TANIELA MARLI BES

Desenvolvimento de aptâmeros contra *Klebsiella pneumoniae* e *Acinetobacter baumannii* multirresistentes

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientador: Profa. Dra. Silvia Figueiredo Costa

São Paulo
2022

TANIELA MARLI BES

Desenvolvimento de aptâmeros contra *Klebsiella pneumoniae* e *Acinetobacter baumannii* multirresistentes

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientador: Profa. Dra. Silvia Figueiredo Costa

São Paulo
2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Bes, Taniela Marli
Desenvolvimento de aptâmeros contra Klebsiella pneumoniae e Acinetobacter baumannii multirresistentes / Taniela Marli Bes. -- São Paulo, 2022.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.
Orientadora: Silvia Figueiredo Costa.

Descritores: 1.Klebsiella pneumoniae 2.Acinetobacter baumannii 3.Bactérias gram-negativas 4.Técnica de seleção de aptâmeros 5.Aptâmeros de nucleotídeos 6.Bacteriologia

USP/FM/DBD-299/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

A meus pais Nildo e Marli Bes, pela confiança e dedicação comigo desde quando não sabíamos nem mesmo como me inscrever no vestibular.

A meus irmãos, Milcre e Luis Gabriel Bes, pela parceria e apoio incondicional.

Ao Bruno, pelo companheirismo e por suportar todas as minhas decisões, por mais que estas incluíssem morar em três continentes e 11 casas no mesmo ano (durante uma pandemia).

Dedico esta tese a vocês, por quem tenho amor infinito.

AGRADECIMENTOS

A presente tese de doutorado não teria sido concluída sem o precioso apoio de várias pessoas.

Em primeiro lugar, não posso deixar de agradecer à minha orientadora, à Professora Silvia Figueiredo Costa, pelos ensinamentos, pela motivação e pela inspiração, mesmo em tempos difíceis. Por ter me recebido como sua aluna, por acreditar em mim sempre. Por extravasar otimismo, mesmo quando os resultados não eram os melhores. Por sempre me pegar pela mão e encontrar uma saída, seja ela para problemas técnicos, financeiros ou até mesmo pessoais.

À Professora Ester Cerdeira Sabino, pelo exemplo de dedicação profissional e pelo suporte internacional durante meu doutorado sanduíche, o qual não teria acontecido sem este amparo.

Ao Professor Alexandre Pereira, por ter me recebido em Boston e me guiado por caminhos totalmente novos, onde precisei reaprender até mesmo protocolos básicos. Mas principalmente, por ter me ensinado a pensar.

Aos Professores Christine Siedman e Jonathan Siedman, por terem aberto as portas do Laboratório Siedman, e me dando todo suporte possível para que eu pudesse aprender o máximo durante os dois anos que passei lá.

À Professora Anna Sara Levin, por ter acreditado em mim desde meu primeiro ano de residência médica e tendo me introduzido ao mundo da pesquisa com maestria.

Ao Carlos Santos, por ter me ajudado a dar os primeiros passos na biologia molecular, desde quando eu não sabia nem mesmo experimentos básicos como PCR.

À Dra. Marina Farrel, por ter sido muito mais que minha pós-doc, mas uma amiga que me guiou durante esses últimos cinco anos, sem a qual essa tese não teria sido concluída.

À Dra. Gabriela Venturini, pela paciência, empenho e sentido prático com que sempre me orientou, muito obrigada por me ter corrigido quando necessário sem nunca me desmotivar.

Ao LIM 49. Sou grata pela paciência de todos que me ensinaram e que puderam participar desse processo de construção, em especial ao Lauro, a Evelyn, Beatriz (Bia), Beatriz (Be), Camila, Ana Paula, Sania e Andréia.

Ao Laboratório Seidman. Sou grata pelo acolhimento caloroso que recebi. Que mesmo com inúmeras diferenças culturais, sempre fizeram com que me sentisse parte do grupo. Meu agradecimento especial ao Daniel, Justin, Jon, a Júlia e a Viktoria, pela amizade e apoio.

Aos membros da banca de qualificação (Prof. Alexandre Pereira, Profa. Renata Picão e Profa. Regina L. Baldini), pelos ajustes e sugestões tão pertinentes para essa pesquisa.

Aos amigos Luisa, Nitya, Noor, Tammie, Isabela, Valerie e Tahir, pela amizade e apoio. Por sempre me lembrar de que sou capaz. Por muitas vezes me dar literalmente um lugar para dormir durante esses anos de andanças pelo mundo.

À Denise Esper, por me ensinar a buscar motivação, por sempre me ajudar a escolher o caminho certo ou ao menos o mais certo possível com as informações apresentadas.

À toda minha família, que sempre apoiou todas as minhas escolhas, minha eterna gratidão. Aos meus pais, que sempre me incentivaram a correr atrás dos meus sonhos e que nunca mediram esforços para que eles acontecessem. Eles me ensinaram que todo problema tem uma solução, seja ele matemático ou não. Aos meus irmãos, que mesmo com o coração apertado de saudades, nunca me pediram para voltar para casa. Ao Bruno, não tenho nem palavras para agradecer o quando me apoiou sem nunca nem mesmo questionar minhas escolhas, que reorganizou sua vida profissional, pessoal e esportiva (rs) inúmeras vezes para me seguir, sem ele esse projeto não teria sido concluído.

“Me ensinaram que o caminho do progresso não era rápido nem fácil”

Marie Curie

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias.*
Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentações; 2011.

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

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas
Lista de figuras
Lista de quadros
Resumo
Abstract

1 INTRODUÇÃO 1
1.1 Delineamento do problema 2
1.2 *Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii* e a progressão da resistência antimicrobiana ao longo dos anos 4
1.3 Aptâmeros 11
1.4 Justificativa 31

2 OBJETIVOS 32
3.1 Objetivo geral 33
3.2 Objetivos específicos 33

3 MÉTODOS 34
3.1 Amostras bacterianas 35
3.1.1 Escolha das amostras 35
3.1.2 Cultivo da célula bacteriana 39
3.1.3 Lavagem das células bacterianas 39
3.2 Padronização da metodologia de aptâmeros 40
3.2.1 Sintetização da biblioteca randômica 41
3.2.2 Diluição dos aptâmeros e primers 41
3.2.3 Formulações das soluções tampão 42
3.2.3.1 Tampão A (tampão de lavagem) 42
3.2.3.2 Tampão B (tampão de ligação) 42
3.2.4 Preparo dos aptâmeros 43
3.2.5 Ligação 43
3.2.6 Eluição 44
3.2.7 Amplificação da biblioteca 44
3.2.7.1 PCR convencional 44
3.2.7.2 PCR assimétrico 45
3.2.8 Remoção de impurezas e concentração da biblioteca 45
3.2.9 Seleção negativa 47
3.2.10 PCR em tempo real 48
3.3 Identificação dos aptâmeros selecionados 49
3.3.1 Clonagem 49
3.3.2 Montagem da estrutura secundária 50
3.4 Testes de afinidade 51
3.4.1 Ensaios de fluorescência 51
3.4.1.1 Fluorímetro 51
3.4.1.2 Citometria de fluxo 52

3.4.1.3 Microscopia de fluorescência 52
3.5 Teste *in vitro* – inoculação direta e *Time kill* 53
3.6 Análises estatísticas 53

4 RESULTADOS 54
4.1 Padronização do protocolo Cell-SELEX 55
4.2 Controle de seleção - qPCR 56
4.3 Controle de seleção – Seleção negativa 57
4.4 Identificação do aptâmero 57
4.4.1 Clonagem 57
4.4.2 Sequenciamento de Sanger 58
4.4.3 Estrutura secundária 59
4.5 Ensaios de fluorescência 61
4.5.1 Citometria de fluxo 61
4.5.2 Ensaios de fluorescência – Fluorímetro 64
4.5.3 Ensaios de fluorescência – Microscopia 66
4.6 Análise do aptâmero *in vitro* 67

5 DISCUSSÃO 69

6 CONCLUSÕES 75

7 ANEXO 77

8 REFERÊNCIAS 79

APÊNDICES 102

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	-	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATB	-	Antimicrobiano
CDC	-	*Centers for Disease Control and Prevention*
Cell-SELEX	-	*Cellular Systematic Evolution of Ligands via Exponential Enrichment*
CIM	-	Concentração inibitória mínima
CVC	-	Cateter venoso central
DH5α	-	Douglas Hanahan 5 - *Alpha Cell*
DNA	-	*Deoxyribonucleic acid* (Ácido desoxirribonucleico)
EDTA	-	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ESBL	-	*β*-lactamases de espectro estendido
HCFMUSP	-	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
ICS	-	Infecção de corrente sanguínea
IPCSL	-	Infecção primária da corrente sanguínea laboratorial
IRAS	-	Infecções relacionadas à assistência à saúde
LB	-	Luria Bertani
LIM 49	-	Laboratório de Investigação Médica número 49
MALDI-TOF	-	*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*
MHB	-	*Mueller-hinton broth*
MIC	-	*Minimal inhibitory concentration*
MLST	-	*Multilocus Sequence Typing*
OMS	-	Organização Mundial da Saúde
PBS	-	*Phosphate-buffered saline*
PCR	-	*Polymerase chain reaction*
PFGE	-	*Pulsed-field gel electrophoresis*

RNA	-	*Ribonucleic acid* (Ácido ribonucleico)
SELEX	-	*Systematic Evolution of ligands via exponential enrichment*
SGC	-	Sequenciamento de genoma completo
ST	-	*Sequence type*
TE	-	Tris-EDTA
TSA	-	Ágar tripticase de soja
UFC	-	Unidade formadora de colônia
USP	-	Universidade de São Paulo
UTI	-	Unidade de terapia intensiva
WGS	-	*Whole genome sequencing*
WHO	-	*World Health Organization*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura de aptâmero em dobramento tridimensional (APT-A01) 12

Figura 2 - Etapas do protocolo de *Cell-SELEX* proposto neste trabalho 46

Figura 3 - Esquematização microscópica das etapas do protocolo de *Cell-SELEX* proposto neste trabalho 46

Figura 4 - Figura esquemática da seleção negativa reversa, realizada no primeiro ciclo de seleção (A). Figura esquemática da seleção negativa convencional realizada após o 6º e o 13º ciclos de seleção, utilizando *A. baumannii* como exemplo (B) 47

Figura 5 - Demonstração da reação de PCR em tempo real mostrando as curvas de amplificação dos aptâmeros selecionados seguindo a curva de amplificação da biblioteca, usada como controle positivo (A). Curva Melt comparando a curva de dissociação dos iniciadores entre aptâmeros e controles positivos e negativos (B). Reação de PCR em tempo real mostrando amplificação de produtos inespecíficos, os quais seguem a curva de amplificação do controle positivo, porém não seguem a curva de dissociação dos iniciadores (C e E). Gel mostrando bandas do produto de amplificação da figura A (D) 56

Figura 6 - Previsão da estrutura secundária do DNA dos aptâmeros contra *K. pneumoniae* utilizando *RNAMaxExpect results structure* do pacote de *software RNAstructure* 60

Figura 7 - Previsão da estrutura secundária do DNA dos aptâmeros contra *A. baumannii* utilizando *RNAMaxExpect results structure* do pacote de *software RNAstructure* 60

Figura 8 - Citometria de fluxo aptâmeros K28 e A01 62

Figura 9 - Citometria de fluxo para *K. pneumoniae* do primeiro ao quinto ciclo de seleção mostrando um deslocamento no pico de fluorescência, o qual começa a desaparecer no sétimo ciclo e desaparece completamente até o nono ciclo de seleção 63

Figura 10 - Citometria de fluxo para *A. baumannii* do primeiro ao 16o ciclo de ligação mostrando manutenção do deslocamento do pico de fluorescência em relação ao controle negativo.....63

Figura 11 - Exemplo de ensaios de fluorescência em fluorímetro; 10A: utilizando o aptâmero A01, mostrando evidente a diferença na intensidade de fluorescência entre o aptâmero A01 quando incubado com *A. baumannii* em comparação quando incubado com outras células bacterianas (*K. pneumoniae* e *S. aureus*). 10B: Utilizando aptâmeros selecionados para K. pneumoniae incubados com a mesma. O APT K27, por ter apresentado diferença de intensidade de fluorescência, foi também testado em *A. baumannii* e *S. aureus* 65

Figura 12 - A microscopia evidenciou marcas de fluorescência sobre as células de *A. baumannii* quando o aptâmero foi incubado com *A. baumannii*, as quais não foram evidenciadas quando o aptâmero A01 foi incubado com células de *K. pneumoniae* (A e B). O controle negativo utilizando células de *K. pneumoniae* e *A. baumannii* isoladas não apresentou evidência de fluorescência (C).....66

Figura 13 - Esquematização dos testes *in vitro*. A solução contendo aptâmeros foi inoculada sobre o tapete bacteriano após a diluição das células bacterianas em solução salina 0.9% (A) ou após crescimento das células em caldo LB (B). Ensaio de *Time Kill* utilizando *A. baumannii* com o aptâmero A01 a 0,5 *µ*M (coluna preta) e tampão TE (coluna cinza) inicialmente sem tioureia e após com tioureia adicionada a 5 *µ*M (C). 68

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Estudos de identificação de aptâmeros contra enterobactérias patogênicas e não fermentadoras, bem como técnica utilizada e alvo de identificação 25

Quadro 2 - Amostras bacterianas utilizadas neste estudo 35

Quadro 3 - Perfil de resistência dos isolados de *K. pneumoniae* e de *A. baumannii* utilizados neste estudo.....36

RESUMO

Bes TM. *Desenvolvimento de aptâmeros contra Klebsiella pneumoniae e Acinetobacter baumannii multirresistentes* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

Bactérias Gram-negativas são importantes agentes de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), sendo a *Klebsiella pneumoniae* responsável por 16,9% e o *Acinetobacter baumannii* por 12,2% das infecções de corrente sanguínea no Brasil. Novas tecnologias precisam ser desenvolvidas para identificação rápida e tratamento destes agentes. O desenvolvimento de novas tecnologias, como o tratamento e diagnóstico baseado em aptâmeros, tem sido promissor e vem apresentando notável expansão nos últimos anos, porém ainda limitada em relação às bactérias Gram-negativas. Aptâmeros são oligonucleotídeos de fita simples, de alta afinidade e especificidade para qualquer molécula orgânica. Podem ser obtidos *in vitro* pela técnica *SELEX*. O objetivo deste estudo foi desenvolver aptâmeros específicos para cepas de *K. pneumoniae* e *A. baumannii* com finalidade diagnóstica e terapêutica. Adaptou-se e padronizou-se uma técnica de seleção de aptâmeros visando a célula bacteriana inteira (*Cell-SELEX*) embasada em múltiplos protocolos previamente publicados, sobre os quais foram feitas pequenas modificações. Dez cepas de *K. pneumoniae* e *A. baumannii* multirresistente, provenientes do banco de cepas do laboratório de bacteriologia LIM 49, foram utilizadas como alvo. Neste estudo foram identificados nove aptâmeros estruturalmente distintos para *Klebsiella pneumoniae* e oito para *Acinetobacter baumannii*. E por mais que ainda não haja relatos na literatura de aptâmeros específicos para *K. pneumoniae*, estes achados melhoram as expectativas no desafio contra a resistência antimicrobiana.

Descritores: *Klebsiella pneumoniae*; *Acinetobacter baumannii*; Bactérias gram-negativas; Técnica de seleção de aptâmeros; Aptâmeros de nucleotídeos, Bacteriologia.

ABSTRACT

Bes TM. *Development of aptamers against multidrug resistant Klebsiella pneumoniae and Acinetobacter baumannii* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2022.

Klebsiella pneumoniae and *Acinetobacter baumannii* accounting respectively for 16.9% and 12.2% of bloodstream infections in Brazil, are opportunistic agents that can colonize mucous membranes and cause serious infections. New antimicrobial agents and innovative technologies need to be developed to control these agents. In recent years, aptamer technology has been described as an innovative proposal that can be applied as a diagnostic and therapeutic alternative. Aptamers are single-stranded oligonucleotides, with high affinity and specificity for any organic molecule. They can be obtained *in vitro* by the *SELEX* technique. The aim of this study was to develop specific aptamers for *K. pneumoniae* strains for diagnostic or therapeutic purposes. We have standardized a new aptamer selection technique designed to the entire bacterial cell (*Cell-SELEX*) based on multiple previously published protocols, on which we made minor modifications. Ten strains of multidrug-resistant *K. pneumoniae* and *A. baumannii* from the LIM49 bacteriology laboratory strains bank were subjected to the *SELEX* technique. In this study we identified nine structurally distinct aptamers for *Klebsiella pneumoniae* and eight to *Acinetobacter baumannii*. And although there are no reports in the literature about specific aptamers for *K. pneumoniae*, these findings improve expectations in the challenge against antimicrobial resistance.

Descriptors: *Klebsiella pneumoniae*; *Acinetobacter baumannii*; Gram-negative bacteria; SELEX aptamer technique; Aptamers, nucleotide; Bacteriology.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Delineamento do problema

Com a evolução das tecnologias em saúde, para diagnóstico, tratamento e suporte avançado de vida, as complicações infecciosas se tornam as principais causas de morte do paciente crítico.

Durante muitos anos, o *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina foi o protagonista das infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), porém na última década, principalmente em grandes centros a disseminação de infecções por Gram-negativas vem se tornando um problema de saúde pública.

No Brasil, as enterobactérias e não-fermentadores são importantes agentes de IRAS, sendo a *Klebsiella pneumoniae* responsável por 16,9% e o *Acinetobacter baumannii* por 12,2% das infecções de corrente sanguínea no Brasil, segundo dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa, 2016). Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), 2011, as Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) são responsáveis pelas maiores prevalências de IRAS. Quando avaliados dados de UTIs de 1.692 hospitais brasileiros, resultados alarmantes foram observados, sendo a densidade de incidência de infecção primária da corrente sanguínea laboratorial (IPCSL) em UTIs de pacientes adultos de 5,1 infecções a cada 1.000 cateter venoso central (CVC)-dia (Anvisa, 2016).

K. pneumoniae e *A. baumannii* são agentes ubíquos na natureza, podendo ser encontrado no ambiente, água, esgoto e solo, bem como colonizando animais e plantas (Bagley 1985; Podschun e Ullmann, 1998; Podschun *et al*., 2001; Howard *et al*., 2012). A *K. pneumoniae* é considerada um agente de baixa virulência, porém por mecanismos descritos abaixo é capaz de adquirir resistência aos antimicrobianos (ATB) e causar infecções graves em pacientes hospitalizados, muitas vezes sem opções terapêuticas. O *A. baumannii,* por sua vez, é conhecido por ser a espécie mais virulenta do seu gênero (Baumann *et al.*, 1968; Chusri *et al*. 2014). Ambos os agentes desenvolveram um amplo espectro de resistência antimicrobiana e são associados a aumentos tanto no tempo de internação hospitalar quanto na mortalidade, principalmente em indivíduos imunocomprometidos (Gaynes *et al.*, 2005; Blossom e Srinivasan, 2008). São responsáveis por causar uma variedade de infecções, a maioria envolvendo o trato respiratório e corrente sanguínea (Bayuga *et al.*, 2002; Bennett *et al*., 2014; Martin e Bachman, 2018).

Com o crescimento da resistência antimicrobiana em Gram-negativos, a necessidade de novos métodos diagnósticos, assim como novas opções terapêuticas não baseadas em antimicrobianos, é de vital importância.

1.2 *Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii* e a progressão da resistência antimicrobiana ao longo dos anos

K. pneumoniae foi descrita por Carl Friedlander, em 1882, como agente de pneumonia, isolada em cadáveres nos quais a pneumonia foi a causa *mortis* (Friedlaender, 1882). *A. baumannii* foi identificado a partir do extenso gênero *Acinetobacter sp*., o qual foi inicialmente descrito em 1911 pelo microbiologista holandês Beijernick como *Micrococcus calcoaceticus* que foi isolado do solo (Beijerinck, 1911).

Atualmente, estes microrganismos podem ser definidos como agentes oportunistas, que podem colonizar mucosas, e causar infecções graves relacionadas à assistência à saúde (Martin e Bachman, 2018; Zheng *et al*., 2021). A transmissão de ambos os agentes ocorre devido ao contato pessoa a pessoa, como por exemplo, por meio das mãos e equipamentos utilizados por profissionais de saúde ou por contato com superfícies contaminadas (Casewell e Phillips, 1977; Jarvis *et al*., 1985). Após aquisição de qualquer um dos microrganismos mencionados, os mesmos podem colonizar mucosas do trato respiratório e gastrointestinal (Podschun e Ullmann, 1998), bem como colonizar a pele transitoriamente (Kloos e Musselwhite, 1975).

