S	S	R	S
CLO	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
ERI	R	I	R	I	I	R	R	I	I	I	I	R	I	I	I	I
FUR	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
POL	S	S	S	S	S	R	S	R	S	R	S	S	R	S	S	S
RIF	I	I	R	S	S	I	R	I	S	I	S	I	R	I	S	R

Legenda: AMP, ampicilina; PIP, piperacilina; AMC, amoxicilina/clavulanato; APS, ampicilina/sulbactam; PPT, piperacilina/tazobactam; CFZ, cefazolina; CFL, cefalotina; CPM, cefepime; CTX, cefotaxima; CFO, ceftazidima; CAZ, ceftazidima; ATM, aztreonam; ERT, ertapenem; IMP, imipenem; MER, meropenem; GEN, gentamicina; AMI, amikacina; EST, estreptomicina; TET, tetraciclina; DOX, doxiciclina; MH, minociclina; CIP, ciprofloxacina; LEV, levofloxacina; OFX, ofloxacina; NOR, norfloxacina; NAL, ácido nalidíxico; SXT, trimetoprim/sulfonamida (co-trimoxazol); SUL, sulfonamida; TRI, trimetoprim; CLO, cloranfenicol; ERI, eritromicina; FUR, furazolidona; MFX, moxifloxacina; OXA, oxacilina; POL, polimixina B; RIF, rifampicina; TIG, tigeciclina. S, sensível; I, intermediário; R resistente. (a) crescimento discreto (quase imperceptível).

ANEXO 4 – Critério utilizado para avaliação do perfil de sensibilidade a antibióticos obtidos a partir de teste de disco difusão, segundo antibiótico utilizado e documento de recomendação.

Antibiótico/sigla		Critério de interpretação - diâmetro da zona (mm)					
		M45-A2(2010) fastidiosos		CLSI M100-S23 Enterobactérias		Eucast (2013) Enterobactérias	
		S	R	S	R	S	R
Ácido Nalidíxico	NAL	-	-	≥19	≤13	NA	NA
Amicacina	AMI	≥17	≤14	≥17	≤14	≥16	<13
Amoxicilina/Clavulanato	AMC	≥18	≤13	≥18	≤13	≥17	<17
Ampicilina	AMP	≥17	≤13	≥17	≤13	≥14	<14
Ampicilina-Sulbactam	APS	≥15	≤11	≥15	≤11	≥14	<14
Aztreonam	ATM	-	-	≥21	≤17	≥24	<21
Cefalotina	CFL	-	-	≥18	≤14	NC	NC
Cefazolina	CFZ	-	-	≥23	≤19	-	-
Cefepime	CPM	≥18	≤14	≥18	≤14	≥24	<21
Cefotaxima	CTX	≥26	≤22	≥26	≤22	≥20	<17
Cefoxitina	CFO	≥18	≤14	≥18	≤14	≥19	<19
Ceftazidima	CAZ	≥21	≤17	≥21	≤17	≥22	<19
Ciprofloxacina	CIP	≥21	≤15	≥21	≤15	≥22	<19
Cloranfenicol	CLO	≥18	≤12	≥18	≤12	≥17	<17
Doxiciclina	DOX	-	-	≥14	≤10	-	-
Ertapenem	ERT	-	-	≥22	≤18	≥25	<22
Estreptomicina	EST	-	-	≥15	≤11	NA	NA
Gentamicina	GEN	≥15	≤12	≥15	≤12	≥17	<14
Imipenem	IMP	≥16	≤13	≥23	≤19	≥22	<16
Levofloxacina	LEV	≥17	≤13	≥17	≤13	≥22	<19
Meropenem	MER	≥16	≤13	≥23	≤19	≥22	<16
Minociclina	MH	-	-	≥16	≤12	-	-
Norfloxacina	NOR	-	-	≥17	≤12	≥22	<19
Ofloxacina	OFX	≥16	≤12	≥16	≤12	≥22	<19
Piperaciclina/Tazobactam	PPT	≥21	≤17	≥21	≤17	≥20	<17
Piperaciclina	PIT	≥21	≤17	≥21	≤17	≥20	<17
Sulfametaxazol/Trimetoprim	SXT	≥16	≤10	≥16	≤10	≥16	<13
Sulfonamidas	SUL	≥17	≤12	≥17	≤12	NC	NC
Tetraciclina	TET	≥15	≤11	≥15	≤11	-	-
Trimetoprim	TRI	-	-	≥16	≤10	≥18	<15
Eritomicina ^a	ERI	≥23	≤13	-	-	-	-
Furazolidona ^b	FRX	≥18	<18	-	-	NC	NC
Moxifloxacina ^c	MXF	-	-	-	-	≥20	<17
Oxacilina ^d	OXA	>20	<20	-	-	-	-
Polimixina B ^e	POL	≥11	≤12	-	-	NC	NC
Rifampicina ^a	RIF	≥16	≤20	-	-	-	-
Tigeciclina ^c	TIG	≥18	<15	-	-	≥18	<15

(a) Critério CLSI M100-S23 para *Staphylococcus* spp.

(b) Recomendação OMS, CDC.

(c) Critério EUCAST 2013 para enterobactérias.

(d) Critério CLSI M100-S23 para *Staphylococcus* spp. (MIC).

(e) Critério CLSI M100-S23 para *Pseudomonas aeruginosa*.

ANEXO 5: Perfil de sensibilidade a antibióticos apresentado por cepas positivas para a presença de elemento SXT segundo origem da amostra, organismo, genótipo e fenótipo.

Origem	N° SXT	ICE	Organismo	Perfil de Resistência a antibióticos	
				Genótipo	Fenótipo
Camaçari – BA	1	ICE VflBra1	<i>Vibrio fluvialis</i>	<i>sulIII, dfrA1</i>	AMP(I), PIP, APS(I), PPT(I), CFZ, CFL, CPM, CAZ, ATM(I), <u>SUL</u> , ERI, OXA, RIF(I)
EE José Menino, Santos	2	ICE VchBra1	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>sulIII</i>	AMP, <u>EST</u> (I), ERI(I), OXA
Camaçari – BA	3	ICE VflBra2	<i>Vibrio fluvialis</i>	<i>sulIII</i>	AMP, PIP(I), PPT(I), CFZ, CFL, CTX(I), ATM, MER, <u>SUL</u> , ERI(I), OXA
Valença – BA	4	ICE VflBra3	<i>Vibrio fluvialis</i>	<i>sulIII</i>	PPT(I), CAZ, <u>SUL</u> , ERI, OXA, RIF
Mangue, Cubatão	5	ICE VflBra4	<i>Vibrio fluvialis</i>	<i>sulIII</i>	CFO(I), ERT, NOR, OXA
	6	ICE VnaBra1	<i>Vibrio navarrensis</i>	-	AMC, CFZ(I), <u>SUL</u> , FUR, OXA
Rio Tietê, São Paulo	7	ICE VchBra2	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>sulIII</i> ,	AMP, <u>EST</u> (I), <u>SUL</u> , ERI(I), POL, RIF
EE Rebouças, Santos	8	ICE MmoBra1	<i>Morganella morganii</i>	<i>sulIII, dfrA18, dfrA1</i>	AMP, AMC, CFZ, CFL, TET, DOX, IMP, <u>EST</u> (I), MH, <u>SXT</u> , <u>SUL</u> , <u>TRI</u>
AE Congonhas, S. Paulo	9, 10 e 11	ICE PreBra1	<i>Providencia rettgeri</i>	<i>sulIII, dfrA18, dfrA1</i>	AMP, AMC, APS, CFZ, CFL, IMP, TET, DOX, MH, CIP, LEV, OFX, NOR, NAL, <u>SXT</u> , <u>SUL</u> , <u>TRI</u> , <u>CLO</u>
			<i>Providencia rettgeri</i>	<i>sulIII, dfrA18, dfrA1</i>	AMP, AMC, CFL, CAZ(I), IMP, <u>EST</u> (I), TET, DOX, MH, CIP, LEV, OFX, NOR, NAL, <u>SXT</u> , <u>SUL</u> , <u>TRI</u> , <u>CLO</u>
		ICE PvuBra1	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>sulIII, strA, strB, dfrA18, dfrA1, floR</i>	CPM, MER, AMP, PIP, CFZ, CFL, IMP, <u>SXT</u> (I), <u>TRI</u>
		ICE MmoBra2	<i>Morganella morganii</i>	<i>sulIII, strA, dfrA18, dfrA1, floR</i>	AMP, AMC, CFZ, CFL, TET, DOX, APS(I), IMP(I), <u>EST</u> , MH, CIP, LEV, OFX, NOR, NAL, <u>SXT</u> , <u>SUL</u> , <u>TRI</u> , <u>CLO</u>
		ICE PreBra1	<i>Providencia rettgeri</i>	<i>sulIII, dfrA18, dfrA1</i>	AMC, APS, CFZ, CFL, IMP, GEN, TET, DOX, MH, CIP, LEV, OFX, NOR, NAL, <u>SXT</u> , <u>SUL</u> , <u>TRI</u> , <u>CLO</u>
AE Cumbica, Guarulhos	16	ICE PreBra1	<i>Providencia rettgeri</i>	<i>sulIII, dfrA18, dfrA1</i>	AMP, AMC, CFL, IMP, <u>EST</u> (I), TET, DOX, MH, CIP, LEV, OFX, NOR, NAL, <u>SXT</u> , <u>SUL</u> , <u>TRI</u> , <u>CLO</u>