As taxas de colonização são variáveis e dependem do ambiente onde o paciente se encontra, e fatores de risco, os quais incluem uso prévio de antimicrobianos, especialmente carbapenêmicos, história de infecção prévia, gênero, idade e sítio investigado (Martin *et al*., 2016; Gorrie *et al*., 2017; Brink, 2019; Kang *et al*., 2019). A colonização prévia por *K. pneumoniae,* bem como por *A. baumannii* é fator de risco independente para infecção,

porém os mecanismos para disseminação, apesar de inúmeras hipóteses, ainda não estão bem elucidados (Taur *et al*., 2012; Playford *et al*., 2007). Ferreira *et al*. (2018), em estudo na Unidade de Transplante de Medula Óssea do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, mostraram que 55,2% das infecções de corrente sanguínea (ICS) são causadas por bactérias Gram-negativas e que 20% destes pacientes eram previamente colonizados por agentes com perfil similar ao da infecção, indicando que a colonização intestinal prévia por agentes multidroga resistentes é importante fator de risco para ICS. Os fatores relacionados ao estado imune do paciente e a integridade da barreira mucosa estão associados à progressão de colonização para infecção (Taur *et al.*, 2012). Assim como a presença de patologias associadas, como diabetes, câncer e alcoolismo (Tsay *et al.*, 2002; Tsai *et al*., 2010).

O uso indiscriminado de antimicrobianos na prática clínica diária, associado ao uso inapropriado de antibióticos na pecuária e na agricultura, contribuem para o desequilíbrio do microbioma e disseminação da resistência antimicrobiana (Taylor *et al*., 2020; Centers for Disease Control and Prevention, 2022a, 2022b). Programas de uso racional de antimicrobianos mostram resultados favoráveis e segundo Hallsworth *et al.* (2016) deveriam ser aplicados inclusive na atenção primária. No Brasil, no ano de 2010, foi implantada uma Lei Nacional (Projeto de Lei nº 6492/06, Brasil, 2006) para controlar a venda de antimicrobianos, sendo obrigatória a prescrição médica, estudos mostram um decréscimo no uso de ATB por um curto período de tempo no estado de São Paulo e posteriormente em todo o

país (Moura *et al.*, 2015; Kliemann *et al.*, 2016). No entanto, em 2012, as taxas de consumo de antimicrobianos voltam a acender, inclusive dados das regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste mostram números comparáveis com os dados prévios à lei (Moura *et al*., 2015). Em 2020, outro dado alarmante foi apontado por Porto *et al.*, que notaram além da alta prevalência de uso de antibióticos em hospitais brasileiros, que 81,2% são administrados empiricamente e que os mesmos são na maioria dos casos de amplo espectro. Desde o início da pandemia de COVID-19, os antimicrobianos vêm sendo utilizados empiricamente e indiscriminadamente em pacientes infectados com SARS-CoV-2, impactando na resistência antimicrobiana. Segundo dados publicados pela Fundação Oswaldo Cruz (Menezes, 2021) a quantidade de isolados bacterianos resistentes a antimicrobianos recebidos por laboratórios de saúde pública aumentou em progressão geométrica durante os dois primeiros anos da pandemia, em comparação com 2019 (1 mil em 2019, 2 mil em 2020 e 4 mil em 2021). Estudo de metanálise (Langford *et al*., 2020), representando 3338 pacientes com COVID-19 estimou que mais de 70% dos pacientes infectados receberam antimicrobianos como parte do esquema terapêutico, sendo que apenas 3,5% apresentaram coinfecção bacteriana e 14,3% tiveram infecção bacteriana como complicação. O elevado uso de antimicrobianos em pacientes SARS-CoV-2 positivos tambem foi mostrado em metanalise realizada por Puzniak *et al*. (2021).

Múltiplos mecanismos de resistência a antimicrobianos, incluindo todos os β-lactâmicos e até mesmo novas drogas como Ceftazidima/Avibactam, são encontrados em *K. pneumoniae* e *A. baumannii.* Os carbapenêmicos foram por décadas a última opção terapêutica contra estes patógenos, no entanto, este cenário mudou drasticamente com a pressão seletiva do uso de antimicrobianos de amplo espectro e disseminação de mecanismos de resistência (Brisse e Verhoef, 2001; Brisse *et al.*, 2004; Maatallah *et al.*, 2014; Berry *et al*., 2015; Long *et al.*, 2017), principalmente genes de resistência associados a plasmídeos, os quais são rapidamente propagados (Martin e Bachman, 2018).

Gram-negativos resistentes a beta-lactâmicos foram descritos pela primeira vez quando Fleming, em 1929, notou que cepas de *E. coli* não foram inibidas pela penicilina. Hoje um dos grandes desafios na prática clínica é a resistência a carbapenêmicos em enterobactérias e não fermentadores. A resistência aos carbapenêmicos se dá principalmente por três mecanismos: produção de carbapenemase (incluindo serina carbapenemase de classe A e metalo lactamases de classe B) a perda ou diminuição da expressão de proteínas da membrana externa denominadas porinas (Samuelsen *et al*., 2009; Breurec *et al*., 2013), bomba de efluxo (Lin *et al*., 2017) e alteração no sítio de ação da droga as proteínas ligadoras de penicilina (PBPs) (Vashist *et al*., 2011).

A *K. pneumoniae* carbapenemase (KPC) foi descrita pela primeira vez em 2009, na cepa CG258 incluindo o ST258 encontrado na Europa e na América do Norte e do Sul, e o ST11 na Ásia (Baraniak *et al*., 2009; Kitchel *et al*., 2009; García-Fernández *et al*., 2012; Liu *et al*., 2012; Nicoletti *et al*., 2012).

Nos últimos anos, diferentes tipos de metalo-β-lactamases foram identificados, como, por exemplo, São Paulo metalo-β-lactamase-1 (SPM-1), identificada na cidade de São Paulo em cepa de *Pseudomonas aeruginosa* proveniente de paciente de quatro anos de idade portadora de leucemia (Toleman *et al*., 2002) e metalo-β-lactamase-1 (NDM-1) de Nova Deli, isolada em paciente Sueco com história recente de viagem à Índia (Yong *et al.*, 2009). Em 2010, nos Estados Unidos da América foi identificada a primeira *K. pneumoniae* carreando metalo-β-lactamases (VIM) codificadas pelo integron de Verona (Centers for Disease Control and Prevention, 2010), dentre outras descritas ao redor do mundo. De forma ainda mais alarmante, algumas espécies de Gram-negativos são capazes de carregar múltiplas carbapenemases (Quiles *et al*., 2015; Jia *et al*., 2018; Bes *et al*., 2021).

No Brasil as taxas de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos vem ascendendo de forma alarmante, variando de 25% a 43,3%, entre os anos de 2012 e 2015, respectivamente. Quanto ao *Acinetobacter spp*. a progressão da resistência se manteve estável, variando de 77.1% a 77,4% durante o mesmo período (ANVISA, 2017). *K. pneumoniae* é principal agente causador de infecção de corrente sanguínea em UTIs no estado de São Paulo, sendo responsável por 17,2%, seguida por Gram-positivos e *Acinetobacter ssp.*, sendo este responsável por 13,1% dos casos em UTIs adulto (ANVISA, 2017).

Na última década a Polimixina E (colistina), antibiótico usado na década de 1960 e descontinuado devido a nefrotoxicidade, voltou a ser usado como terapia de resgate para infecções causadas por *K. pneumoniae*

e *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos. A resistência a polimixina E pode ser mediada por mutação cromossômica que altera o sítio de ligação da droga o lipopolissacarídeo (LPS) ou por plasmídeo, sendo este preocupante devido a fácil disseminação. Resistência à colistina mediada por plasmídeo é decorrente da aquisição do gene *mcr*-1, descrito pela primeira vez na China, em 2016, por Liu *et al.*, então passa a ser identificado em diferentes centros ao redor do mundo. Alguns centros brasileiros apresentam taxas de resistência à colistina superiores a 9% em cepas de *K. pneumoniae* resistente a carbapenêmicos (ANVISA, 2013). Dados do Centro de Vigilância Epidemiológica de 2018 mostram uma variação de 1% a 8% de *K. pneumoniae* resistente a Polimixina B entre os anos de 2005 e 2018 (CVE, 2019). Estudos retrospectivos realizados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo descreveram o perfil epidemiológico, bem como o perfil de resistência à colistina neste serviço. A análise de cepas de bacilos Gram-negativos, mostrou que entre os isolados coletados de 2010 a 2014, 7% das cepas de *K. pneumoniae* e 1.4% das cepas de *Acinetobacter ssp.* eram resistentes a colistina (Rossi *et al.*, 2017). Boszczowski *et al.* (2019) avaliaram isolados de 28 pacientes com ICS por *K. pneumoniae* resistentes a colistina, destas 26 também carregavam KPC-2 e 13 pacientes haviam sido expostos previamente a polimixinas. Higashino *et al*. (2019), analisaram retrospectivamente 1042 pacientes da unidade de transplante de medula óssea, identificando 12 isolados de *K. pneumoniae* resistentes a colistina e a carbapenêmicos, sendo este perfil associado a uma mortalidade de 81,8% e ainda mais alarmante, dentre os isolados

sequenciados o gene de resistência a clinistina MCR-1 foi identificado em isolado do ano de 2011, ou seja, anterior a identificação oficial do gene na China em 2015, por Liu *et al*. (2016).

Atualmente, o diagnóstico de infecções por agentes resistentes além de limitado é muito custoso. As múltiplas combinações entre nível de expressão e associação de mecanismos de resistência torna o diagnóstico específico ainda mais difícil. Como triagem inicial hoje é padronizado o uso da concentração inibitória mínima (CIM) seguido de testes fenotípicos e genotípicos. No caso da resistência aos carbapenêmicos, entre os testes fenotípicos destacam-se o disco combinado com carbapenêmicos, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e ácido fenilborônico, a análise de hidrólise de carbapenêmicos por *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization* (MALDI-TOF) e o *CarbaTest*. Quanto às abordagens genotípicas, as técnicas são baseadas em reação em cadeia da polimerase (PCR), como PCR convencional, PCR em tempo real, sequenciamento do gene de resistência, *Cephaid*, *microarray* de ácido desoxirribonucleico (DNA) entre outros testes comerciais. Estes testes têm custo elevado, não estão amplamente disponíveis além de não detectarem novas variantes de *β*-lactamases, bem como o patógeno específico.

Frente a estes exemplos de disseminação de resistência e dificuldade de identificação de patógenos multidrogas resistente, novas opções diagnósticas e terapêuticas são necessárias para controle destes agentes, principalmente quando se trata de cepas pan-resistentes, as quais apresentam resistência a todas as classes de antimicrobianos testados,

inclusive aos novos inibidores de *β*-lactamase. Inúmeros novos métodos, como imunoensaios e técnicas moleculares, foram desenvolvidos para sua detecção. No entanto, essas técnicas geralmente passam por várias etapas, incluindo isolamento, enriquecimento e purificação, bem como requerem equipamentos sofisticados e pessoal altamente treinado, o que aumenta o tempo e o custo diagnóstico. Mesmo com o exame de cultura sendo o padrão-ouro, é urgente a necessidade de novas alternativas para identificação rápida de microrganismos multirresistentes. A crise de resistência a antibióticos tem guiado a comunidade científica a criar intervenções não convencionais para limitar o surgimento e a disseminação de bactérias resistentes. O desenvolvimento de novas tecnologias, como tratamento e diagnóstico baseados em aptâmeros, por exemplo, tem mostrado resultados promissores.

1.3 Aptâmeros

Aptâmeros (do inglês, *aptamers*) derivado do Latim *aptus*, que significa apto a se ligar a algo e *meros* do Grego que significa partícula, são oligonucleotídeos de fita simples. A tecnologia para identificação de aptâmeros foi descrita pela primeira vez em 1990, por Tuerk e Gold, e é uma ferramenta inovadora baseada em oligonucleotídeos de RNA, RNA modificado, DNA de fita simples (*ss*DNA) ou de DNA de fita dupla (*ds*DNA) com capacidade especial de dobramento e ligação (Figura 1). Os alvos dos aptâmeros podem variar desde íons simples, ligantes de baixo peso molecular, proteínas até mesmo células inteiras.

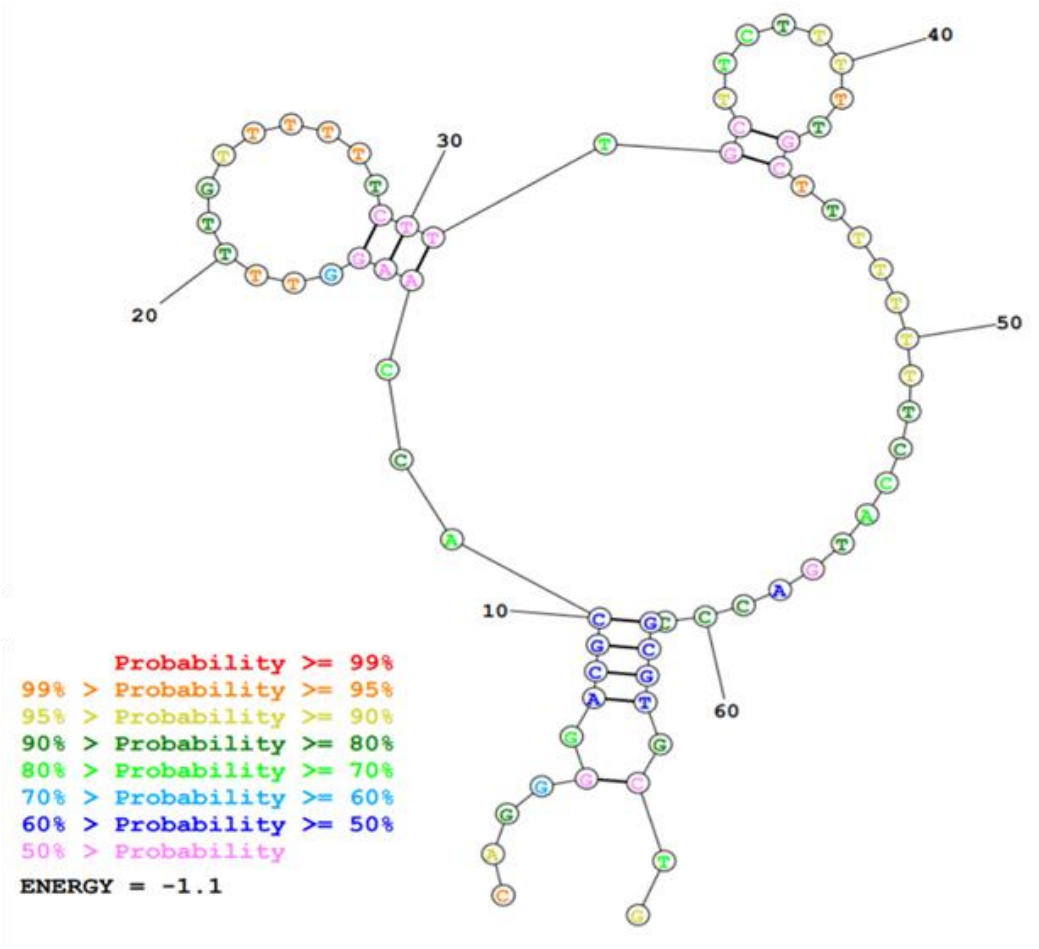


Figura 1 - Estrutura de aptâmero em dobramento tridimensional (APT-A01)

Devido a inúmeras vantagens, como estabilidade, ampla gama de alvos e aplicações diversas, os aptâmeros são considerados uma terapêutica além do escopo das drogas farmacológicas existentes. Eles são gerados por um método chamado *Systematic Evolution of Ligands via Exponential Enrichment* (*SELEX*), um protocolo demorado e trabalhoso que vem sendo otimizado nos últimos 30 anos com o objetivo comum de produzir novos aptâmeros para alvos específicos. O conceito de *SELEX* baseia-se na capacidade dos aptâmeros de se dobrarem em estruturas tridimensionais únicas na presença de seus respectivos alvos e se ligam com alta afinidade e especificidade, sendo capazes de discriminar ligantes intimamente relacionados.

As técnicas de *SELEX* foram modificadas para permitir a seleção de aptâmeros contra células de bactérias vivas (Bruno e Kiel, 1999; Chen *et al*., 2007; Hamula *et al*., 2008). O chamado *Cell-SELEX* pode ser usado para selecionar aptâmeros contra células bacterianas sem conhecimento prévio do alvo de ligação e aproximando o patógeno próximo às suas conformações nativas e ambiente fisiológico. A busca de receptores baseados no uso de aptâmeros tem focado em encontrar ácidos nucleicos funcionais que reconhecem um alvo único, minimizando a reatividade cruzada para alvos indesejados que compartilham epítopos com estrutura semelhante (Kimoto *et al.*, 2013). A elevada especificidade é importante quando o objetivo é identificar ou tratar doenças infecciosas (Ulrich *et al*., 2004).

Aptâmeros são amplamente utilizados na oncologia, como ferramenta para reconhecimento de células cancerígenas bem como para tratamento (Bertrand *et al*., 2014; Harding *et al*., 2010). No campo das ciências neurológicas são usados principalmente para reconhecimento de alvos moleculares (Famulok *et al.*, 2007). Para agentes infecciosos, a tecnologia de aptâmeros vem sendo aplicada desde 1993, quando a técnica *SELEX* foi utilizada para isolar partículas de RNA de proteína do envelope do Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) (Tuerk e MacDougal-Waugh, 1993).

No mesmo ano, Schneider *et al*. (1993), identificaram o primeiro aptâmero para estrutura bacteriana, um aptâmero de RNA que se ligava ao fator de transcrição *rho* de *Escherichia coli*. Em 1996, Ochsner e Vasil identificaram 16 genes regulados pelo regulador de captação férrica (Fur)

em células de *Pseudomonas aeruginosa* usando a tecnologia *SELEX*, que foi a pesquisa pioneira para a criação de um anticorpo anti-fur, o qual promove o bloqueio do receptor de ferro reduzindo o ferro viável para a célula bacteriana e, assim, levando-a a morte.

Após quase uma década houve pouco progresso no campo de aptâmeros para bactérias Gram-negativas, em 2008, Gnanam *et al*. desenvolveram um aptâmero de RNA de alta afinidade para o reconhecimento da letal bactéria Gram-negativa, *Burkholderia pseudomallei*. O aptâmero era direcionado a formas puras de proteínas específicas de *B. pseudomallei* (BipD, BopE e BPSL2748), e poderia ser uma ferramenta útil para desenvolver um teste de diagnóstico rápido. No entanto, a seleção *in vitro* de aptâmeros ocorreu apenas até o terceiro ciclo de *SELEX* e nenhuma sequência final de aptâmeros foi obtida a partir desta análise.

Com uma abordagem distinta, Ding *et al*. (2009) desenvolveram um aptâmero de DNA fita simples direcionado contra o lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias Gram-negativas, o qual forneceria ampla proteção contra vários agentes simultaneamente, ligando e neutralizando esta endotoxina. Mesmo sem alcançar o objetivo inicial, o grupo obteve resultados satisfatórios, como por exemplo a importância do tamanho e composição da sequência na capacidade de ligação e atividade do aptâmero. Três anos depois, Kim *et al*. (2012) também selecionaram aptâmeros especificamente para LPS, usando como alvo LPS de *E. coli* 055:B5 sintetizado pela Sigma-Aldrich (EUA). Mais tarde, eles construíram um biossensor de impedância em uma superfície de ouro que demonstrou detectar LPS em baixas concentrações, embora

mostrasse interação cruzada com outras proteínas. Apesar destas interações, o sensor mostrou ter aplicações práticas em fluidos biológicos. O aptâmero contra LPS descrito por Kim *et al*. (2012) foi posteriormente comercializado pela Sigma-Aldrich (EUA) e vem sendo modificado e utilizado para construir biossensores para detecção de LPS (Su *et al*., 2013; NK e Gorthi, 2021).

Buscando estabelecer um método rápido e simples utilizando hibridização in situ com fluorescência (*FISH*), Wang *et al.* (2011), selecionaram dois aptâmeros de DNA de fita simples específicos contra *P. aeruginosa*. O grupo utilizou a célula bacteriana inteira como alvo, sendo a primeira aplicação de aptâmero-*FISH* para identificação bacteriana. Os aptâmeros selecionados não apresentaram reatividade cruzada com bactérias de outros gêneros, sendo o primeiro aptâmero específico descrito contra *P. aeruginosa.* A primeira aplicação deste aptâmero foi realizada por Yoo *et al*. (2015) os quais utilizaram aptâmeros previamente estabelecidos para *P. aeruginosa* (Wang *et al*. 2011), *L. acidophilus* (Hamula *et al*., 2008) e *Salmonella typhimurium* (Joshi *et al*., 2009), para desenvolver um sensor baseado em ressonância plasmônica de superfície localizada (LSPR). Que foi a primeira ferramenta multiplex de detecção bacteriana utilizando aptâmeros e em formato de microchip. A mesma foi capaz de detectar, em baixas concentrações (30 cfu), três bactérias diferentes em um mesmo ensaio.

Savory *et al.* (2013) desenvolveram uma abordagem de maturação *in silico* (ISM) para melhorar a especificidade dos aptâmeros para o diagnóstico

precoce de *Proteus mirabilis*. Eles aplicaram ISM em cinco aptâmeros inicialmente selecionados pela técnica *Cell-SELEX*, aumentando a afinidade destes aptâmeros em até 36%. O grupo também observou que a base guanina desempenha um papel fundamental na capacidade de ligação do aptâmero em toda a célula bacteriana. Posteriormente, usando um aptâmero descrito anteriormente para *P. mirabilis* (Savory *et al*. 2013), Yao *et al*. (2020) desenvolveram um novo sensor mais estável e mostrou resultados promissores quando testado em leite e amostras forenses simuladas de sangue e urina. No entanto, ainda deve ser avaliado em amostras clínicas com diferentes concentrações de patógenos.