	17	ICE PreBra2	<i>Providencia rettgeri</i>	<i>dfr18, dfrA1</i>	AMP, AMC, APS, CFZ, CFL, IMP, TET, DOX, MH(I), <u>CLO</u>
TR Barra Funda, S. Paulo	18	ICE MmoBra3	<i>Morganella morganii</i>	<i>sulIII, dfrA18</i>	AMP, AMC, CFZ, CFL, TET, DOX, APS, <u>EST</u> , MH(I), OFX(I), NAL(I), <u>SXT</u> , <u>SUL</u>
	19	ICE VchBra3	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>dfr18</i>	AMP, PIP, CFZ, ATM, <u>EST</u> (I), CIP(I), NOR, NAL, <u>SXT</u> , <u>SUL</u> , <u>TRI</u> , ERI(I), MFX(I), OXA
	20	ICE VchBra4	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>dfr18</i>	AMP, NAL, <u>SXT</u> , <u>SUL</u> , <u>TRI</u> , ERI, MFX(I), OXA, RIF(I)
AE Congonhas, S. Paulo	21	ICE PreBra3	<i>Providencia rettgeri</i>	<i>sulIII, strA, strB, dfrA18, dfrA1</i>	AMP, AMC, CFL, IMP, AMI, <u>EST</u> , TET, DOX, MH, CIP, LEV, OFX, NOR, NAL, <u>SXT</u> , <u>SUL</u> , <u>TRI</u> , <u>CLO</u>
	22	ICE PreBra4	<i>Providencia rettgeri</i>	<i>sulIII, dfr18, dfrA1</i>	
	23	ICE PreBra5	<i>Providencia rettgeri</i>	<i>sulIII, dfr18, dfrA1</i>	AMP, AMC, CFL, CTX(I), IMP(I), <u>EST</u> (I), TET, DOX, MH, CIP, LEV, OFX, NOR, NAL, <u>SXT</u> , <u>SUL</u> , <u>TRI</u> , <u>CLO</u>
AE Cumbica, Guarulhos Porto, Santos	24	ICE PpeBra1	<i>Proteus penneri</i>	<i>sulIII, strA, strB, dfrA18, dfrA1, floR</i>	CPM, MER, AMP, PIP, APS(I), CFZ, CFL, IMP(I), GEN, <u>EST</u> , TET, DOX, CIP, LEV(I), OFX, NOR, NAL, <u>SXT</u> , <u>SUL</u> , <u>TRI</u> , <u>CLO</u>
	25	ICE VnaBra2	<i>Vibrio navarrensis</i>	-	AMC, CFZ(I), CFL(I), CFO(I), ATM(I), <u>SUL</u> , ERI, FUR, OXA, POL, RIF
	26	ICE VpaBra1	<i>V. parahaemolyticus</i>	-	AMP, PIP(I), CFZ(I), CTX(I), ATM(I), <u>EST</u> (I), <u>SUL</u> , <u>TRI</u> (I), ERI, MFX(I), OXA, RIF
	27	ICE VchBra5	<i>Vibrio cholerae</i>	-	CFZ, CAZ(I), IMP(I), <u>EST</u> (I), <u>SUL</u> , ERI(I), OXA, POL, RIF
	28	ICE VnaBra3	<i>Vibrio navarrensis</i>	-	CFZ(I), ERI(I), OXA, POL, RIF(I)
EE Rebouças, Santos	29	ICE VchBra6	<i>Vibrio cholerae</i>	-	IMP, <u>EST</u> (I), NAL, <u>SUL</u> , MFX(I), OXA, RIF(I)
	30	ICE VchBra7	<i>Vibrio cholerae</i>	<i>sulIII</i>	AMP, <u>EST</u> , <u>SXT</u> , <u>SUL</u> , <u>TRI</u> , ERI(I), OXA
	31	ICE VchBra8	<i>Vibrio cholerae</i>	-	AMP, IMP, NAL, OXA, RIF
AE Congonhas, S. Paulo	32	ICE PreBra6	<i>Providencia rettgeri</i>	<i>dfrA1</i>	AMC, APS, CFZ, CFL, IMP, TET, DOX, MH, CIP, LEV, OFX, NOR, NAL, <u>SXT</u> , <u>SUL</u> , <u>TRI</u> , <u>CLO</u>
	33	ICE PreBra7	<i>Providencia rettgeri</i>	<i>dfrA1</i>	AMP, AMC, APS, CFZ, CFL, ERT, IMP(I), MER, TET, DOX, MH, CIP, LEV, OFX, NOR, NAL, <u>SXT</u> , <u>SUL</u> , <u>TRI</u> , <u>CLO</u>
	34		<i>Providencia rettgeri</i>	<i>dfrA1</i>	AMC, APS, CFZ, CFL, IMP, TET, DOX, MH, CIP, LEV, OFX, NOR, <u>SXT</u> , <u>SUL</u> , <u>TRI</u> , <u>CLO</u>