No final do século 21, *A. baumannii* tornou-se um agente importante entre as infecções hospitalares, disseminando entre pacientes hospitalizados e aumentando as taxas de mortalidade. Com isso, sua detecção imediata para otimizar o tratamento antibiótico tornou-se crítica. Em 2016, Rasoulinejad e Gargari (2016) introduziram o primeiro aptâmero visando *A. baumannii* como parte de um sistema de detecção híbrido utilizando duas moléculas de ligação específicas [um aptâmero (*Aci49*) e um nanocorpo contra uma proteína associada ao biofilme (*anti-Bap*)], baseado em um sistema de ensaio de adsorvente de aptâmero ligado a enzima sanduíche (ELASA). O que se mostrou promissor para a detecção rápida de *A. baumannii* a partir de isolados clínicos, com baixo limiar de detecção (10^3 UFC). Em 2020, ainda em busca de uma ferramenta para diagnóstico de infecção da corrente sanguínea em estágio inicial, Yang *et al*. (2020) modificaram por meio da fosforilação aptâmeros previamente descritos

contra *A. baumannii* e LPS (Rasoulinejad e Gargari, 2016; Wang *et al.*, 2019a). Utilizando os aptâmeros contra *A. baumannii* e LPS fosforilados eles construíram um ensaio fluorimétrico para detecção de *A. baumannii* em amostras de sangue. A estratégia foi bem-sucedida na detecção de *A. baumannii* em amostras de sangue. No entanto, não é capaz de detectar vários patógenos simultaneamente.

Ainda buscando soluções para altas taxas de infecções hospitalares, porém agora abordando biofilme causado por *P. aeruginosa,* em 2017, utilizando a técnica *SELEX* para célula inteira, Soundy e Day (2017) identificaram o primeiro aptâmero de DNA altamente específico contra biofilme vivo derivado de *P. aeruginosa*. A célula da *P. aeruginosa* possui baixa permeabilidade em sua membrana externa, bem como regulação positiva de sistemas de bomba de efluxo para multidrogas, o que permite que esse microrganismo seja intrinsecamente resistente a vários antimicrobianos. Também é considerada um organismo modelo para estudos de controle de biofilme devido à sua forte capacidade de formação de biofilme. Inicialmente o grupo buscava aptâmeros com atividade bacteriostática e/ou bactericida, porém mesmo sendo altamente específicos, seus aptâmeros não apresentavam propriedades terapêuticas. Três anos depois, Soundy e Day (2020) projetaram uma entrega direcionada promissora de prata, minimizando a toxicidade da prata para o hospedeiro infectado e maximizando a atividade antimicrobiana. Eles utilizaram aptâmeros previamente descritos pelo mesmo grupo (Soundy e Day, 2017) conjugados a uma estrutura de AgNC. Este foi o primeiro aptâmero de DNA

específico contra *P. aeruginosa* utilizado para entregar uma dose tóxica de prata metálica como antimicrobiano contra *P. aeruginosa.* O experimento mostrou resultados bem-sucedidos em modelo animal invertebrado de infecção (*Galleria mellonella*).

Também como estratégia para o controle de biofilme, Wang *et al*. (2018) conjugaram o aptâmero previamente descrito contra *P. aeruginosa* (PA-ap1) (Wang *et al.*, 2011) com ciprofloxacino (CPX), aumentando a eficiência dos agentes antibiofilme. Dois diferentes complexos foram desenvolvidos, utilizando combinações de PA-ap1, nanotubos de carbono de parede simples (SWNTs) e a molécula de CPX. O complexo PA-ap1-CPX-SWNTs obteve um melhor desempenho no controle do biofilme quando comparado com os elementos individualmente ou em diferentes combinações. Os resultados *in vitro* sugerem que o complexo PA-ap1-CPX-SWNTs pode ser uma abordagem útil para controlar a formação de biofilme por uma variedade de bactérias, apenas alterando a sequência do aptâmero e a célula bacteriana compatível.

Procurando por aptâmeros capazes de atingir bactérias de diferentes gêneros, Song *et al*. (2017) descreveram um método de isolamento *in vitro* chamado *sequencial toggle cell-SELEX* (*STC-SELEX*), onde buscaram aptâmeros que compartilhassem os mesmos epítopos. Bactérias de diferentes gêneros (*Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus epidermidis*) foram incubadas sequencialmente e após 18 ciclos de seleção duas sequências demonstraram ampla afinidade contra os seis gêneros

bacterianos, bem como falta de afinidade de ligação para outras nove espécies designadas para seleção negativa. Esta metodologia é potencialmente útil para encontrar aptâmeros amplamente reativos com afinidade a vários gêneros microbiológicos.

Também pesquisando aptâmeros de amplo espectro, Graziani *et al.* (2017) descreveram dois aptâmeros direcionados ao peptidoglicano da parede celular externa, apresentando afinidade de ligação a sete espécies diferentes de bactérias Gram-negativas e quatro Gram-positivas. A maior atividade de ligação foi encontrada contra *K. pneumoniae, P. aeruginosa* e *A. baumannii*, o que provavelmente reflete diferenças no peptidoglicano da parede celular encontrado nessas cepas. Aptâmeros como estes, amplamente específicos e com capacidade de detectar uma variedade de agentes bacterianos podem ser ferramentas livres de cultura e amplificação para diagnóstico rápido de sepse.

Buscando uma alternativa para ensaios tradicionais baseados em anticorpos, Wu *et al*. (2018) desenvolveram um dispositivo microfluídico acionado eletromagneticamente, o qual é capaz de detectar a célula bacteriana por meio de um ensaio de aptâmero duplo ligado a uma membrana de nitrocelulose, formando uma estrutura semelhante a um sanduíche. O aptâmero selecionado era altamente específico contra *A. baumannii.* Essa tecnologia é capaz de detectar as bactérias em cerca de 40 minutos, sendo um instrumento promissor de diagnóstico bacteriano no local de atendimento. Também com objetivo de reduzir tempo de diagnóstico, Su *et al*. (2020) modificaram o aptâmero de *A. baumannii* descrito por Wu *et al*.

(2018) e construíram um novo ensaio de aptâmeros duplos (Wang *et al*., 2019b). Um dispositivo onde os aptâmeros foram conjugados com esferas magnéticas capazes de identificar e quantificar as células bacterianas. Com um objetivo semelhante, Bahari *et al*. (2021) também utilizaram o aptâmero de Wu *et al*. (2018) para desenvolver um sensor biológico fluorescente para detecção de *A. baumannii.* O aptasensor fluorescente é capaz de detectar bactérias em baixa faixa de concentração e apresentou resultados promissores para detecção de *A. baumannii* em amostras de urina.

Vários grupos têm trabalhado no diagnóstico e tratamento rápidos de agentes Gram-negativos. Hu *et al.* (2018) utilizaram ressonância plasmônica de superfície localizada (LSPR), um sistema de detecção que não é específico para qualquer tipo de alvo molecular, o qual possui capacidade de detecção em baixos volumes. No geral, esta plataforma de detecção LSPR é caracterizada pela detecção rápida e alta sensibilidade, representando um importante avanço no diagnóstico de patógenos. A plataforma LSPR suporta uma implementação mais ampla para diferentes patógenos. Para comprovar a seletividade e versatilidade do método, 1 ano depois o mesmo grupo utilizou a tecnologia para detectar especificamente células de *A. baumannii* em meio a outras bactérias Gram-negativas (*P. aeruginosa, E. coli*) e Gram-positivas (*B. cereus*), usando como reagente de afinidade um complexo sideróforo-Fe(III) (Hu *et al*., 2018).

Da mesma forma, Roushani *et al*. (2019) utilizaram o aptâmero específico contra *P. aeruginosa* (Wang *et al*., 2011), amino modificado por Zhong *et al*. (2018), e desenvolveram um sensor seletivo na superfície do

eletrodo de carbono para detecção ultrassensível de *P. aeruginosa* em amostras de soro. Também utilizando o aptâmero previamente identificado por Wang *et al*. (2011), Shi *et al*. (2019) desenvolveram um novo método de detecção, utilizando aptâmero ligado a um magneto e a uma cauda Poly-A para detecção rápida e seletiva de *P. aeruginosa* em amostras de sangue de ovelha desfibrinado estéril, porém ainda não foi testado em amostras reais de pacientes.

Independentemente da extensa pesquisa por métodos de detecção de bactérias, nenhum aptâmero atende totalmente às demandas de situações da vida real, como a detecção de bactérias vivas no sangue. E tentando resolver esse problema, Shin *et al*. (2019) isolaram dois aptâmeros de DNA de fita simples (GN6 e GN12) contra *Serratia marcescens*, *Escherichia coli* DH5α e *E. coli* K12 utilizando o método *Toggle-cell-SELEX,* descrito anteriormente (Song *et al.*, 2017). As células bacterianas foram sequencialmente incubadas com uma biblioteca de sequências aleatória de oligonucleotídeos, selecionando aptâmeros com forte afinidade de ligação aos três agentes selecionados. Usando o aptâmero GN6, foi montada uma ferramenta de detecção ligando o aptâmero a uma enzima. O complexo mostrou grande potencial na identificação de múltiplas espécies Gram-negativas. Em relação à reatividade cruzada, foi realizado um ensaio de ligação com células bacterianas Gram-negativas e Gram-positivas. Os aptâmeros mostraram alta afinidade de ligação aos Gram-negativos e quase nenhuma aos Gram-positivos, sugerindo que os alvos desconhecidos são expressos exclusivamente em bactérias Gram-negativas.

Além das preocupações quanto à identificação da espécie bacteriana, a identificação do perfil de sensibilidade de Gram-negativos patogênicos também é um desafio constante e com demanda por tecnologias inovadoras. Em um esforço contínuo pelo uso consciente de antimicrobianos, Lee *et al.* (2020) buscaram aptâmeros específicos previamente descritos contra seis bactérias patogênicas diferentes e desenvolveram um teste rápido de suscetibilidade antimicrobiana (e-AST). Esses aptâmeros incluíam os aptâmeros mencionados anteriormente contra *P. aeruginosa* e *A. baumannii* (Yoo *et al*., 2015; Rasoulinejad e Gargari, 2016). O algoritmo rastreia comportamentos bacterianos em tempo real, permitindo assim a determinação da suscetibilidade antimicrobiana em 6 horas. Mesmo com um custo maior quando comparado com o padrão-ouro, a concentração inibitória mínima, pode ser uma ferramenta capaz de salvar vidas, uma vez que as discrepâncias entre os testes e-AST e CIM foram estimadas em menos de 2,20% quando aplicadas em seis cepas clínicas de pacientes sépticos.

Em 2020, buscando opções terapêuticas, Kubiczek *et al.* introduziram o conceito de biblioteca de aptâmeros policlonais como uma nova ferramenta para lutar contra patógenos multirresistentes. Utilizando uma variação do processo *SELEX*, com base no monitoramento de cada ciclo de seleção por medições de fluorescência das bibliotecas em desenvolvimento (*FLuCell-SELEX*). Eles utilizaram uma biblioteca sintetizada com 40 sequências de aptâmeros diferentes e realizaram 16 ciclos de *SELEX*. Foi observado um aumento na afinidade de ligação no decorrer dos ciclos, o que sugeriu uma compensação da maior sequência de aptâmeros disponíveis

para outros alvos nas superfícies celulares. No entanto, a bactéria recuperou a motilidade entre o primeiro e o terceiro dia do experimento, sendo uma provável explicação, a inativação dos aptâmeros ou a degradação enzimática, uma vez que a parede celular de *P. aeruginosa* é fortemente regulada e não depende apenas da configuração genética da respectiva cepa, mas também sobre as condições ambientais. Um ano depois, Krämer *et al.* (2021) usaram uma biblioteca focada de *FLuCell-SELEX* com oito aptâmeros contra *P. aeruginosa*, os quais se ligavam consistentemente a *P. aeruginosa* resistente a carbapenêmicos. Assim desenvolvendo um aptâmero anti-*P aeruginosa* revestido com esferas BSA capaz de capturar células desse patógeno em fluidos humanos.

Até o momento nenhum dos estudos havia abordado especificamente bactérias Gram-negativas resistentes aos carbapenêmicos. Chen *et al*. (2020) e Yu *et al*. (2021) selecionaram um aptâmeros específico contra bactérias produtoras de KPC-2 (XK10), utilizando um método chamado *SELEX* de precisão, onde combinaram quatro ciclos de *SELEX* para proteínas e, posteriormente, quatro ciclos de *SELEX* para célula bacteriana inteira. Utilizando o aptâmero XK10 modificado com prata e biotina (Biotina-Ag-XK10), desenvolveram uma ferramenta capaz de detectar a célula bacteriana inteira em fluidos, dando simplicidade no reconhecimento e detecção bacteriana. Um sistema promissor, pois é capaz de detectar até mesmo diferentes tipos de carbapenemases em uma hora.

Embora o número de publicações sobre o desenvolvimento de aptâmeros para enterobactérias patogênicas e não fermentadoras tenha

aumentado ao longo dos anos, ainda há muito a ser feito. Apenas nove das 30 publicações descrevem a aplicação de aptâmeros para diagnóstico ou tratamento destes patógenos. Explorando a literatura, as publicações dos últimos 3 anos são principalmente sobre desenvolvimento de dispositivos de diagnóstico usando aptâmeros descritos anteriormente e nenhum novo aptâmero está sendo desenvolvido. Sem considerar o uso do aptâmero como terapia para bactérias Gram-negativas, nenhum estudo mostrou resultados promissores até o momento. No entanto, apesar dos avanços ainda não possuímos aptâmeros em uso comercial no campo das doenças infecciosas. O Quadro 1 demonstra os aptâmeros já desenvolvidos contra células bacterianas de enterobactérias e não-fermentadores, bem como seu alvo de ligação e metodologia utilizada para identificação.

Neste estudo buscou-se identificar aptâmeros específicos contra células de *K. pneumoniae* multirresistente inteira. Foi utilizada a técnica *Cell-SELEX* adaptada como ferramenta para obtenção de aptâmeros de DNA de fita simples, que até onde se sabe, ainda não foi descrito.

Quadro 1 - Estudos de identificação de aptâmeros contra enterobactérias patogênicas e não fermentadoras, bem como técnica utilizada e alvo de identificação

Referência	Microrganismo	Técnica	Especificidade Afinidade	Objetivo Aptâmeros	Alvo de ligação
Ochsner e Vasil (1996)	*Pseudomonas aeruginosa*	*SELEX* RNA	Ensaios de mudança de mobilidade de DNA: os clones continham uma identidade de sequência *Fur-box*	Identificação de genes	Identificação de 16 novos genes controlados pelo repressor *Fur*
Gnanam *et al*. (2008)	*Burkholderia pseudomallei*	*SELEX* Proteína RNA	Após a segunda rodada, as seleções negativas foram realizadas passando o RNA sobre filtros HAWP antes da incubação da proteína.	Diagnóstico	*B. pseudomallei* BipD e BopE
Ding *et al*. (2009)	Múltiplos alvos	*SELEX* DNA	Afinidade: interação entre os oligoaptâmeros usando a constante de dissociação (valores *Kd*). Especificidade testada por meio de rodadas sequenciais de SELEX (7) seguidas de análises do sequenciamento.	Tratamento da Sepse	*ss*DNA que se liga especificamente ao LPS (Lipídio A)
Wang *et al*. (2011)	*P. aeruginosa*	*Cell-SELEX* DNA	A afinidade de ligação dos aptâmeros de *ss*DNA foi determinada pela realização de análise de citometria de fluxo com quantidade crescente do clone de aptâmero e uma quantidade constante de *P. aeruginosa* (10^7) para cada ensaio. Especificidade foi testada através de citometria de fluxo, realizada com *P. aeruginosa* e outras *Pseudomonas ssp.,* além de outras espécies bacterianas gram-negativas e gram-positivas.	Diagnóstico F17 F23	Toda a superfície da célula bacteriana
Kim *et al*. (2012)	LPS	Não-*SELEX* DNA	A afinidade foi determinada através da *Kd* utilizando eletroferograma. A especificidade foi testada fazendo seleção negativa com uma sequência APT sem afinidade para LPS.	Identificação de LPS	Identificação de LPS

continua

continuação

Referência	Microrganismo	Técnica	Especificidade Afinidade	Objetivo Aptâmeros	Alvo de ligação
Savory *et al*. (2013)	*Proteus mirabilis*	*Cell-* SELEX *DNA*	A afinidade foi avaliada através da *Kd*, usando um ensaio de *blotting* no qual células de *P. mirabilis* imobilizadas em uma membrana de nitrocelulose foram incubadas com uma faixa de concentrações dos APTs. Especificidade: bactérias de outras espécies e outros gêneros foram imobilizadas em uma única peça de membrana de nitrocelulose e incubadas com aptâmero marcado com *FITC*.	Diagnóstico PmA102 PmA109	Toda a superfície da célula bacteriana
Yoo *et al.* (2015)	*Lactobacillus acidophilus* *Salmonella typhimurium* *P. aeruginosa*	Não-SELEX DNA	Utilizou ATP descrito por Savory *et al.* (2013)	Diagnóstico	Células bacterianas inteiras
Rasoulinejad e Gargari (2016)	*Acinetobacter baumannii*	*Cell-SELEX* DNA	A afinidade foi avaliada através da *Kd,* medida após a incubação com concentrações variadas de aptâmeros. A especificidade, avaliada por citometria de fluxo após incubação com bactérias de outro gênero.	Diagnóstico Aci49	Células bacterianas inteiras
Schulmeyer *et al.* (2016)	*P. aeruginosa*	*SELEX* RNA	A Biblioteca de RNA radiomarcado foi submetida a análises de cromatografia de afinidade e ensaio de mudança de mobilidade eletroforética. A constante de ligação de equilíbrio dos aptâmeros (*Keq*) foi calculada.	Previsão de alvos de RNA *in vivo* de RsmA e RsmF	RsmA e RsmF
Soundy e Day (2017)	*P. aeruginosa*	*Cell-SELEX* DNA	A afinidade foi avaliada por citometria de fluxo com aptâmeros marcados com fluorescência. Os valores de *Kd* foram determinados incubando células bacterianas com diferentes concentrações de aptâmeros. Especificidade: os aptâmeros foram avaliados quanto à ligação a outras espécies bacterianas Gram-negativas e Gram-negativas.	Terapêutica	Contra biofilme vivo derivado de *P. aeruginosa*

continua

continuação

Referência	Microrganismo	Técnica	Especificidade Afinidade	Objetivo Aptâmeros	Alvo de ligação
Song *et al*. (2017)	*Escherichia coli Enterobacter aerogenes Klebsiella pneumoniae Citrobacter freundii Bacillus subtilis Staphylococcus epidermidis*	*Cell-SELEX* (Processo Sequencial) *DNA*	A afinidade e especificidade foram investigadas ligando aptâmeros a seis células bacterianas alvo individualmente. Para o teste de seletividade, a ligação das sequências de *ss*DNA individuais a diferentes células bacterianas foi realizada usando as mesmas condições. A intensidade de fluorescência das células ligadas a aptâmeros marcados com corante *3'-FAM* foi medida usando um micro-fluoro espectrofotômetro. A *Kd* foi obtida por uma análise de regressão não linear	Diagnóstico e tratamento	Células bacterianas inteiras
Graziani *et al*. (2017)	*A. baumannii Listeria monocytogenes Escherichia coli Staphylococcus aureus K. pneumonia*	*SELEX* DNA	A afinalidade foi avaliada através de Kd. Para especificidade, usando *q*PCR acessaram a afinidade de ligação comparando o Antibac1 e o Antibac2 com uma biblioteca aleatória	Antibac1 e Antibac2 - detecção multiplex de sepse bacteriana no ambiente clínico	Peptidoglicano da parede celular externa
Wu *et al*. (2018)	*A. baumannii* (AB)	*SELEX* DNA	O aptâmero (10 µM) foi carregado em uma membrana NC e imobilizado via reticulação UV. Em seguida, 10^3 UFC/µL de AB, *E. coli* (EC) e MRSA foram incubados com o aptâmero específico de AB e 30 min depois o aptâmero conjugado com biotina específico de AB foi adicionado para capturar as bactérias ligadas à membrana. O aptâmero foi considerado como AB-específico.	Diagnóstico	Células bacterianas inteiras
Wang *et al*. (2018)	*P. aeruginosa*	Não-*SELEX* DNA	Utilizou um APT de Wang *et al*. modificado	Aptâmeros no tratamento de biofilme.	Aptâmero–SWNTs e aptâmero–ciprofloxacina–SWNTs) com base em um aptâmero que tem como alvo Pseudomonas aeruginosa e SWNTs foram construídos.