	35		<i>Providencia rettgeri</i>	<i>dfrA1</i>	AMP(I), AMC, APS, PPT, CFZ, CFL, TET, DOX, MH, CIP, OFX, NOR, NAL, <u>SXT</u> , <u>SUL</u> , <u>TRI</u> , <u>CLO</u>
	36	ICE MmoBra4	<i>Morganella morganii</i>	<i>sulIII, dfrA1</i>	AMP, AMC, CFZ, CFL, TET, DOX, APS, CTX, CFO, CAZ, <u>EST</u> , MH, CIP, LEV, OFX, NOR, NAL, <u>SXT</u> , <u>SUL</u> , <u>TRI</u> , <u>CLO</u>
	37	ICE PreBra7	<i>Providencia rettgeri</i>	<i>dfrA1</i>	AMP, AMC, APS, CFZ, CFL, IMP(I), GEN, <u>EST</u> (I), TET, DOX, MH, CIP, OFX, NOR, NAL, <u>SXT</u> , <u>SUL</u> , <u>TRI</u> , <u>CLO</u>
	38	ICE PreBra8	<i>Providencia rettgeri</i>	<i>sulIII, strA</i>	AMP, AMC, CFL, CAZ, GEN, <u>EST</u> (I), TET, DOX, MH, CIP, OFX, NOR, NAL, <u>SXT</u> , <u>SUL</u> , <u>TRI</u> , <u>CLO</u>
	39	ICE PreBra7	<i>Providencia rettgeri</i>	<i>dfrA1</i>	AMP, AMC, APS, CFZ, CFL, TET, DOX, MH, CIP, OFX, NOR, NAL, <u>SXT</u> , <u>SUL</u> , <u>TRI</u> , <u>CLO</u>
TR Tietê, São Paulo	40	ICE PreBra8	<i>Providencia rettgeri</i>	<i>sulIII, dfrA1</i>	AMC, APS(I), CFZ, CFL, TET, DOX, MH, CIP, OFX, NOR, NAL, <u>SXT</u> , <u>SUL</u> , <u>TRI</u> , <u>CLO</u>
	41	ICE PreBra9	<i>Providencia rettgeri</i>	<i>sulIII</i>	AMP, PIP(I), AMC, APS, CFZ, CFL, IMP(I), DOX(I), MH (I), CIP(I), OFX, NOR, NAL, <u>SXT</u> , <u>SUL</u> , <u>TRI</u>
Mercado, São Paulo	42	ICE PmiBra1	<i>Proteus mirabilis</i>	-	CPM, MER, AMP, CFZ(I), ATM, GEN(I), TET, DOX, MH, CIP, LEV, OFX, NOR, NAL, <u>SXT</u> , <u>SUL</u> , <u>TRI</u> , <u>CLO</u>
	43	ICE PvuBra2	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>dfrA1</i>	CPM, MER, AMP(I), CFZ, IMP(I), TET, DOX, MH, <u>SUL</u>
	44	ICE PmiBra2	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>dfrA1</i>	CPM, MER, AMP, PIP, AMC, APS, PPT, CFZ, CFL, CFO, CAZ, ERT, IMP, <u>EST</u> , TET, DOX, MH, CIP, LEV, OFX, NOR, <u>CLO</u>
	45		<i>Proteus mirabilis</i>	-	CPM, MER, AMP(I), CFZ, IMP, GEN, <u>EST</u> (I), TET, DOX, MH, CIP(I), LEV, OFX, NOR, NAL, <u>SXT</u> , <u>SUL</u> , <u>TRI</u> , <u>CLO</u>
	46	ICE PmiBra3	<i>Proteus mirabilis</i>	-	CPM, MER, AMP, AMC, CFZ, CFL, IMP(I), GEN, TET, DOX, MH, CIP, OFX, NOR, NAL, <u>SXT</u> , <u>SUL</u> , <u>TRI</u> , <u>CLO</u> (I)
	47	ICE PvuBra3	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>sulIII, strA, strB, dfrA1</i>	CPM, MER, CFZ(I), <u>EST</u> , TET, DOX, MH, NAL, <u>SXT</u> , <u>SUL</u> , <u>TRI</u>
	48	ICE PvuBra4	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>dfrA1</i>	CPM, MER, AMP, AMC, APS, CFZ, CFL, CTX(I), CFO, CAZ(I), ATM, ERT(I), IMP, GEN(I), AMI, <u>EST</u> , TET, DOX, MH, CIP(I), LEV(I), OFX(I), NOR, NAL, <u>SXT</u> , <u>SUL</u> , <u>TRI</u>
	49	ICE PvuBra5	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>dfrA1</i>	CPM, MER, AMC, CFZ(I), IMP(I), <u>EST</u> , TET, DOX, MH, CIP(I), <u>SUL</u> , <u>CLO</u>