continua

continuação

Referência	Microrganismo	Técnica	Especificidade Afinidade	Objetivo Aptâmeros	Alvo de ligação
Hu *et al*. (2018)	*P. aeruginosa*	Cell-*SELEX* modificado DNA	Utilizou ATP descrito por Wang *et al*. (2011)	Diagnóstico	Células bacterianas inteiras
Shin *et al*. (2019)	*E. coli DH5α E. coli K12 Serratia marcescens*	*Cell-SELEX* (Processo Sequêncial) *DNA*	Várias concentrações de aptâmeros marcados com *FAM* foram adicionadas a células de bactérias (10^8). Após medir o sinal de fluorescência, as curvas de saturação de ligação foram ajustadas usando modelo de regressão não linear. As constantes de dissociação (Kd) foram calculadas contra três cepas bacterianas testadas.	Diagnóstico GN6 GN12	Células bacterianas inteiras
Roushani *et al*. (2019)	*P. aeruginosa*	*SELEX* DNA	Utilizou ATP descrito por Wang *et al.* (2011)	Diagnóstico	Células bacterianas inteiras
Shi *et al.* (2019)	*P. aeruginosa*	*SELEX* DNA	Utilizou ATP descrito por Wang *et al.* (2011)	Diagnóstico	Células bacterianas inteiras
Zhao *et al*. (2019)	*P. aeruginosa*	SELEX DNA	O sistema (Bead-C50-Pool99-SQ) foi incubado com C4-HSL em diferentes concentrações por 1 hora e a intensidade de fluorescência foi medida, e a dissociação do aptâmero foi calculada, bem como a *Kd.*	Inibir a formação de biofilmes de *P. aeruginosa*	Contra C4-HSL produzido pelo sistema *rhl*.
Chen *et al*. (2020)	KPC-2 *E. coli KPC-2*	*SELEX* Proteína e *Cell-SELEX* DNA	O aptâmero XK-10 marcado com *FAM* foi incubado com *E. coli KPC-2* em diferentes concentrações e medido por citometria de fluxo.	Diagnóstico de bactérias produtoras de KPC-2 (XK10)	KPC-2 foi usado como proteína alvo e *E. coli KPC-2* foi usado como bactéria alvo.
Kubiczek *et al*. (2020)	*P. aeruginosa*	*FluCell-SELEX* DNA	A biblioteca foi incubada com diferentes cepas clinicamente relevantes, a análise de afinidade foi através de espectrometria de massa. A análise combinada de afinidade e especificidade evoluiu para microscopia confocal de varredura a laser (*CLSM*) e fluorimetria.	Diagnóstico	Células bacterianas inteiras

continua

continuação

Referência	Microrganismo	Técnica	Especificidade Afinidade	Objetivo Aptâmeros	Alvo de ligação
Yang *et al*. (2020)	*A. baumannii*	Não-*SELEX* DNA	Utilizou ATP descrito por Rasoulinejad e Gargari (2016)	Diagnóstico	Células bacterianas inteiras
Yao *et al*. (2020)	*P. mirabilis*	Não-SELEX DNA	Utilizou ATP descrito por Savory *et al.* (2013)	Diagnóstico	Células bacterianas inteiras
Su *et al*. (2020)	*A. baumannii*	Não-*SELEX* DNA	Utilizou um APT descrito por Wu *et al*. (2018)	Diagnóstico	Células bacterianas inteiras
Soundy e Day (2020)	*P. aeruginosa*	Não-SELEX DNA	Utilizou APT descrito por Soundy e Day (2017)	Terapêutico	Contra biofilme vivo derivado de PA692 p aeruginosa
Lee *et al*. (2020)	*A. baumannii P. aeruginosa*	Não-SELEX DNA	Utilizou ATPs descritos por Rasoulinejad e Gargari (2016) e Yoo *et al*. (2020)	Diagnóstico e Terapêutico	Células bacterianas inteiras
Bahari *et al*. (2021)	*A. baumannii*	Não-*SELEX* DNA	Utilizou um APT descrito por Wu *et al*. (2018)	Diagnóstico	Células bacterianas inteiras
Yu et al. (2021)	*KPC-2* *E. coli KPC-2*	SELEX Proteína e Cell-SELEX DNA	Utilizou ATP descrito por Chen *et al.* (2019)	Diagnóstico de bactérias produtoras de KPC-2 (XK10)	KPC-2 foi usado como proteína alvo e E. coli KPC-2 foi usado como bactéria alvo.
NK e Gorthi (2021)	LPS	Não-SELEX DNA	Utilizou APT descrito por Kim *et al.* (2012)	Diagnóstico	LPS

continua

conclusão

Referência	Microrganismo	Técnica	Especificidade Afinidade	Objetivo Aptâmeros	Alvo de ligação
Krämer et al. (2021)	*P. aeruginosa*	*FluCell-SELEX DNA*	A especificidade o aptâmero foi incubado em diferentes concentrações com *P. aeruginosa* e outras bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, bem como *Candida auris* e submetido à microscopia de fluorescência. Em seguida, as imagens de microscopia de fluorescência foram analisadas usando BSFA.	Diagnóstico	Células bacterianas inteiras

APT: Aptâmero; CPX: Ciprofloxacina; FAM: Amidita de fluoresceína; Kd: Constante de dissociação; LPS: lipopolissacarídeo; NECEEM: Eletroforese capilar fora de equilíbrio de misturas em equilíbrio; QD: pontos quânticos; RNA: ácido ribonucleico; SELEX: Evolução Sistemática de Ligantes via Enriquecimento Exponencial; ssDNA: Ácido desoxirribonucleico de fita simples; SiC: carboneto de silício; SWNTs: Nanotubos de carbono de parede simples; STC-SELEX: célula de alternância sequencial-SELEX.

1.4 Justificativa

Milhares de pacientes morrem devido a infecções causadas por agentes multirresistentes, dos quais muitos ainda não possuem opções terapêuticas. Dentre eles importantes protagonistas são a *K. pneumoniae* e o *A. baumannii.* Um exemplo alarmante foi apontado por estudo na unidade de Transplante de Medula Óssea do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, o qual mostrou mortalidade de 81% entre paciente com infecção por *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos e a colistina (Higashino *et al*., 2019).

O prefixo “pan-” que tem sua origem no idioma grego e significa “tudo/todo”, patógenos pandroga-resistentes são caracterizados por apresentarem resistência a todos os fármacos ativos em potencial ou sensível a no máximo dois agentes antibacterianos atuais (Pontikis *et al*., 2014). Sendo estes patógenos um desafio de saúde pública atual, neste estudo consideram-se intervenções não convencionais para limitar o surgimento e disseminação de agentes pandorga resistentes. Buscou-se aptâmeros, uma ferramenta estável e com uma gama diversa de aplicações, os quais são considerados uma terapêutica além do escopo das drogas farmacológicas existentes e uma alternativa diagnóstica e terapêutica para agentes hiper-virulentos como *K. pneumoniae* e *A. baumannii* pandorga-resistente.

2 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolver aptâmeros específicos para identificação de cepas pan-resistentes de *K. pneumoniae* e *A. baumannii* que possam ser utilizados futuramente para diagnóstico e tratamento de infecções por estes agentes.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar a estrutura dos aptâmeros.

- Avaliar a especificidade de ligação dos aptâmeros identificados contra cepas de *K. pneumoniae* e *A. baumannii.*

- Avaliar o custo da metodologia empregada na identificação e caracterização dos aptâmeros.

- Avaliar a ação dos aptâmeros em modelos de *K. pneumoniae* e *A. baumannii in vitro.*

3 MÉTODOS

3.1 Amostras bacterianas

3.1.1 Escolha das amostras

Foram utilizadas cinco amostras de *K. pneumoniae* e cinco amostras de *A. baumannii* multirresistentes de diferentes linhagens (Quadro 2), conhecidas previamente por sequenciamento genômico completo pelo método *MiSeq IlluminaTM* (Illumina Inc. San Diego, California, USA), provenientes do banco de cepas do laboratório de bacteriologia (LIM 49) isoladas entre 2011 e 2013. O critério de seleção das cepas foi a presença de multirresistência, clonalidade por *Pulsed-field Gel Electrophoresis* (PFGE) e diferença nos MLSTs (Quadro 3). Também foram incluídas cepas de *Escherichia coli, Staphylococcus aureus e de Candida albicans* como controle para processamento da metodologia de seleção negativa.

Quadro 2 - Amostras bacterianas utilizadas neste estudo

Nº do Isolado	Organismo	MLST
1198	*Klebsiella pneumoniae*	ST340
1375	*Klebsiella pneumoniae*	ST258
1421	*Klebsiella pneumoniae*	ST347
1799	*Klebsiella pneumoniae*	ST11
4229	*Klebsiella pneumoniae*	ST11
552	*Acinetobacter baumannii*	ST317
891	*Acinetobacter baumannii*	ST79
1013	*Acinetobacter baumannii*	ST79
895	*Acinetobacter baumannii*	ST79
3705	*Acinetobacter baumannii*	ST107
DH5α	*Escherichia coli*	-
5021	*Staphylococcus aureus*	ST 5
90028	*Candida albicans*	-

MLST: *Multilocus sequence typing*; ST: *sequence typing.*

Quadro 3 - Perfil de resistência dos isolados de *K. pneumoniae* e de *A. baumannii* utilizados neste estudo

Microrganismo	Aminoglicosídeo	Beta-Lactâmico	Quinolona	Fosfomicina	Macrolídeo	Fenicol	Sulfonamida	Trimetoprima	Colistina
Klebsiella pneumoniae	*aac(3)-IId*	*blaCTX-M-15*	*oqxA*	*fosA*	*mph(A)*	*catB3*	*sul1*	*dfrA12*	-
(1198)	*aadA2*	*blaKPC-2*	*oqxB*					*dfrA25*	
	aph(3')-Ia	*blaOXA-1*	*QnrB2*						
		blaTEM-1B							
Klebsiella pneumoniae	*aac(3)-IId*	*blaCTX-M-14*	*oqxA*	*fosA*	*erm(42)*	*catA1*	*sul1*	*dfrA12*	-
(1375)	*aadA2*	*blaKPC-2*	*oqxB*		*mph(A)*		*sul2*		
	aph(3')-Ia	*blaSHV-11*							
	rmtB	*blaTEM-1B*							
	strA								
	strB								
Klebsiella pneumoniae	*aac(3)-IId*	*blaCTX-M-15*	*oqxA*	*fosA*	*mph(A)*	-	*sul1*	*dfrA12*	*mcr-1*
(1421)	*aadA2*	*blaKPC-2*	*oqxB*				*sul2*	*dfrA14*	
	aph(3')-Ia	*blaTEM-1B*	*QnrB19*						
	strA								
	strB								

continua

continuação

Microrganismo	Aminoglicosídeo	Beta-Lactâmico	Quinolona	Fosfomicina	Macrolídeo	Fenicol	Sulfonamida	Trimetoprima	Colistina
Klebsiella pneumoniae	*aac(3)-IIa*	*blaCTX-M-2*	*aac(6')Ib-cr*	*fosA*	*mph(A)*	*catA1*	*sul1*	*dfrA12*	-
(1799)	*aacA4*	*blaKPC-2*	*oqxA*						
	aadA2	*blaOXA-2*	*oqxB*						
	aph(3')-Ia	*blaSHV-11*							
		blaTEM-1B							
Klebsiella pneumoniae	*aac(3)-IIa*	*blaCTX-M-2*	*aac(6')Ib-cr*	*fosA*	-	*catA1*	*sul1*	*dfrA12*	-
(4229)	*aacA4*	*blaLEN12*							
	aadA2	*blaOXA-2*							
		blaTEM-1B							
Acinetobacter baumannii (552)	-	*blaADC-25*	-	-	*mph(E)*	-	-	-	-
		blaOXA-23			*msr(E)*				
		blaOXA-88							
Acinetobacter baumannii (891)	*aadA1*	*blaADC-25*	-	-	-	*floR*	*sul2*	*dfrA1*	-
	aph(3')-VIa	*blaOXA-23*							
	strA	*blaOXA-65*							
	strB	*blaTEM-1A*							

continua

conclusão

Microrganismo	Aminoglicosídeo	Beta-Lactâmico	Quinolona	Fosfomicina	Macrolídeo	Fenicol	Sulfonamida	Trimetoprima	Colistina
Acinetobacter baumannii (895)	*aadA1* *aph(3')-VIa* *strA* *strB*	*blaADC-25* *blaOXA-23* *blaOXA-194* *blaTEM-1A*	-	-	*mph(E)* *msr(E)*	*floR*	*sul2*	*dfrA1*	-
Acinetobacter baumannii (1013)	*aadA1* *strA* *strB*	*blaTEM-1A*	-	-	-	-	*sul2*	*dfrA1*	-
Acinetobacter baumannii (3705)	*aadB* *strA* *strB*	*blaADC-25* *blaOXA-51* *blaOXA-143*	-	-	-	*floR*	*sul2*	-	-

Foram mantidas em sigilo todas as informações sobre os pacientes relacionados às amostras. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética sob de protocolo de pesquisa nº 318/12 e 311.605 (Anexo A). Esses isolados foram caracterizados em estudos já publicados (Leite *et al*., 2016; de Maio Carrillho *et al*., 2017).

As alunas envolvidas no estudo tiveram bolsas do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

3.1.2 Cultivo da célula bacteriana

Todas as células bacterianas foram semeadas por esgotamento em placas de petri de 15 mm cobertas com agar *Luria-Bertani* (LB) (Bertani *et al*., 2004). As células bacterianas foram colocadas para crescimento a 37 ºC *overnight.* Desta placa inicial, colônias isoladas foram suspensas em salina 0,9% até a turvação da solução. Foram coletados 150 microlitros da solução e semeados em meio ágar LB com Alça de *Drigalski.* As placas foram incubadas novamente 37 ºC *overnight.*

3.1.3 Lavagem das células bacterianas

Foram coletadas as células bacterianas da camada superficial, tomando cuidado para que o ágar LB não fosse removido juntamente com as células. Estas células foram diluídas em salina 0,9% até atingir padrão de turvação equivalente a 4.0 na escala de *McFarland*.

Em um novo tubo *ependorph*, foram adicionados 500 microlitros da solução com as células e 500 microlitros de solução salina 0,9%. A solução foi homogeneizada suavemente, sem uso de vortex eletrônico. A solução foi centrifugada a 6000 *rpm* por 3 minutos (esta rotação e tempo foram selecionadas após inúmeras tentativas com diferentes rotações e diferentes intervalos). O sobrenadante foi pipetado cuidadosamente e descartado. Foram adicionados 1000 microlitros de solução salina 0,9% e centrifugados novamente. Este processo foi repetido por três a cinco vezes, aumentando ao longo dos ciclos de seleção, para adequada lavagem das células e remoção de resíduos. Ao final das lavagens o *ependorph* com o *pellet* de células bacterianas foi armazenado a temperatura de 8 ^{o}C enquanto aguardava a solução de aptâmeros.

3.2 Padronização da metodologia de aptâmeros

Foi realizada padronização de uma técnica *in house* para seleção de aptâmeros. A metodologia de *Cell-SELEX* foi modificada e otimizada buscando uma ferramenta para identificar aptâmeros para células bacterianas inteiras com baixo custo e demanda reduzida de equipamentos. As modificações foram baseadas em estudos descritos na literatura (Sefah *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2012; Heiat *et al.*, 2017) e foram descritas detalhadamente a seguir.

3.2.1 Sintetização da biblioteca randômica

Ao longo do presente estudo foram sintetizadas duas bibliotecas randômicas de oligonucleotídeos de DNA. Foram sintetizadas quimicamente pela Thermo Fisher Scientific (Waltham, EUA) e consistem em uma sequência de nucleotídeos aleatórios flanqueados por sequências constantes que serviram como modelo para os iniciadores nas reações de amplificação.

Biblioteca 1: totalizando 75 nucleotídeos, denominada APT-IMT e os iniciadores foram nominados APT-IMT F para *forward* e APT-IMT R para o *reverse*. 5'CAGGGGACGCACCAAGG-**N35**-CCATGACCCGCGTGCTGCGTGAT3'.

Biblioteca 2: totalizando 85 nucleotídeos, denominada APT-IMT2 e os iniciadores foram nominados APT-IMT2 F para *forward* e APT-IMT2 R para o *reverse*. 5'ATGAGAGCGTCGGTGTGGTA-**N45**-TACCACACCGACGCTCTCAT'3.

As bibliotecas randômicas e os iniciadores foram entregues pela IDT (Coralville, IA, EUA) e ressuspensos para uma concentração final de 100 μM em tampão Tris-EDTA (TE) 1x, pH 7.4.

3.2.2 Diluição dos aptâmeros e primers

As soluções foram diluídas com Tris-EDTA até uma concentração de 100 μM, homogeneizados utilizando vortex e levados à geladeira por uma hora. O processo de homogeneização foi repetido a cada 15 minutos. A biblioteca randômica foi armazenada na concentração 100 μM. Alíquotas das soluções dos iniciadores foram diluídas até uma concentração de 10 μM para uso. Todas as soluções finais foram armazenadas a temperatura de -20 ^{o}C.

3.2.3 Formulações das soluções tampão

As soluções tampão foram preparadas no laboratório, sendo o tampão de lavagem preparado semanalmente e o tampão de ligação preparado no dia anterior ao uso e o estoque descartado após a utilização.

3.2.3.1 Tampão A (tampão de lavagem)

- PBS 1x.
- Tween 20 0,05%.
- MgCl2 1mM.

3.2.3.2 Tampão B (tampão de ligação)

- PBS 1x.
- Tween 20 0,05%.
- MgCl2 1mM.
- *Bovine serum albumin* 0,2%(BSA).

3.2.4 Preparo dos aptâmeros

Foram adicionados 100 μL da solução de APT-IMT (100 μM) a 700 μL de tampão de ligação (PBS 1x, *Tween* 20 ,05%, $MgCl_2$ 1mM e *bovine serum albumin* (BSA) 0,2%). A solução de 800 μL foi incubada a 95 ^{o}C por 5 minutos garantindo a desnaturação de quaisquer fitas duplas de DNA presentes na reação. Após os 5 minutos, os tubos contendo a solução de biblioteca foram imediatamente colocados no gelo para que os aptâmeros adquirissem a conformação necessária para ligação ao alvo.

3.2.5 Ligação

No primeiro ciclo de seleção *SELEX*, a biblioteca (4 ^{o}C) foi adicionada às células bacterianas e a solução foi incubada em gelo e com agitação leve (200 rpm) por 1 hora. Após a incubação, o tubo com a solução foi centrifugado a 6.000 *rpm* por 3 minutos e o sobrenadante descartado para remoção dos aptâmeros não ligados à célula bacteriana. O processo de lavagem com 1 mL de tampão de lavagem (PBS 1x, Tween 20 0,05%, MgCl2 1 mM), seguido de centrifugação a 6.000 *rpm* por 3 minutos, foi realizado por mais duas vezes no primeiro ciclo de seleção e por cinco vezes nos ciclos de seleção subsequentes.

3.2.6 Eluição

Para eluição dos aptâmeros ligados às células bacterianas, as células foram ressuspendidas em 50 μL de TE estéril, aquecidas a 95 °C por 10 minutos, e imediatamente resfriadas em gelo por 5 minutos. A suspensão celular foi então centrifugada a 10.000 *rpm* por 5 minutos. O sobrenadante foi utilizado para amplificação por PCR e a sobra foi estocada a -20 °C.

3.2.7 Amplificação da biblioteca

3.2.7.1 PCR convencional

Cada ciclo de *SELEX* foi subsequentemente confirmado e amplificado por PCR, cada reação com um volume total de 25 μL sendo: 2,5 μL de tampão, 2,5 μL MgCl2, 0,75 μL dNTP mix a 10 μM, 0,5 μL de iniciadores *forward* e *reverse* a 10μM, 0,4 μL *taq* recombinante (Invitrogen, Waltham, EUA), 2 μL de DNA molde e água q.s.p. 25μL nas condições: 95 °C por 5 minutos seguido de 18 ciclos de 95 °C por 10 segundos, 60 °C por 5 segundos, 72 °C por 4 segundos e uma extensão final de 72 °C por 1 minuto. A pureza e o tamanho do produto da reação de PCR foram confirmados por eletroforese em gel de agarose a 4%.

3.2.7.2 PCR assimétrico

Com objetivo de gerar moléculas de DNA fita simples, 5 μL do produto do PCR convencional foi utilizado como molde para reação de PCR assimétrica nas mesmas condições anteriores, porém com iniciador *foward* na concentração 100 μM e o iniciador *reverse* na concentração 1 μM. Para cada ciclo de *SELEX* foram realizadas quatro reações de PCR assimétrica com volume de 25 μL cada, totalizando 100 μL de biblioteca a ser utilizada no próximo ciclo de seleção.

3.2.8 Remoção de impurezas e concentração da biblioteca

Aproximadamente após o quarto ciclo de *SELEX*, a quantidade de impurezas proveniente da incubação com as células e resíduos de PCR inviabilizam as reações subsequentes. Devido a isso, optou-se por separar o produto das impurezas por eletroforese em gel de agarose a 3% e cortar a banda de 75 pares de bases (referente ao aptâmero). O fragmento de gel contendo as sequências de aptâmeros foi ressuspenso em 1 mL de água e incubado a 90 °C até a dissolução total da agarose. Em seguida foi realizada uma titulação até 10^{-5}, sendo esta usada como molde para reação de PCR convencional (simétrica) e assim dar continuidade ao próximo ciclo de *SELEX*. O processo está esquematizado em detalhes macroscopicamente na Figura 2 e microscópicamente na Figura 3.

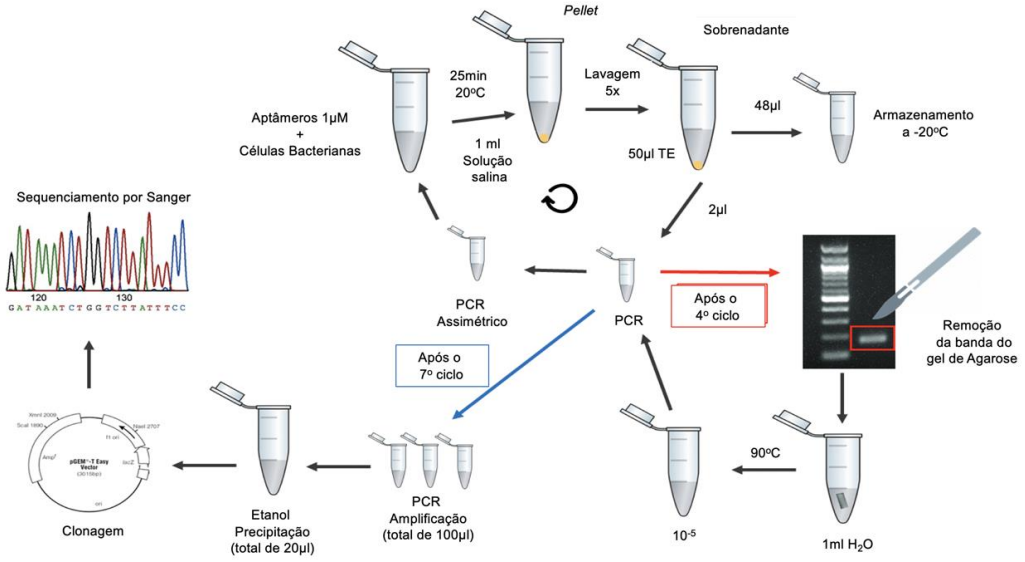


Figura 2 - Etapas do protocolo de *Cell-SELEX* proposto neste trabalho

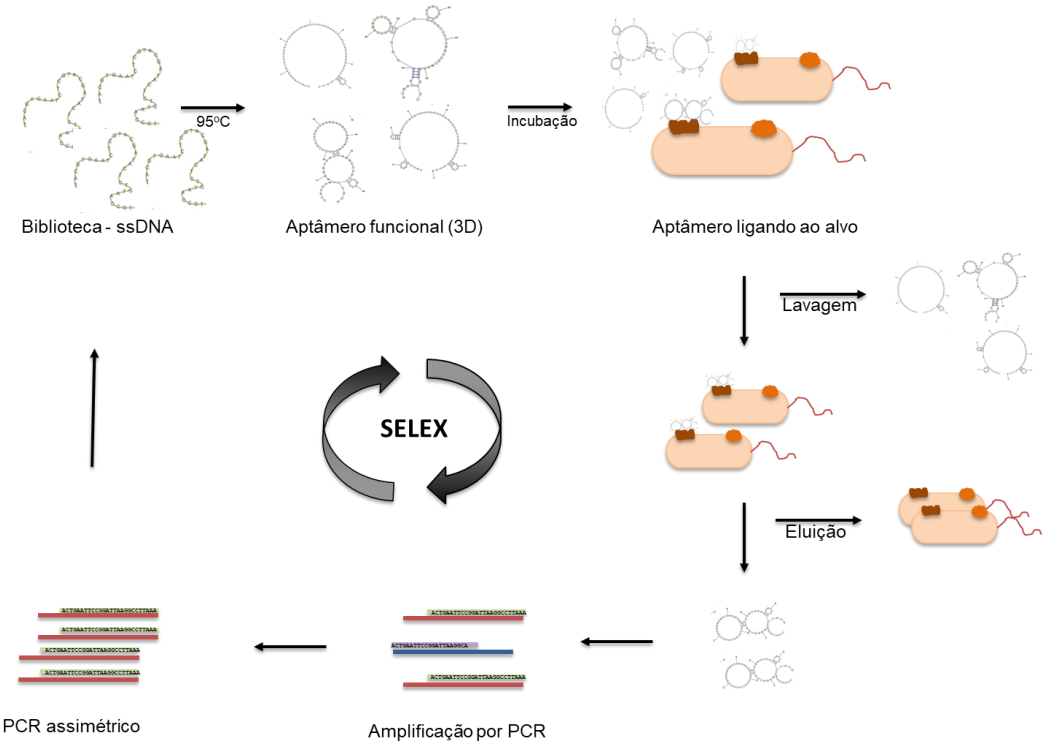


Figura 3 - Esquematização microscópica das etapas do protocolo de *Cell-SELEX* proposto neste trabalho

3.2.9 Seleção negativa

Uma vez selecionados, os aptâmeros foram testados em um número maior de amostras, incluindo outras espécies (*Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*), bem como os aptâmeros selecionados para *K. pneumoniae* foram testados contra *A. baumannii* e *vice-versa,* com intenção de realizar uma seleção negativa. O processo de seleção negativa foi realizado durante o primeiro ciclo de seleção, na forma de seleção negativa reversa e após o sexto ciclo de *SELEX* com o objetivo de garantir a seleção de aptâmeros específicos para *K. pneumoniae* e *A. baumannii* (Figura 4).

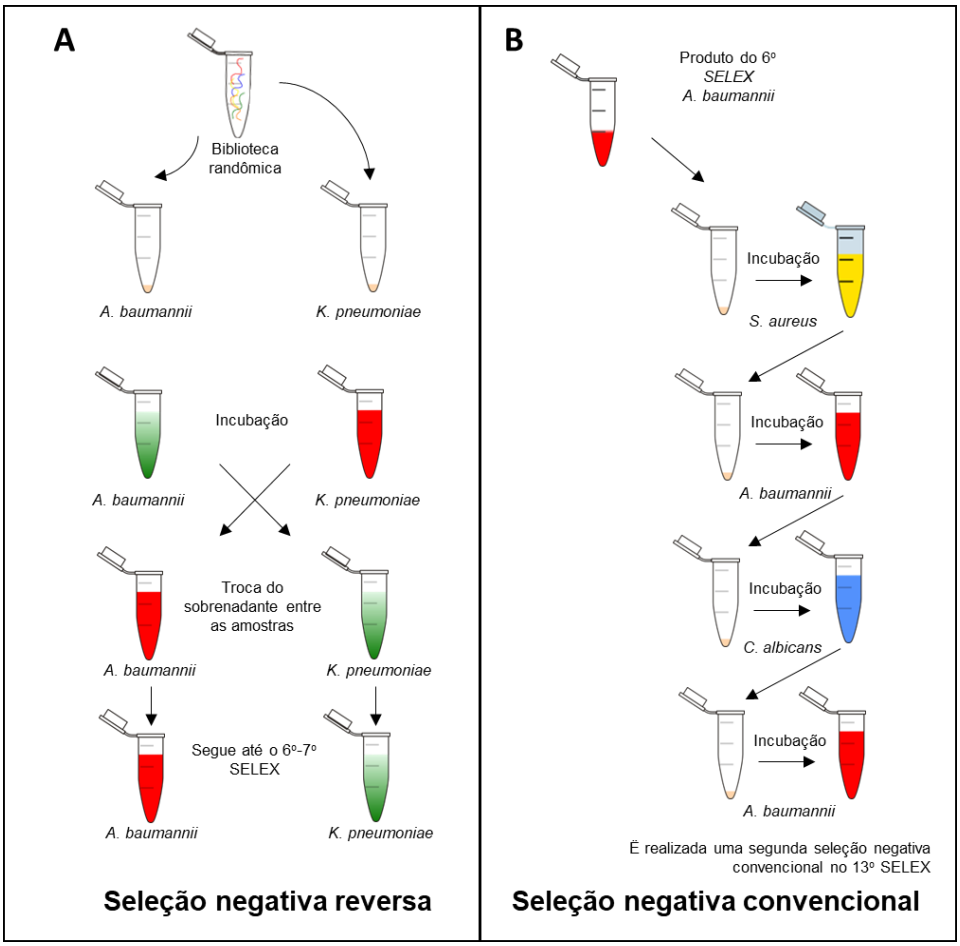


Figura 4 - Figura esquemática da seleção negativa reversa, realizada no primeiro ciclo de seleção (A). Figura esquemática da seleção negativa convencional realizada após o 6º e o 13º ciclos de seleção, utilizando *A. baumannii* como exemplo (B)

O processo de seleção negativa consiste na incubação do aptâmero com células diferentes das quais ele foi inicialmente selecionado. Porém, nesta etapa após a incubação do microrganismo com o aptâmero é realizada a amplificação do sobrenadante, pois nele se encontram os aptâmeros que não se ligaram às células, aumentando assim as chances de serem específicos ao alvo inicial. O sobrenadante amplificado é então utilizado como biblioteca para o próximo ciclo de seleção. Neste estudo optamos por realizar a seleção negativa inicial com *C. albicans* e *S. aureus*.

3.2.10 PCR em tempo real

A reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (*RT-PCR*) foi realizada para confirmar a presença de aptâmeros comparando a curva gerada pelos aptâmeros selecionados com a curva gerada pela biblioteca e curva de dissociação dos iniciadores (curva *Melt*). Foi utilizado o dispositivo CFX96 (BioRad). A reação utilizada consiste em uma técnica aplicada para detecção e quantificação de DNA mesmo em quantidades muito pequenas.

As reações foram realizadas em um sistema de PCR em tempo real Step One (Applied Biosystems, Foster City, CA) usando o Power Up SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA). Os ensaios foram realizados em 20 μL de volume final de reação contendo 10 μL de SYBR master mix, 5 μL de H_2O, 0,5 μL de cada iniciador e 4 μL de DNA (aptâmeros), foram utilizados os mesmos iniciadores já descritos para a PCR convencional. As amostras de aptâmeros foram colocadas diretamente nos

poços da placa de PCR. Após uma ativação inicial da enzima DNA polimerase a 95 °C por 4 minutos, foram realizados 30 ciclos de amplificação usando 95 °C por 15 segundos para desnaturação e 60 °C por 25 segundos para anelamento. Foram testadas as concentrações $1/1.10^3$, $1/1.10^4$, $1/1.10^5$, $1/1.10^6$, $1/1.10^7$, $1/1.10^8$ no primeiro ensaio para confirmar a curva de curva de dissociação dos iniciadores. Após, foi utilizada a concentração $1/1.10^7$ como controle positivo e produto do ciclo de seleção dos aptâmeros.

3.3 Identificação dos aptâmeros selecionados

3.3.1 Clonagem

Após o sétimo ciclo de seleção, aptâmeros de DNA de fita simples ligados a células bacterianas dominaram a mistura de DNA. Neste momento foi realizada a clonagem dos oligonucleotídeos utilizando o vetor *pGEM T-easy* (Promega, Madison, EUA), conforme recomendações do fabricante. O DNA do vetor pGEM contendo a inserção foi transformado em cepa de *E. coli* DH5α quimiocompetente. A cepa de *E. coli* transformada foi cultivada em caldo LB *overnight.* Pela manhã 1 mL do caldo foi transferido para frasco de vidro contendo 100 mL de LB fresco. A solução de cultura é colocada novamente para crescimento a 37 ºC até atingir um DO_{600nm} 0,4-0,5, seguida de incubação em gelo por 20 minutos. A cultura é centrifugada a 4000 rpm por 15 min a 4 °C, ressuspensa em 20 mL de cloreto de cálcio ($CaCl_2$) frio e incubada por 20 minutos em gelo. Em seguida, a cultura foi centrifugada, o *pellet* bacteriano foi lavado quatro vezes com 5 mL de $CaCl_2$ frio e por fim ressuspenso em 300 μL de $CaCl_2$ e incubado por 2 horas em gelo. Após, 10

*µ*L do produto da reação de ligase do pGEM foram adicionados e incubados por mais 30 minutos, seguidos por 2 minutos a 52 °C. Neste momento, 1 mL de LB frio foi adicionado e incubado por 1 hora a 37 °C com agitação suave (150 *rpm*). 200 *µ*L dessa suspensão foram plaqueados em ágar LB suplementado com ampicilina 100 *µ*g/mL (Invitrogen, Waltham, EUA). O DNA das colônias cultivadas na presença do antibiótico foi extraído por lise térmica (Pacheco *et al*., 1997), amplificado com os iniciadores M13 (M13F 5'-CACGACGTTGTAAAACGAC- 3 'e M13R 5'-CAGGAAACAGCTAT GACC-3') visando o sítio múltiplo de clonagem do plasmídeo. O produto do PCR foi purificado utilizando o kit comercial *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare, Amersham Place, Reino Unido) e sequenciado pela tecnologia de *Sanger MegaBACE 1000* (ABI 3730 DNA Analyzer; Applied Biosystems, Alameda, CA) utilizando ambos os iniciadores M13F e M13R para confirmar a sequência do aptâmero.

3.3.2 Montagem da estrutura secundária

A estrutura secundária do aptâmero foi prevista usando o programa *RNAstructure tools* versão 6.0.1 (Bellaousov *et al*., 2013).

3.4 Testes de afinidade

3.4.1 Ensaios de fluorescência

3.4.1.1 Fluorímetro

A especificidade de ligação dos aptâmeros selecionados contra células de *K. pneumoniae* e *A. baumannii* foi analisada em fluorímetro. Inicialmente, os aptâmeros foram marcados com fluoresceína 6-FAM por meio de uma reação de PCR como descrito anteriormente, porém agora com iniciadores marcados com 5' 6-FAM (IDT, Coralville, EUA). Os aptâmeros marcados foram incubados, por 45 minutos, sob proteção da luz, com as células bacterianas. Aptâmeros selecionados contra *K. pneumoniae* foram incubados com *K. pneumoniae, A. baumannii e S, aureus.* Aptâmeros selecionados contra *A. baumannii* foram incubados com *A. baumannii, K. pneumoniae e S. aureus.* Em seguida, as células foram lavadas com 1 mL de PBS e 100 µL foram aplicados em placas de 96 poços e o material foi lido em um filtro de emissão de 530 nm e excitação de 488 nm (*FilterMax F5, Molecular Devices).* A fluorescência após a incubação de cada isolado foi normalizada usando o valor de fluorescência de cada célula bacteriana sem o aptâmero fluorescente. Este experimento foi realizado em triplicata e repetido seis vezes.

3.4.1.2 Citometria de fluxo

A citometria de fluxo foi realizada inicialmente apenas após a identificação do aptâmero, porém ao longo do projeto passou-se a utilizá-la após cada ciclo de seleção para avaliar a preferência de ligação dos aptâmeros às células testadas. As células bacterianas foram preparadas incubadas por 45 minutos com os aptâmeros marcados com fluoresceína 6-FAM, como no processo descrito acima para verificação no fluorímetro, lavadas com *FACSFLOW* (BD) e ressuspensas em 500 μL de *FACSFLOW* para análise no citômetro *FORTESSA* (BD), esta metodologia foi otimizada a partir do protocolo utilizado por Soundy e Day (2017). Os dados foram coletados no software BD FACSDIVA® (BD Biosciences®) e analisados no Flowjo V10®.

3.4.1.3 Microscopia de fluorescência

Além da citometria de fluxo, após a incubação da bactéria com os aptâmeros fluorescentes, 10 μL da solução foram depositados sobre uma lâmina e cobertas com lamínula (Song *et al*., 2017). As células foram observadas em um microscópio fluorescente Zeiss 466300 usando uma objetiva de 100x e no microscópio confocal Zeiss LSM 780-NLO (Jena, Alemanha).

3.5 Teste *in vitro* – inoculação direta e *Time kill*

Uma vez identificados, um dos aptâmeros foi quimicamente sintetizado pela IDT (Coralville, IA, EUA) para testes *in vitro*. O aptâmero foi incubado com células bacterianas de *Acinetobacter baumannii* ou *K. pneumoniae*. Adicionalmente, 25 µL de solução de TE ou aptâmero em diferentes concentrações (10 µM, 1 µM, 0,1 µM e 0,01 µM) foi adicionado a uma camada bacteriana (*K. pneumoniae* ou *A. baumannii*) a 0,5 *McFarland* com e sem tioureia a 5 µM em MH agar. Além disso, o ensaio de *time-kill* foi conduzido conforme descrito por Petersen *et al*. (2006). Resumidamente, uma suspensão da bactéria a 0,5 *McFarland* foi diluída 1:100 em caldo *Mueller-Hinton* (MHB) com aptâmero a 0,5 µM ou TE (controle) com e sem tioureia a 0,05M para inibição da DNase e incubada a 37 °C com agitação de 250 rpm. As alíquotas foram retiradas nos tempos 0, 2, 4, 6 e 24 horas pós-inoculação e diluídas seriadamente em solução salina para contagem de UFC em placas de ágar triptícase de soja (TSA). Três experimentos biológicos foram realizados para cada condição.

3.6 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram baseadas no teste T paramétrico e T não paramétrico utilizando o teste de Mann Whitney e teste de Wilcoxon utilizando o GraphPad prisma 8.3.

4 RESULTADOS

4.1 Padronização do protocolo Cell-SELEX

Diferentes protocolos *SELEX* (Sefah *et al*., 2010; Kim *et al*., 2012; Heiat *et al*., 2017) foram testados, combinados e otimizados para chegar a uma metodologia sem necessidade de kits comerciais, os quais comumente são onerosos e dependem de técnicas e equipamentos altamente tecnológicos. Ao longo de 4 anos otimizou-se temperaturas e intervalos de incubação, centrifugação e ligação, bem como as reações de PCR convencional e em tempo real. A técnica padronizada de *Cell-SELEX* está resumida nas Figuras 1 e 2 e o custo médio desta metodologia foi de aproximadamente 301,50 dólares por aptâmero selecionado.

4.2 Controle de seleção - qPCR

Após cada ciclo de seleção o produto era submetido a reação de PCR em tempo real para confirmar a presença de aptâmeros e avaliar manutenção da amplificação específica ao longo dos ciclos de amplificação (Figura 5A). A cada ciclo de seleção o produto era aplicado em um gel de agarose 3% para que pudéssemos visualizar a presença de bandas no tamanho desejado (Figura 5D). Quando se notava amplificação inespecífica (Figura 5C e 5E) o produto de PCR era purificado utilizando separação por gel de agarose ou diálise, onde 100 *u*L da solução contendo os aptâmeros são colocados em um filtro de membrana flutuante com objetivo de dessalinização (Budowle *et al*., 1981).

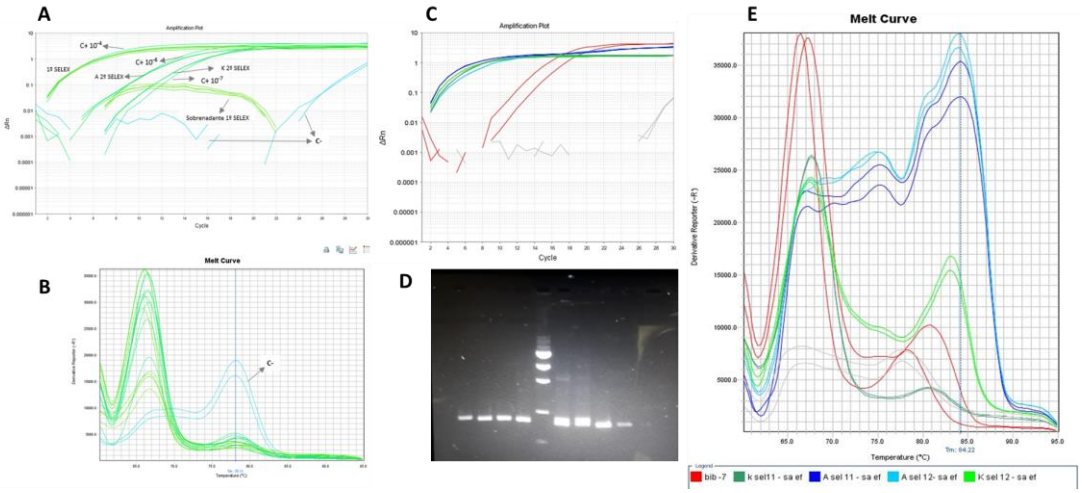


Figura 5 - Demonstração da reação de PCR em tempo real mostrando as curvas de amplificação dos aptâmeros selecionados seguindo a curva de amplificação da biblioteca, usada como controle positivo (A). Curva Melt comparando a curva de dissociação dos iniciadores entre aptâmeros e controles positivos e negativos (B). Reação de PCR em tempo real mostrando amplificação de produtos inespecíficos, os quais seguem a curva de amplificação do controle positivo, porém não seguem a curva de dissociação dos iniciadores (C e E). Gel mostrando bandas do produto de amplificação da figura A (D)

4.3 Controle de seleção – Seleção negativa

Com intenção de se selecionar aptâmeros específicos foi realizada seleção negativa, inicialmente utilizando *K. pneumoniae* para *A. baumannii* e *viceversa.* Além da seleção negativa reversa, também utilizamos *S. aureus* e *C. albicans* (Figura 4). Após cada incubação com as células bacterianas designadas para seleção negativa, após a incubação utilizou-se o sobrenadante com os oligonucleotídeos que não se ligaram a célula bacteriana utilizada no processo de seleção negativa para seguir com os ciclos de seleção.