Legenda: EE, estação de esgoto; TR, terminal rodoviário; AE, aeroporto. *sulIII*, gene de resistência ao sulfametoxazol; *strA*, gene de resistência a estreptomicina A; *strB*, gene de resistência a estreptomicina B; *floR*, gene de resistência ao cloranfenicol; *dfrA1*, *dfrA18*, gene de resistência ao trimetoprim. AMP, ampicilina; PIP, piperacilina; AMC, amoxicilina/clavulanato; APS, ampicilina/sulbactam; PPT, piperacilina/tazobactam; CFZ, cefazolina, CFL, cefalotina; CPM, cefepime; CTX, cefotaxima; CFO, cefoxitina; CAZ, ceftazidima; ATM, aztreonam; ERT, ertapenem; IMP, imipenem; MER, meropenem; GEN, gentamicina; AMI, amicacina, EST, estreptomicina; TET, tetraciclina; DOX, doxiciclina; MH, minociclina; CIP, ciprofloxacina; LEV, levofloxacina; OFX, ofloxacina; NOR, norfloxacina; NAL, ácido nalidixico; SXT, trimetoprim/sulfonamida (co-trimoxazol); SUL, sulfonamida; TRI, trimetoprim; CLO, cloranfenicol; ERI, eritromicina; FUR, furazolidona; MFX, moxifloxacina; OXA, oxacilina; POL, polimixina B; RIF, rifampicina; TIG, tigeciclina.