4.4 Identificação do aptâmero

4.4.1 Clonagem

Antes do sequenciamento, os oligonucleotídeos selecionados foram clonados. As colônias de *E. coli* DH5α contendo PGEM® carregando o aptâmero foram confirmadas por PCR usando os iniciadores APT-F e APT-R. Uma vez que os aptâmeros são fragmentos muito pequenos e podem não interferir na função do gene da β-galactosidase, a seleção de PGEM® de colônias azuis/brancas não foi utilizada.

4.4.2 Sequenciamento de Sanger

As sequências dos oligonucleotídeos selecionados foram identificadas pelo método de sequenciamento Sanger. O sequenciamento de Sanger revelou as seguintes sequências de aptâmeros para *K. pneumoniae* e *A. baumannii*, flanqueada pelos iniciadores APTF e APTR:

Klebsiella pneumoniae

K24: CAGGGGACGCACCAAGGTTAAACTTATATTTTTTTTATTTTTTTTAC CATGACCCGCGTGCTGCGTGAT

K27: CAGGGGACGCACCAAGGTATTTGTTTTATTTTTTTTTTTTTaTTaTC CATGACCCGCGTGCTGCGTGAT

K28: CAGGGGACGCACCAAGGTTTCCTTTTTTTGTTTTTTTTTTTTTTTtC CCATGACCCGCGTGCTGCGTGAT

K01.2: ATGAGAGCGTCGGTGTGGTACACGCATACGTATTTGGTCCTCC CCTCTCTGCCGCACCCCCTTTGTACTTCCGCACCCTCCTACA

K02.2: ATGAGAGCGTCGGTGtGGTAGCCACTAGCCTTCCCCCCCTATC CTWGCCWGCTWGTCCCCGCCWGTACTTCCGCACCCTCCTACA

K03.2: ATGAGAGCGTCGGTGTGGTAACGAGCAGCATTTCCCCTCCCTC ATCCGTGTTTAGTTGCCCCACGTACTTCCGCACCCTCCTACA

K06.2: ATGAGAGCGTCGGTGTGGTAGCCCCTTTTTTGCTCCTCTCCCC TTCGACTCTTTGCCATCCCGTGTACTTCCGCACCCTCCTACA

K08.2: ATGAGAGCGTCGGTGTGGTACATCGTGTCTCAACCATCCCTCT ATCGACCCTCTGTTCTTGCTTGTACTTCCGCACCCTCCTACA

K10.2: ATTAGAGCGTCGGTGTGGTATACCTCATTTGAATTCATCGTCCC CGGTTCTGGCGTTCCTGCATGTACTTCCGCACCCTCCTACA

Acinetobacter baumannii

A01: CAGGGGACGCACCAAGGTTTTGTTTTTTCTTTGCTTCTTTTTGCTT TTTTTTCCATGACCCGCGTGCTGAT

A02: CAGGGGACGCACCAAGGTTATTTTCAGTTTTTTTTCTTTTTTTTTTT ACCATGACCCGCGTGCTGCGTGAT

A14: CAGGGGACGCACCAAGGTACATGTTTTTTTTATTTTTATTATTTTTT TCTTCCATGACCCGCGTGCTGCGTGAT

A20: CAGGGGACGCACCAAGGTTTTACTTTCTGATCTTGTATTTTATTTG TTTTCCATGACCCGCGTGCTGCGTGAT

A02.2: ATGAGAGCGTCGGTGTGGTATGCACGGACTGTATAACGCCTTC CATATGACCTCCTCCCACTGTGTACTTCCGCACCCTCCTACA

A05.2: ATGAGAGCGTCGGTGTGGTATTGTGAAAACAGTCCCGCTGCAA TGTCTGATGCCCCTCTCCGCTGTACTTCCGCACCCTCCTACA

A06.2: ATGAGAGCGTCGGTGTGGTAGCCGAACCATGATCCCACTCAAC CTACTTCACATCTCTGCCCGTGTACTTCCGCACCCTCCTACA

A08.2: ATGAGAGCGTCGGTGTGGTATCACTTTTACCCTTGTATAACTCTC TTCTATATGTGTTCGCCTTGTACTTCCGCACCCTCCTACA

4.4.3 Estrutura secundária

A predição da estrutura secundária pelo *RNAstructure MaxExpect* revelou a estrutura composta por pares de bases mais prováveis dos aptâmeros K24, K27, K28, K01.2, K02.2, K03.2, K06.2, K08.2 e K10.2 contra *K. pneumoniae* (Figura 6) e aptâmeros A01, A02, A14, A20, A02.2, A05.2, A06.2 e A08.2 contra *A. baumannii* (Figura 7). O programa *RNAMaxExpect Results* gera uma estrutura composta por pares de bases altamente prováveis que podem ter maior fidelidade na previsão da estrutura (Bellaousov *et al*., 2013).

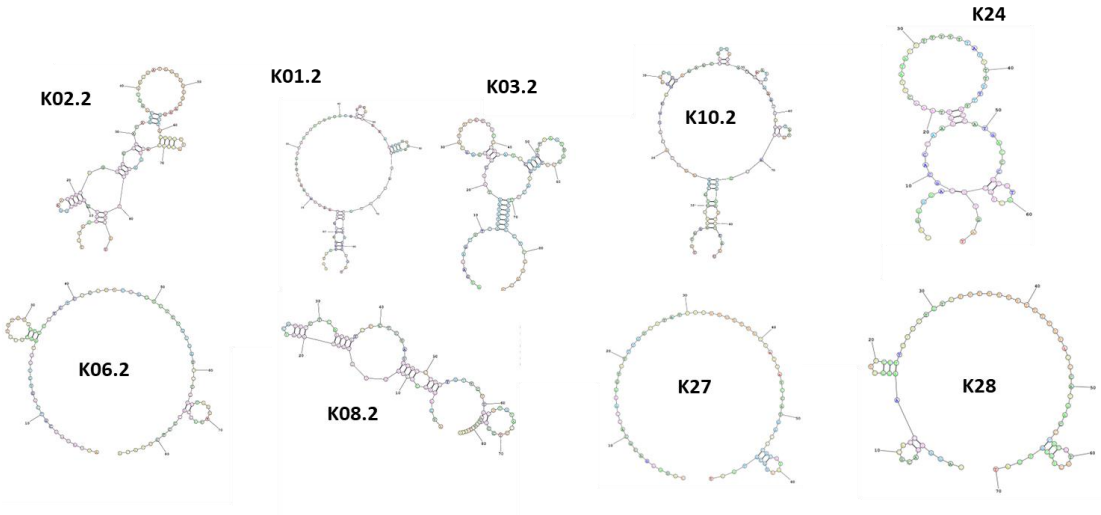


Figura 6 - Previsão da estrutura secundária do DNA dos aptâmeros contra *K. pneumoniae* utilizando *RNAMaxExpect results structure* do pacote de *software RNAstructure*

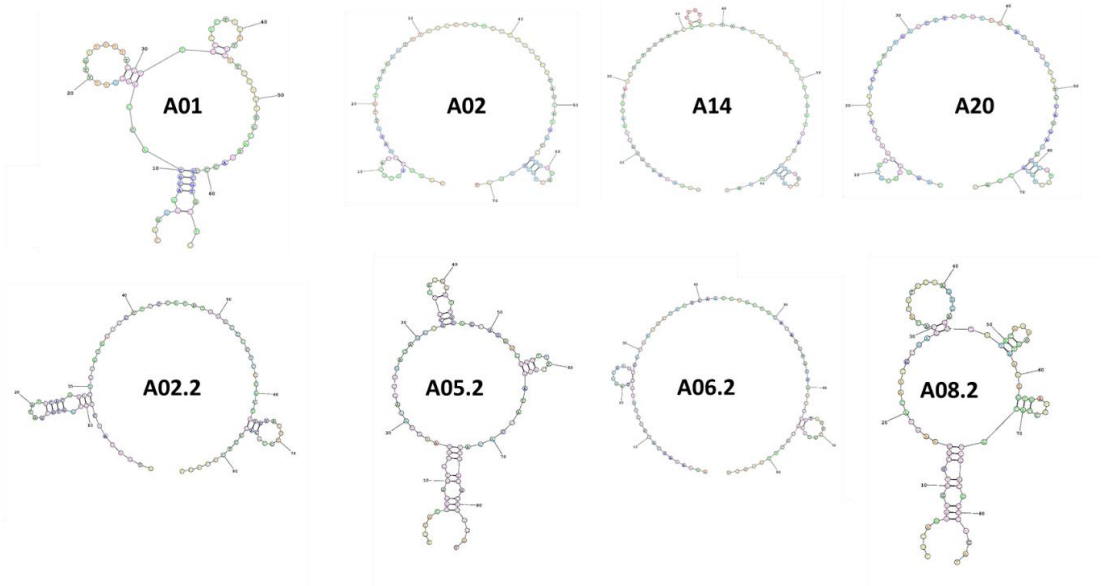
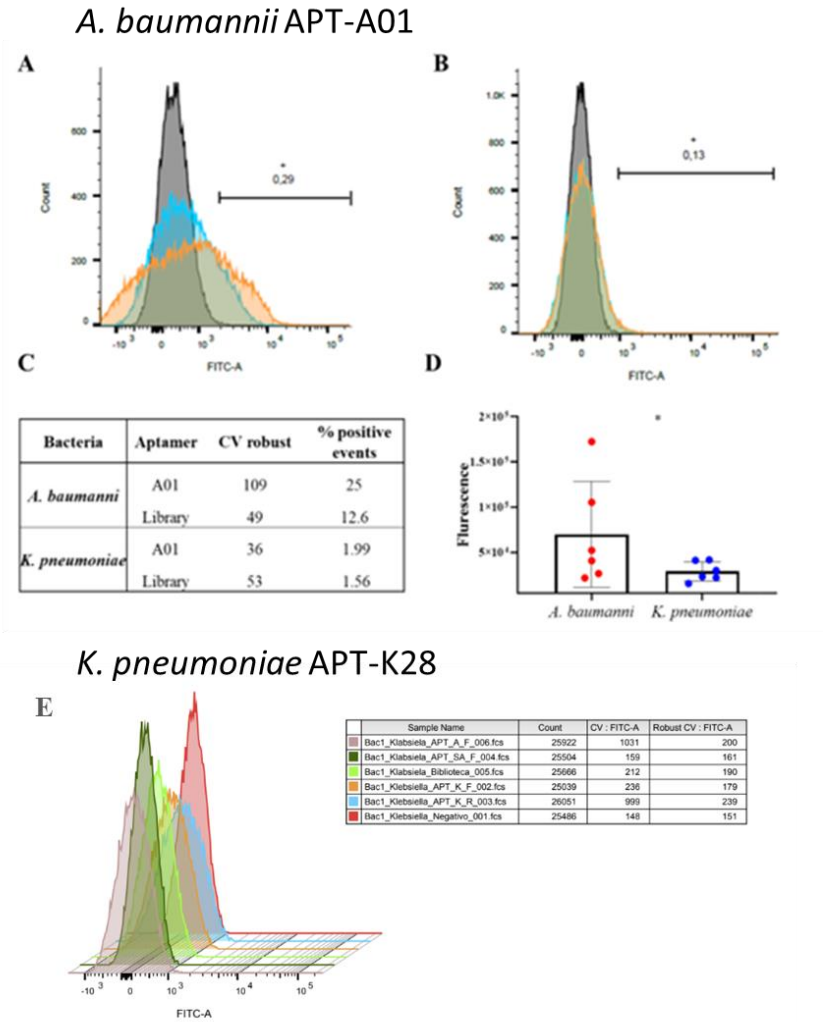


Figura 7 - Previsão da estrutura secundária do DNA dos aptâmeros contra *A. baumannii* utilizando *RNAMaxExpect results structure* do pacote de *software RNAstructure*

4.5 Ensaios de fluorescência

4.5.1 Citometria de fluxo

Inicialmente utilizou-se citometria de fluxo apenas após a seleção e identificação de aptâmeros contra *K. pneumoniae ou A. baumannii.* Foi realizada citometria de fluxo para avaliar a afinidade de ligação utilizando os aptâmeros K28 e A01 (Figura 8). O aptâmero A01, selecionado para *A. baumannii, foi* sintetizado e submetido a ensaios de fluorescência para avaliar a especificidade de ligação ao alvo bacteriano. Células de *A. baumannii*, *K. pneumoniae, S. aureus* e *C. albicans* foram utilizados como alvo. Quando avaliados individualmente, o ensaio de citometria de fluxo mostrou uma mudança significativa no pico de fluorescência para células de *A. baumannii* quando incubadas com o aptâmero A01 (Figura 8A) do que com a biblioteca (Figura 8A azul) e células bacterianas isoladas (controle negativo; Figura 8A cinza). A porcentagem de eventos positivos acima do controle negativo foi duas vezes maior para A01 em comparação com a biblioteca (25% e 12,66% respectivamente; Figura 8D). Essas diferenças não são evidenciadas quando o aptâmero A01 é incubado com *K. pneumoniae* (Figura 8B) ou com *C. albicans* (Figura 8C). Os resultados do ensaio de fluorímetro corroboram com os achados da fluorescência, apresentando uma fluorescência significativamente maior quando A01 marcado com FAM foi incubado com células de *A. baumannii*, do que quando incubado com *K. pneumoniae* ou células de *S. aureus* (Figura 8D). O aptâmero K28 não demonstrou preferência de ligação por *K. pneumoniae* quando comparado com *S. aureus*, *A. baumannii* e com a biblioteca randômica (Figura 8E).



Bacteria	Aptamer	CV robust	% positive events
A. baumanni	A01	109	25
	Library	49	12.6
K. pneumoniae	A01	36	1.99
	Library	53	1.56

Figura 8 - Citometria de fluxo aptâmeros K28 e A01

Devido a falta de atividade bactericida nos aptâmeros selecionados inicialmente, uma nova biblioteca randômica foi sintetizada e o processo de seleção de aptâmeros especificos reiniciado. Nesta segunda abordagem passou-se a utilizar a citometria de fluxo como ferramenta para avaliar a especificidade de ligação dos aptâmeros ao alvo. O experimento foi realizado após de cada ciclo de seleção, utilizando o alvo de ligação sem o aptâmero (*K. pneumoniae ou A. baumannii*) como controles negativos e os mesmos alvos após incubação com aptâmeros como amostra. Não foi

utilizado controle positivo. O ensaio de citometria de fluxo mostrou um deslocamento no pico de fluorescência para células de *K. pneumoniae* do primeiro ao quinto ciclo de seleção, o qual começa a desaparecer no sétimo ciclo e desaparece completamente até o nono ciclo de seleção. Foram realizadas cinco tentativas, retomando a partir dos ciclos anteriores, sem sucesso (Figura 9). As células de *A. baumannii* quando incubadas com o com produto de cada ciclo de seleção a elas designado, quando comparados com a com a biblioteca ou com as células bacterianas isoladas mostraram preferência significativa pelas células de *A. baumannii*. O deslocamento do pico de fluorescência se mantém até o último ciclo de ligação (16º ciclo) em relação ao controle negativo (Figura 10).

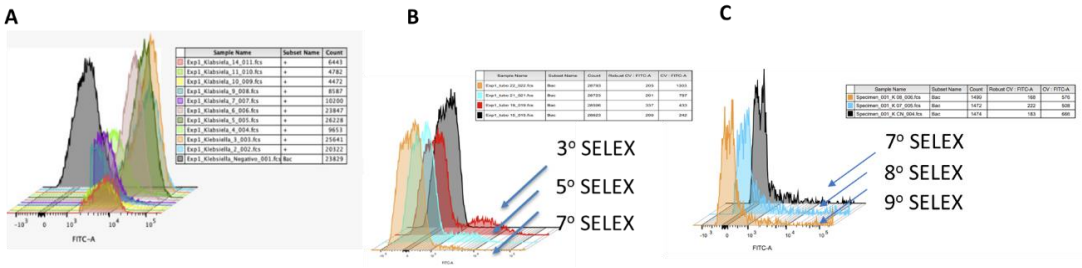


Figura 9 - Citometria de fluxo para *K. pneumoniae* do primeiro ao quinto ciclo de seleção mostrando um deslocamento no pico de fluorescência, o qual começa a desaparecer no sétimo ciclo e desaparece completamente até o nono ciclo de seleção

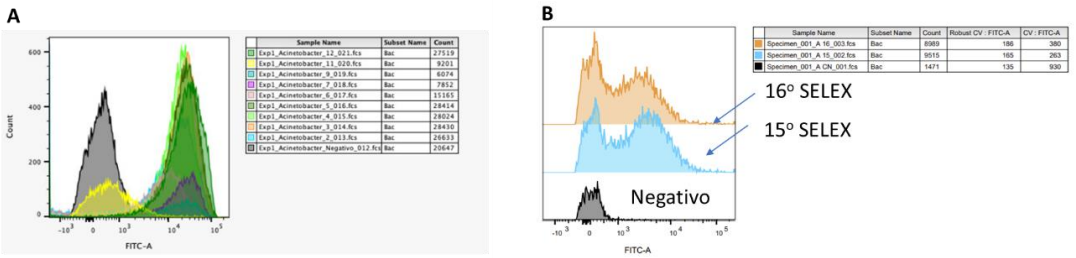


Figura 10 - Citometria de fluxo para *A. baumannii* do primeiro ao 16o ciclo de ligação mostrando manutenção do deslocamento do pico de fluorescência em relação ao controle negativo

4.5.2 Ensaios de fluorescência – Fluorímetro

Os resultados do ensaio de fluorímetro corroboram com os achados da fluorescência, apresentando uma fluorescência significativamente maior quando aptâmeros marcados com *FAM* foram incubados com as células bacterianas dos seus alvos designados do que quando incubado com os controles. O APT-A01 apresentou diferença estatisticamente significativa na intensidade de fluorescência quando incubado com *A. baumannii* (p valor = 0,009) em comparação quando incubado com a biblioteca randômica, utilizando *teste t-student* pareado, com os valores obtidos em duplicata. O APT-A01 também apresentou maior intensidade de fluorescência em células de *A. baumannii* quando comparado a células bacterianas de *K. pneumoniae* e (p valor = 0,.0166) *S. aureus* (p valor = 0,0291), Figura 11A). A maioria dos aptâmeros selecionados contra *K. pneumoniae,* quando incubados com a célula de *K. pneumoniae,* não apresentaram diferença significativa quando comparados com a célula de *K. pneumoniae* incubada com a biblioteca randômica, a análise foi realizada utilizando test t-student pareado. O APT-K27 foi o único que apresentou diferença de intensidade na fluorescência (p valor = 0,0039) em comparação a biblioteca, então foi testado em isolados de *A. baumannii* (p valor = 0,849) e *S. aureus* (p valor = 0,071), porém não apresentou diferença significativa na fluorescencia em comparação a cepas de *K. pneumoniae* (Figura 11B).

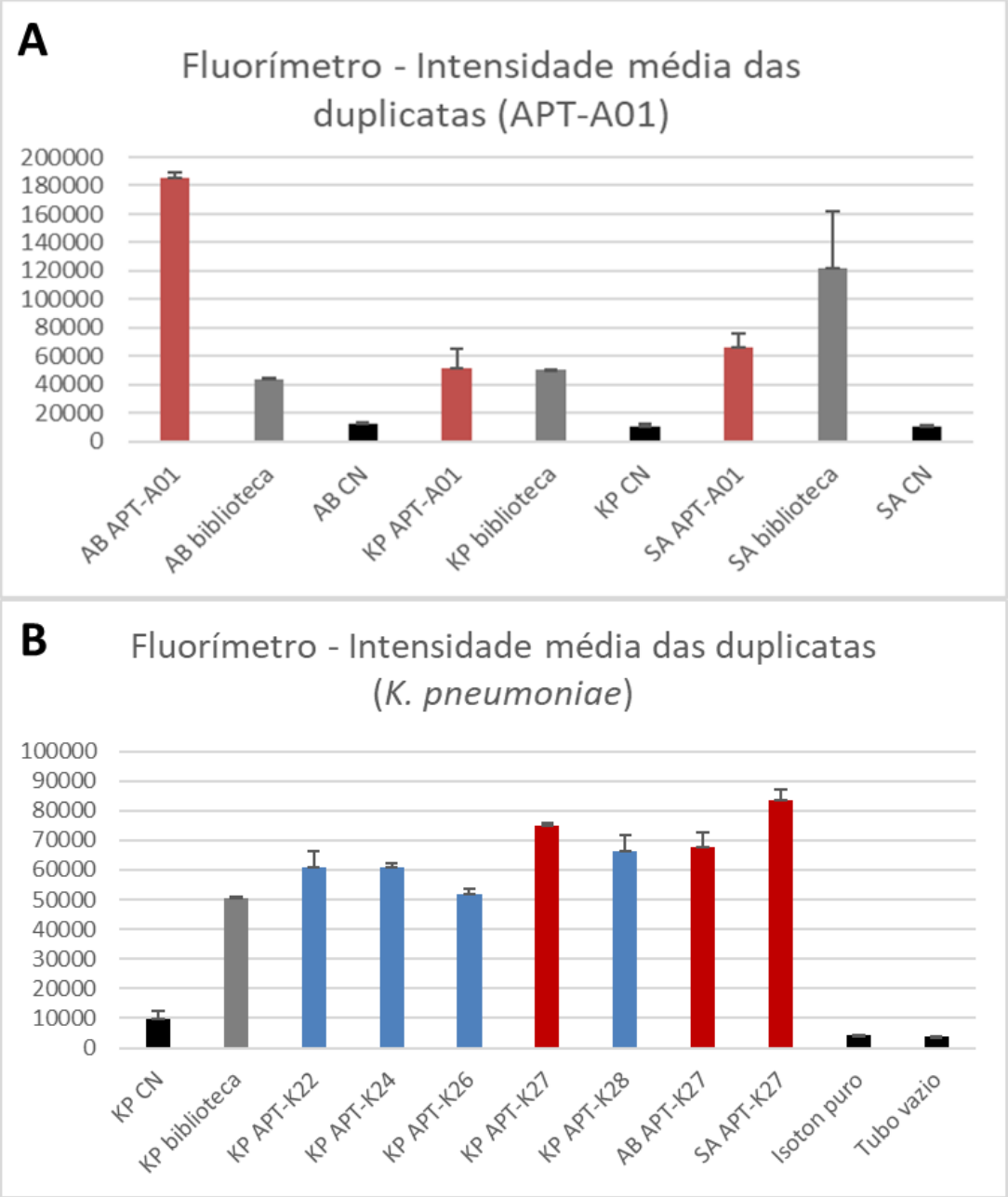


Figura 11 - Exemplo de ensaios de fluorescência em fluorímetro; 10A: utilizando o aptâmero A01, mostrando evidente a diferença na intensidade de fluorescência entre o aptâmero A01 quando incubado com *A. baumannii* em comparação quando incubado com outras células bacterianas (*K. pneumoniae* e *S. aureus*). 10B: Utilizando aptâmeros selecionados para K. pneumoniae incubados com a mesma. O APT K27, por ter apresentado diferença de intensidade de fluorescência, foi também testado em *A. baumannii* e *S. aureus*

4.5.3 Ensaios de fluorescência – Microscopia

A microscopia evidenciou concentração da fluorescência sobre as células de *A. baumannii* quando incubados com o aptâmero A01 marcado com FAM, nenhum sinal de fluorescência foi evidenciado quando o aptâmero A01 foi incubado com células de *K. pneumoniae* (Figura 12). O experimento foi realizado em duplicata, confirmando o resultado.

Quanto à avaliação por microscopia de fluorescência dos aptâmeros selecionados contra *K. pneumoniae*, marcas inespecíficas de fluorescência foram visualizadas no campo e sobre as células.

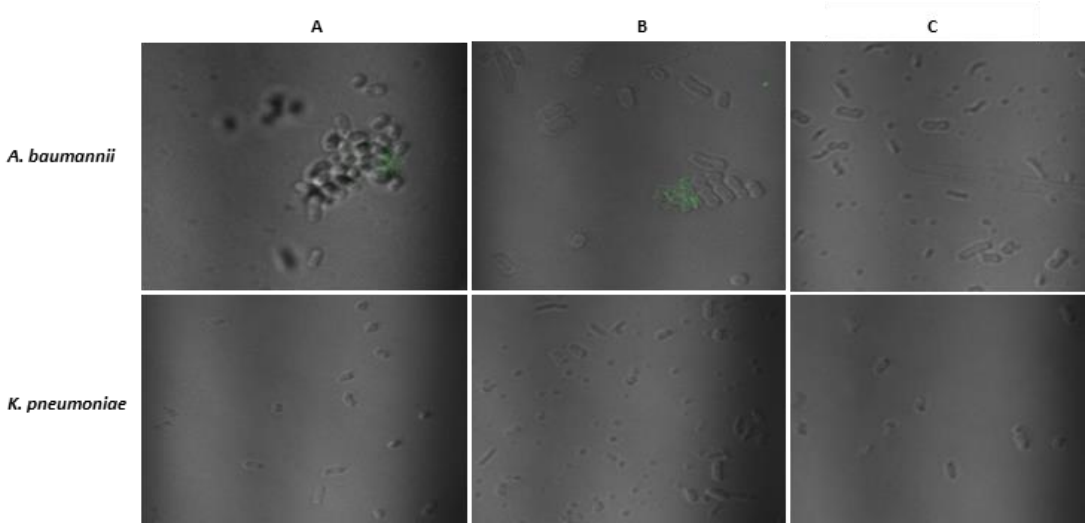


Figura 12 - A microscopia evidenciou marcas de fluorescência sobre as células de *A. baumannii* quando o aptâmero foi incubado com *A. baumannii*, as quais não foram evidenciadas quando o aptâmero A01 foi incubado com células de *K. pneumoniae* (A e B). O controle negativo utilizando células de *K. pneumoniae* e *A. baumannii* isoladas não apresentou evidência de fluorescência (C)

4.6 Análise do aptâmero *in vitro*

Optamos por testar inicialmente os APT K24, K27, K28 e A01, baseados nas diferenças estruturais em relação aos outros dois APTs. O possível efeito da ligação do aptâmero à superfície celular de *K. pneumoniae* foi estudado por duas técnicas *in vitro*. A solução contendo aptâmeros foi inoculada sobre o tapete bacteriano após a diluição das células bacterianas em solução salina 0,9% (Figura 13A) e também após crescimento das células em caldo LB (Figura 13B). A solução de aptâmeros a 10 μM, 1 μM, 0,1 μM e 0,01 μM foi inoculada sobre o tapete bacteriano, mas não foi capaz de inibir o crescimento, mesmo quando tioureia foi adicionada para inibir a ação de possíveis DNases liberadas no meio. Foi realizado também o ensaio de *Time Kill* utilizando *A. baumannii* com o aptâmero A01 a 0,5 µM e tampão TE, inicialmente sem tioureia e após com tioureia adicionada a 5 µM. Teste t não paramétrico foi aplicado para cada ponto de tempo, $p = 0,25$ para 2h; $p = 0,88$ para 4h; $p = 0,88$ para 6h e $p = 0,66$ para 24h, não mostrando significância estatística (Figura 13C).

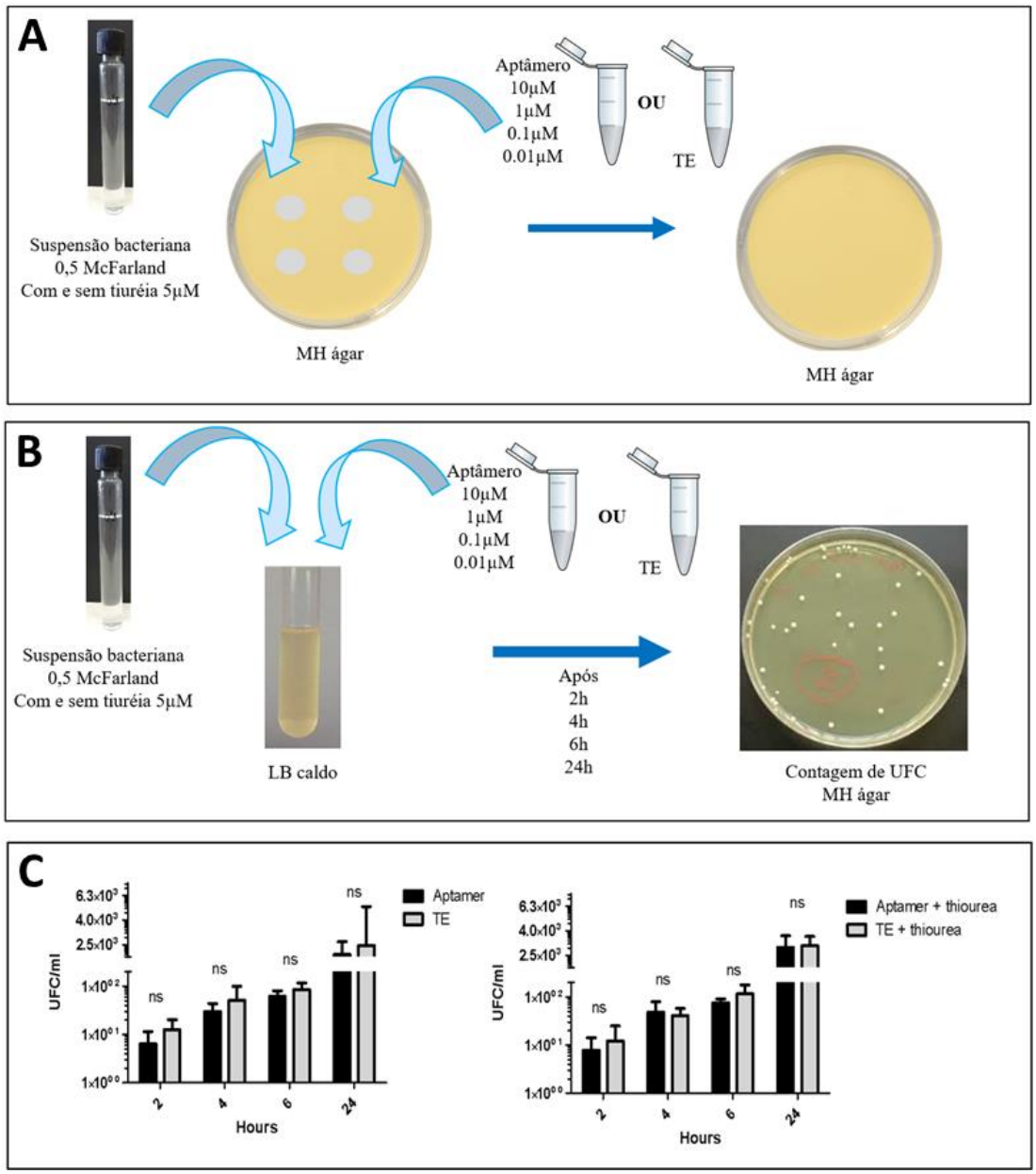


Figura 13 - Esquematização dos testes *in vitro*. A solução contendo aptâmeros foi inoculada sobre o tapete bacteriano após a diluição das células bacterianas em solução salina 0.9% (A) ou após crescimento das células em caldo LB (B). Ensaio de *Time Kill* utilizando *A. baumannii* com o aptâmero A01 a 0,5 *µ*M (coluna preta) e tampão TE (coluna cinza) inicialmente sem tioureia e após com tioureia adicionada a 5 *µ*M (C).

Até o momento, entre os aptâmeros identificados, nenhum apresentou atividade bactericida contra *K. pneumoniae ou A. baumannii.*

5 DISCUSSÃO

Com o crescente aumento da resistência antimicrobiana a demanda por novas tecnologias capazes de diagnosticar e tratar rapidamente estas infecções é premente. As tecnologias baseadas em peptídeos e oligonucleotídeos, como os aptâmeros, vêm se mostrando promissoras em diversas áreas. Na resistência bacteriana, no entanto, mesmo com aumento do número de aptâmeros em desenvolvimento para enterobactérias patogênicas e não fermentadoras ao longo dos anos, ainda há muito a ser feito. Atualmente, há apenas nove publicações se referindo à identificação de novos aptâmeros para este grupo de agentes.

No presente estudo a técnica de seleção de aptâmeros para célula bacteriana inteira (*Cell-SELEX*), foi padronizada com redução do custo da seleção e da demanda de equipamentos em comparação com metodologias previamente estabelecidas (Sefah *et al*., 2010; Kim *et al*., 2012; Heiat *et al*., 2017). Devido às modificações na técnica de identificação de aptâmeros e padronização da metodologia *in-house,* o grupo identificou aptâmeros estruturalmente distintos para *K. pneumoniae* (9) e para *A. baumannii* (8). Mesmo sem relatos prévios na literatura de aptâmeros específicos para *K. pneumoniae*, estes achados melhoram as expectativas no desafio contra a resistência antimicrobiana.

A metodologia *SELEX* depende de vários parâmetros, incluindo pH, temperatura, configurações de ligação, concentração e conformação do aptâmero (Zhou e Rossi, 2017). Para atingir as condições ideais, KITs comerciais foram produzidos. No entanto, mesmo com esses, a tecnologia tem acesso reduzido, especialmente em países em desenvolvimento. Portanto, focou-se, inicialmente, em padronizar uma técnica a qual não necessita de kits comerciais. Associado ao conhecimento prévio sobre pareamento de ácidos nucleicos com os avanços nas tecnologias de sequenciamento, estrutura e computação, aumentou-se a possibilidade de desenvolver uma técnica de baixo custo podendo ser facilmente reproduzida. O custo médio para uma seleção e identificação de aptâmeros é de cerca de US$ 4000,00 para sequências individuais de aptâmeros (Zou *et al*. 2019). Aqui, apresentou-se uma alternativa que custa cerca de US$ 300,00 por sequência de aptâmero, o que pode estimular promover o estudo e a compreensão dos aptâmeros.

Até o momento, identificou-se e se descreveu nove aptâmeros estruturalmente distintos para *K. pneumoniae* e oito para *A. baumannii*. Destes, o aptâmero A01 mostrou ligação significativa às células de *A. baumannii* quando comparado com *K. pneumononiae* (Farrel Côrtes *et al*,. 2022). Mesmo entre os demais oligonucleotídeos, análises *in vitro* demonstraram preferência pela célula bacteriana designada.

Um dos maiores desafios no estudo foi o processo de triagem, o que corrobora com a literatura (Rasoulinejad e Gargari, 2016; Zou *et al*., 2019). Muitas vezes com dezenas de tentativas frustradas, sem seleção de

ligantes, outras vezes isolando sequências inespecíficas as quais possuem afinidade por múltiplas estruturas. Uma importante desvantagem do método de seleção do aptâmero é que o sucesso da seleção não pode ser previsto. Além dos ciclos de seleção sem sucesso, um problema comumente enfrentado durante nossos experimentos foi o viés de PCR, associado a presença de resíduos e ligantes inespecíficos (Rozenblum *et al*., 2016). Para remoção destes ligantes foi realizada purificação da amostra por meio de eletroforese em gel de agarose ou diálise.

Além das dificuldades em relação a técnica, outra limitação deste estudo vem sendo o isolamento de aptâmeros de alta afinidade por bactérias Gram-negativas. Uma vez que a membrana externa possui carga negativa, estas bactérias repelem os ácidos nucleicos com carga negativa (Hamula *et al*., 2011), tornando o processo ainda mais desafiador.

Uma vez categorizados, os aptâmeros promissores podem ser modificados para melhor *fitness in vivo*, que incluem peguilação para melhorar a afinidade ou adição de bases resistentes a nuclease, como ácidos nucleicos bloqueados e análogos de nucleotídeo 2'-O-metil para resistência a nuclease e estabilidade metabólica (Sefah *et al*., 2010; Zou *et al*., 2019).

Na abordagem *SELEX* de célula inteira, células bacterianas vivas foram usadas para seleção e alvos foram apresentados aos ligantes na sua estrutura 3D natural. A conservação desta conformação nativa é essencial para a funcionalidade dos aptâmeros selecionados, uma vez que os aptâmeros apresentam maior afinidade para células viáveis quando

comparados a células inativadas (Rasoulinejad e Gargari, 2016). Por esta razão, aptâmeros selecionados com uma proteína purificada podem não o reconhecer em condições naturais (Rasoulinejad e Gargari, 2016). Devido a isso, outra abordagem promissora é a técnica chamada *SELEX* de precisão, descrita por Chen *et al*. (2020) e Yu *et al*. (2021). O grupo selecionou aptâmeros especificamente para bactérias produtoras de KPC-2 onde combinaram *SELEX* para proteína e *cell-SELEX* executando os primeiros quatro ciclos de seleção utilizando KPC-2 como alvo e, posteriormente, quatro ciclos utilizando a célula inteira de *E. coli* produtora de KPC-2. Desta maneira, inicialmente se seleciona aptâmeros a um alvo molecular específico e posteriormente se testa a ligação na sua forma de apresentação na célula viva.

Para identificação dos oligonucleotídeos selecionados, combinando o conhecimento prévio com o alinhamento de bases de ácidos nucleicos e avanços em sequenciamento, estrutura e tecnologias computacionais, é possível desenvolver uma técnica com regras de construção bem definidas para ser facilmente reproduzido. Durante o processo priorizamos a conservação de parâmetros básicos para um *SELEX* bem-sucedido, incluindo pH, temperatura, configurações de ligação, concentração de aptâmeros e conformação (Zhou e Rossi, 2017).

Mesmo abordando uma tecnologia potencialmente inovadora na área da resistência antimicrobiana, os estudos sobre aptâmeros para bactérias Gram-negativas ainda são limitados. O número de aptâmeros com capacidade de ligação forte e específica é reduzido e os desafios

permanecem na eliminação de atividades de ligação cruzada a outras moléculas em muitas amostras complexas do mundo real, como fluidos biológicos.

Melhorar o arranjo de seleção atual (*SELEX*) e desenvolver mais aptâmeros continua sendo a principal barreira para estudos relacionados a aptâmeros. Uma metodologia de seleção cuidadosamente projetada pode melhorar significativamente a especificidade dos oligonucleotídeos identificados. À medida que o campo de biossensores baseados em *ss*DNA continua a crescer, serão necessárias melhorias na metodologia para isolar mais rapidamente aptâmeros com a afinidade e especificidade desejadas.

Acredita-se que estes aptâmeros, bem como outros que estão em processo de seleção e identificação, possam ser utilizados futuramente para diagnóstico e tratamento de infecções por estes agentes.

6 CONCLUSÕES

- No presente estudo foram selecionados e identificados aptâmeros com capacidade de ligação específica para identificação de cepas bacterianas pandroga-resistentes, sendo nove oligonucleotídeos selecionados contra *Klebsiella pneumoniae* e oito contra *Acinetobacter baumannii.*

A estrutura tridimensional dos oligonucleotídeos foi identificada para que futuramente possamos otimizar a especificidade de ligação *in silico*.

- O aptâmero A01, contra *A. baumannii* demonstrou resultados promissores, pois apresenta significativa afinidade de ligação ás células de A. baumannii em relação a outras células, e potencialmente podera ser utilizado para desenvolvimento de dispositivo diagnostico. Os ensaios de fluorímetro e da fluorescência, evidenciaram que o APT-A01 apresentou diferença estatisticamente significativa na intensidade de fluorescência quando incubado com *A. baumannii* em comparação com a biblioteca randômica.
- Durante todo o processo de seleção de aptâmeros preconizamos redução de custos e otimizamos metodologias já descritas para que pudéssemos obter resultados similares, porém com menor gasto de insumos e necessidade de equipamentos de alta tecnologia.

A atividade bactericida dos aptâmeros selecionados em modelos de *K. pneumoniae* e *A. baumannii in vitro,* não foi significativa.

7 ANEXO

Anexo A - Aprovação do Comitê de Ética

MEDICINA
USP
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 08/05/2019, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **113/19** intitulado**: Desenvolvimento de aptâmeros contra Klebsiella pneumoniae multirresistentes** Apresentado pelo **Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias .**

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 466/12, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: Dra. Silvia Figueiredo Costa
Pesquisador (a) Executante: Dra Taniela Marli Bes

CEP-FMUSP, 08 de Maio de 2019.

Profa. Dra. Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina
e-mail: cep.fm@usp.br

8 REFERÊNCIAS

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Boletim de Segurança Do Paciente e Qualidade Em Serviços de Saúde Nº 14: Avaliação Dos Indicadores Nacionais Das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e Resistência Microbiana Do Ano de 2015 [internet]. 2016 [citado em: 13 jan. 2022]. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/33852/3074203/Boletim+de+Segurança+do+Paciente+e+Qualidade+em+Serviços+de+Saúde+nº+14+Avaliação+dos+indicadores+nacionais+das+Infecções+Relacionadas+à+Assistência+à+Saúde+%28IRAS%29+e+Resistência+microbiana/dbd57c96-9.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Nota técnica nº 01/2013 - Medidas de prevenção e controle de infecções por enterobactérias multirresistentes [internet]. 2013 [citada em: 29 ago. 2021]. Disponível em: https://cevs.rs.gov.br/upload/arquivos/201706/30132435-1369161512-nota-tec-01-2013-anvisa.pdf.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Programa Nacional de Prevenção e Controle de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (PNPCIRAS) 2016-2020 [internet] [citado em: 29 ago. 2021]. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/33852/3074175/PNPCIRAS+2016-2020/f3eb5d51-616c-49fa-8003-0dcb8604e7d9.

Bagley ST. Habitat association of Klebsiella species. *Infect Control*. 1985;6(2):52-8.

Bahari D, Babamiri B, Salimi A, Salimizand H. Ratiometric fluorescence resonance energy transfer aptasensor for highly sensitive and selective detection of Acinetobacter baumannii bacteria in urine sample using carbon dots as optical nanoprobes. *Talanta*. 2021;221:121619.

Baraniak A, Izdebski R, Herda M, Fiett J, Hryniewicz W, Gniadkowski M, Kern-Zdanowicz I, Filczak K, Łopaciuk U. Emergence of Klebsiella pneumoniae ST258 with KPC-2 in Poland. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(10):4565-7.

Baumann P, Doudoroff M, Stanier RY. A study of the Moraxella group. II. Oxidative-negative species (genus Acinetobacter). *J Bacteriol*. 1968;95(5):1520-41.

Bayuga S, Zeana C, Sahni J, Della-Latta P, el-Sadr W, Larson E. Prevalence and antimicrobial patterns of Acinetobacter baumannii on hands and nares of hospital personnel and patients: the iceberg phenomenon again. *Heart Lung*. 2002;31(5):382-90.

Beijerinck M. 1911. Pigmenten Als Oxydatieproducten Gevormd Door Bacteriën. *Versl Koninklijke Akad Wetensch Amsterdam.* 1911;19:1092-3.

Bellaousov S, Reuter JS, Seetin MG, Mathews DH. RNAstructure: Web servers for RNA secondary structure prediction and analysis. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(Web Server issue):W471-4.

Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. Amsterdã: Elsevier; 2014.

Berry GJ, Loeffelholz MJ, Williams-Bouyer N. An Investigation into Laboratory Misidentification of a Bloodstream Klebsiella variicola Infection. *J Clin Microbiol*. 2015;53(8):2793-4.

Bertani G. Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2, and other experimental systems. *J Bacteriol*. 2004;186(3):595-600.

Bertrand N, Wu J, Xu X, Kamaly N, Farokhzad OC. Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Adv Drug Deliv Rev*. 2014;66:2-25.

Bes T, Nagano D, Martins R, Marchi AP, Perdigão-Neto L, Higashino H, Prado G, Guimaraes T, Levin AS, Costa S. Bloodstream Infections caused by Klebsiella pneumoniae and Serratia marcescens isolates co-harboring NDM-1 and KPC-2. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2021;20(1):57.

Blossom DB, Srinivasan A. Drug-Resistant Acinetobacter Baumannii-Calcoaceticus Complex. *Infec Dis Clinical Prac*. 2008;16(1):1–3.

Boszczowski I, Salomão MC, Moura ML, Freire MP, Guimarães T, Cury AP, Rossi F, Rizek CF, Martins RCR, Costa SF. Multidrug-resistant Klebsiella pneumoniae: genetic diversity, mechanisms of resistance to polymyxins and clinical outcomes in a tertiary teaching hospital in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2019 Jun 19;61:e29.

Brasil. Câmara dos Deputados. Projeto de Lei nº 6492/2006: Dispõe sobre a dispensação de medicamentos contendo antimicrobianos [internet]. 2006 [citado em: 13 ago. 2022]. Disponível em: https://www.camara.leg.br/proposicoesWeb/prop_mostrarintegra;jsessionid=node0ffc94m05ls7ape27y16bg980328179.node0?codteor=367837&filename=PL+6492/2006.

Breurec S, Guessennd N, Timinouni M, Le TA, Cao V, Ngandjio A, Randrianirina F, Thiberge JM, Kinana A, Dufougeray A, Perrier-Gros-Claude JD, Boisier P, Garin B, Brisse S. Klebsiella pneumoniae resistant to third-generation cephalosporins in five African and two Vietnamese major towns: multiclonal population structure with two major international clonal groups, CG15 and CG258. *Clin Microbiol Infect*. 2013;19(4):349-55.

Brink AJ. Epidemiology of carbapenem-resistant Gram-negative infections globally. *Curr Opin Infect Dis*. 2019;32(6):609-16.

Brisse S, van Himbergen T, Kusters K, Verhoef J. Development of a rapid identification method for Klebsiella pneumoniae phylogenetic groups and analysis of 420 clinical isolates. *Clin Microbiol Infect*. 2004;10(10):942-5.

Brisse S, Verhoef J. Phylogenetic diversity of Klebsiella pneumoniae and Klebsiella oxytoca clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, gyrA and parC genes sequencing and automated ribotyping. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2001;51(Pt 3):915-924.

Bruno JG, Kiel JL. In vitro selection of DNA aptamers to anthrax spores with electrochemiluminescence detection. *Biosens Bioelectron*. 1999;14(5):457-64.

Budowle B, Acton RT, Barger BO. A method for dialysis of microsamples. *Anal Biochem*. 1981;118(2):399-400.

Casewell M, Phillips I. Hands as route of transmission for Klebsiella species. *Br Med J*. 1977;2(6098):1315-7.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Update: detection of a verona integron-encoded metallo-beta-lactamase in Klebsiella pneumoniae --- United States, 2010. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2010 Sep 24;59(37):1212.

Centers for Disease Control and Prevention. Antimicrobial resistances: about microbial ecology [internet]. 2022a [citado em: 13 ago. 2022]. Disponível em: https://www.cdc.gov/drugresistance/microbial-ecology.html.

Centers for Disease Control and Prevention. One health: combating antimicrobial restance in people and animans – a one health approach[internet]. 2022b [citado em: 13 ago. 2022]. Disponível em: https://www.cdc.gov/onehealth/in-action/combating-ar-in-people-and-animals.html.

Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo. Infecção hospilatar [internet]. 2019 [acesso em: 13 fev. 2020]. Disponível em: http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/infeccao-hospitalar/aulas/ih19_dados_ih2018.pdf.

Chen F, Zhou J, Luo F, Mohammed AB, Zhang XL. Aptamer from whole-bacterium SELEX as new therapeutic reagent against virulent Mycobacterium tuberculosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;357(3):743-8.

Chen J, Li H, Xie H, Xu D. A novel method combining aptamer-Ag10NPs based microfluidic biochip with bright field imaging for detection of KPC-2-expressing bacteria. *Anal Chim Acta*. 2020;1132:20-27.

Chusri S, Chongsuvivatwong V, Rivera JI, Silpapojakul K, Singkhamanan K, McNeil E, Doi Y. Clinical outcomes of hospital-acquired infection with Acinetobacter nosocomialis and Acinetobacter pittii. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(7):4172-9.

de Maio Carrillho CM, Gaudereto JJ, Martins RC, de Castro Lima VA, de Oliveira LM, Urbano MR, Perozin JS, Levin AS, Costa SF. Colistin-resistant Enterobacteriaceae infections: clinical and molecular characterization and analysis of in vitro synergy. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2017;87(3):253-7.

Ding JL, Gan ST, Ho B. Single-stranded DNA oligoaptamers: molecular recognition and LPS antagonism are length- and secondary structure-dependent. *J Innate Immun*. 2009;1(1):46-58.

Famulok M, Hartig JS, Mayer G. Functional aptamers and aptazymes in biotechnology, diagnostics, and therapy. *Chem Rev*. 2007;107(9):3715-43.

Farrel Côrtes M, Marli Bes T, Ribeiro Deo B, Barbosa Dos Anjos B, Jimenez Galisteo A Jr, Cerdeira Sabino E, Santos C, Figueiredo Costa S. Selection and Identification of a DNA Aptamer for Multidrug-Resistant Acinetobacter baumannii Using an In-House Cell-SELEX Methodology. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022 Jun 30;12:818737.

Friedlaender C. Ueber Die Schizomyceten Bei Der Acuten Fibrösen Pneumonie. *Archiv Für Pathologische Anatomie Und Physiologie Und Für Klinische Medicin.* 1882;87(2):319-24.

García-Fernández A, Villa L, Carta C, Venditti C, Giordano A, Venditti M, Mancini C, Carattoli A. Klebsiella pneumoniae ST258 producing KPC-3 identified in italy carries novel plasmids and OmpK36/OmpK35 porin variants. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(4):2143-5.

Gaynes R, Edwards JR; National Nosocomial Infections Surveillance System. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. *Clin Infect Dis*. 2005;41(6):848-54.

Gnanam AJ, Hall B, Shen X, Piasecki S, Vernados A, Galyov EE, Smither SJ, Kitto GB, Titball RW, Ellington AD, Brown KA. Development of aptamers specific for potential diagnostic targets in Burkholderia pseudomallei. T*rans R Soc Trop Med Hyg*. 2008;102 Suppl 1(0 1):S55-7.

Gnanam AJ, Hall B, Shen X, Piasecki S, Vernados A, Galyov EE, Smither SJ, Kitto GB, Titball RW, Ellington AD, Brown KA. Development of aptamers specific for potential diagnostic targets in Burkholderia pseudomallei. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2008;102 Suppl 1(0 1):S55-7.

Gorrie CL, Mirceta M, Wick RR, Edwards DJ, Thomson NR, Strugnell RA, Pratt NF, Garlick JS, Watson KM, Pilcher DV, McGloughlin SA, Spelman DW, Jenney AWJ, Holt KE. Gastrointestinal Carriage Is a Major Reservoir of Klebsiella pneumoniae Infection in Intensive Care Patients. *Clin Infect Dis*. 2017;65(2):208-15.

Graziani AC, Stets MI, Lopes ALK, Schluga PHC, Marton S, Mendes IF, Andrade ASR, Krieger MA, Cardoso J. High Efficiency Binding Aptamers for a Wide Range of Bacterial Sepsis Agents. *J Microbiol Biotechnol*. 2017;27(4):838-843.

Hallsworth M, Chadborn T, Sallis A, Sanders M, Berry D, Greaves F, Clements L, Davies SC. Provision of social norm feedback to high prescribers of antibiotics in general practice: a pragmatic national randomised controlled trial. *Lancet*. 2016;387(10029):1743-52.

Hamula CL, Zhang H, Guan LL, Li XF, Le XC. Selection of aptamers against live bacterial cells. *Anal Chem*. 2008;80(20):7812-9.

Hamula CLA, Zhang H, Li F, Wang Z, Chris Le X, Li XF. Selection and analytical applications of aptamers binding microbial pathogens. *Trends Analyt Chem*. 2011;30(10):1587-97.

Harding FA, Stickler MM, Razo J, DuBridge RB. The immunogenicity of humanized and fully human antibodies: residual immunogenicity resides in the CDR regions. *MAbs*. 2010;2(3):256-65.

Heiat M, Ranjbar R, Latifi AM, Rasaee MJ, Farnoosh G. Essential strategies to optimize asymmetric PCR conditions as a reliable method to generate large amount of ssDNA aptamers. *Biotechnol Appl Biochem*. 2017;64(4):541-8.

Higashino HR, Marchi AP, Martins RCR, Batista MV, Perdigão Neto LV, Lima VACC, Rossi F, Guimarães T, Levin AS, Rocha V, Costa SF. Colistin-resistant Klebsiella pneumoniae co-harboring KPC and MCR-1 in a Hematopoietic Stem Cell Transplantation Unit. *Bone Marrow Transplant.* 2019;54(7):1118-20.

Howard A, O'Donoghue M, Feeney A, Sleator RD. Acinetobacter baumannii: an emerging opportunistic pathogen. *Virulence*. 2012;3(3):243-50.

Hu J, Fu K, Bohn PW. Whole-Cell Pseudomonas aeruginosa Localized Surface Plasmon Resonance Aptasensor. *Anal Chem*. 2018;90(3):2326-32.

Jarvis WR, Munn VP, Highsmith AK, Culver DH, Hughes JM. The epidemiology of nosocomial infections caused by Klebsiella pneumoniae. *Infect Control*. 1985;6(2):68-74.

Jia X, Dai W, Ma W, Yan J, He J, Li S, Li C, Yang S, Xu X, Sun S, Shi J, Zhang L. Carbapenem-Resistant E. cloacae in Southwest China: Molecular Analysis of Resistance and Risk Factors for Infections Caused by NDM-1-Producers. *Front Microbiol*. 2018;9:658.

Joshi R, Janagama H, Dwivedi HP, Senthil Kumar TM, Jaykus LA, Schefers J, Sreevatsan S. Selection, characterization, and application of DNA aptamers for the capture and detection of Salmonella enterica serovars. *Mol Cell Probes*. 2009;23(1):20-8.

Kang JS, Yi J, Ko MK, Lee SO, Lee JE, Kim KH. Prevalence and Risk Factors of Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae Acquisition in an Emergency Intensive Care Unit in a Tertiary Hospital in Korea: a Case-Control Study. *J Korean Med Sci*. 2019;34(18):e140.

Kim SE, Su W, Cho M, Lee Y, Choe WS. Harnessing aptamers for electrochemical detection of endotoxin. *Anal Biochem*. 2012;424(1):12-20.

Kim SE, Su W, Cho M, Lee Y, Choe WS. Harnessing aptamers for electrochemical detection of endotoxin. *Anal Biochem*. 2012;424(1):12-20.

Kimoto M, Yamashige R, Matsunaga K, Yokoyama S, Hirao I. Generation of high-affinity DNA aptamers using an expanded genetic alphabet. *Nat Biotechnol*. 2013;31(5):453-7.

Kitchel B, Rasheed JK, Patel JB, Srinivasan A, Navon-Venezia S, Carmeli Y, Brolund A, Giske CG. Molecular epidemiology of KPC-producing Klebsiella pneumoniae isolates in the United States: clonal expansion of multilocus sequence type 258. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(8):3365-70.

Kliemann BS, Levin AS, Moura ML, Boszczowski I, Lewis JJ. Socioeconomic Determinants of Antibiotic Consumption in the State of São Paulo, Brazil: The Effect of Restricting Over-The-Counter Sales. *PLoS One*. 2016;11(12):e0167885.

Kloos WE, Musselwhite MS. Distribution and persistence of Staphylococcus and Micrococcus species and other aerobic bacteria on human skin. *Appl Microbiol*. 1975;30(3):381-5.

Krämer M, Kissmann AK, Raber HF, Xing H, Favella P, Müller I, Spellerberg B, Weil T, Kubiczek D, Sihler S, Ziener U, Rosenau F. BSA Hydrogel Beads Functionalized with a Specific Aptamer Library for Capturing Pseudomonas aeruginosa in Serum and Blood. *Int J Mol Sci.* 2021;22(20):11118.

Kubiczek D, Raber H, Bodenberger N, Oswald T, Sahan M, Mayer D, Wiese S, Stenger S, Weil T, Rosenau F. The Diversity of a Polyclonal FluCell-SELEX Library Outperforms Individual Aptamers as Emerging Diagnostic Tools for the Identification of Carbapenem Resistant Pseudomonas aeruginosa. *Chemistry*. 2020;26(64):14536-45.

Langford BJ, So M, Raybardhan S, Leung V, Westwood D, MacFadden DR, Soucy JR, Daneman N. Bacterial co-infection and secondary infection in patients with COVID-19: a living rapid review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect.* 2020;26(12):1622-9.

Lee KS, Lee SM, Oh J, Park IH, Song JH, Han M, Yong D, Lim KJ, Shin JS, Yoo KH. Electrical antimicrobial susceptibility testing based on aptamer-functionalized capacitance sensor array for clinical isolates. *Sci Rep*. 2020;10(1):13709.

Leite GC, Oliveira MS, Perdigão-Neto LV, Rocha CK, Guimarães T, Rizek C, Levin AS, Costa SF. Antimicrobial Combinations against Pan-Resistant Acinetobacter baumannii Isolates with Different Resistance Mechanisms. *PLoS One*. 2016;11(3):e0151270.

Lin MF, Lin YY, Tu CC, Lan CY. Distribution of different efflux pump genes in clinical isolates of multidrug-resistant Acinetobacter baumannii and their correlation with antimicrobial resistance. *J Microbiol Immunol Infect*. 2017;50(2):224-31.

Liu P, Li P, Jiang X, Bi D, Xie Y, Tai C, Deng Z, Rajakumar K, Ou HY. Complete genome sequence of Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae HS11286, a multidrug-resistant strain isolated from human sputum. *J Bacteriol*. 2012;194(7):1841-2.

Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, Doi Y, Tian G, Dong B, Huang X, Yu LF, Gu D, Ren H, Chen X, Lv L, He D, Zhou H, Liang Z, Liu JH, Shen J. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(2):161-8.

Long SW, Olsen RJ, Eagar TN, Beres SB, Zhao P, Davis JJ, Brettin T, Xia F, Musser JM. Population Genomic Analysis of 1,777 Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Klebsiella pneumoniae Isolates, Houston, Texas: Unexpected Abundance of Clonal Group 307. *mBio*. 2017;8(3):e00489-17.

Maatallah M, Vading M, Kabir MH, Bakhrouf A, Kalin M, Nauclér P, Brisse S, Giske CG. Klebsiella variicola is a frequent cause of bloodstream infection in the stockholm area, and associated with higher mortality compared to K. pneumoniae. *PLoS One*. 2014;9(11):e113539.

Martin RM, Bachman MA. Colonization, Infection, and the Accessory Genome of Klebsiella pneumoniae. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018;8:4.

Martin RM, Cao J, Brisse S, Passet V, Wu W, Zhao L, Malani PN, Rao K, Bachman MA. Molecular Epidemiology of Colonizing and Infecting Isolates of Klebsiella pneumoniae. *mSphere*. 2016;1(5):e00261-16.

Menezes M. Detecção de bactérias resistentes a antibióticos triplicou na pandemia [internet]. 23 nov. 2021 [citado em: 13 ago. 2022]. Disponível em: https://portal.fiocruz.br/noticia/deteccao-de-bacterias-resistentes-antibioticos-triplicou-na-pandemia.

Moura ML, Boszczowski I, Mortari N, Barrozo LV, Neto FC, Lobo RD, Pedroso de Lima AC, Levin AS. The Impact of Restricting Over-the-Counter Sales of Antimicrobial Drugs: Preliminary Analysis of National Data. *Medicine (Baltimore)*. 2015;94(38):e1605.

N K Radhika, Gorthi SS. dsDNA-templated fluorescent copper nanoparticles for the detection of lipopolysaccharides. *Anal Methods*. 2021;13(2):186-191.

Nicoletti AG, Fehlberg LC, Picão RC, Machado Ade O, Gales AC. Clonal complex 258, the most frequently found multilocus sequence type complex in KPC-2-producing Klebsiella pneumoniae isolated in Brazilian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(8):4563-4.

Ochsner UA, Vasil ML. Gene repression by the ferric uptake regulator in Pseudomonas aeruginosa: cycle selection of iron-regulated genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(9):4409-14.

Organização Mundial de Saúde (OMS). Report on the burden of endemic health care-associated infection worldwide [internet]. 2011 [citado em: 29 ago. 2021]. Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/80135/9789241501507_eng.pdf

Pacheco AB, Guth BE, Soares KC, Nishimura L, de Almeida DF, Ferreira LC. Random amplification of polymorphic DNA reveals serotype-specific clonal clusters among enterotoxigenic Escherichia coli strains isolated from humans. *J Clin Microbiol*. 1997;35(6):1521-5.

Petersen PJ, Labthavikul P, Jones CH, Bradford PA. In vitro antibacterial activities of tigecycline in combination with other antimicrobial agents determined by chequerboard and time-kill kinetic analysis. *J Antimicrob Chemother*. 2006 Mar;57(3):573-6.

Playford EG, Craig JC, Iredell JR. Carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii in intensive care unit patients: risk factors for acquisition, infection and their consequences. *J Hosp Infect*. 2007;65(3):204-11.

Podschun R, Pietsch S, Höller C, Ullmann U. Incidence of Klebsiella species in surface waters and their expression of virulence factors. *Appl Environ Microbiol.* 2001;67(7):3325-7.

Podschun R, Ullmann U. Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev*. 1998;11(4):589-603.

Pontikis K, Karaiskos I, Bastani S, Dimopoulos G, Kalogirou M, Katsiari M, Oikonomou A, Poulakou G, Roilides E, Giamarellou H. Outcomes of critically ill intensive care unit patients treated with fosfomycin for infections due to pandrug-resistant and extensively drug-resistant carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. I*nt J Antimicrob Agents*. 2014;43(1):52-9.

Porto APM, Goossens H, Versporten A, Costa SF; Brazilian Global-PPS Working Group. Global point prevalence survey of antimicrobial consumption in Brazilian hospitals. *J Hosp Infect*. 2020;104(2):165-171.

Puzniak L, Finelli L, Yu KC, Bauer KA, Moise P, De Anda C, Vankeepuram L, Sepassi A, Gupta V. A multicenter analysis of the clinical microbiology and antimicrobial usage in hospitalized patients in the US with or without COVID-19. *BMC Infect Dis*. 2021;21(1):227.

Quiles MG, Rocchetti TT, Fehlberg LC, Kusano EJ, Chebabo A, Pereira RM, Gales AC, Pignatari AC. Unusual association of NDM-1 with KPC-2 and armA among Brazilian Enterobacteriaceae isolates. *Braz J Med Biol Res.* 2015;48(2):174-7.

Rasoulinejad S, Gargari SLM. Aptamer-nanobody based ELASA for specific detection of Acinetobacter baumannii isolates. *J Biotechnol.* 2016;231:46-54.

Rasoulinejad S, Gargari SLM. Aptamer-nanobody based ELASA for specific detection of Acinetobacter baumannii isolates. *J Biotechnol*. 2016;231:46-54.

Rossi F, Girardello R, Cury AP, Di Gioia TS, Almeida JN Jr, Duarte AJ. Emergence of colistin resistance in the largest university hospital complex of São Paulo, Brazil, over five years. *Braz J Infect Dis*. 2017;21(1):98-101.

Roushani M, Sarabaegi M, Pourahmad F. Impedimetric aptasensor for Pseudomonas aeruginosa by using a glassy carbon electrode modified with silver nanoparticles. *Mikrochim Acta*. 2019;186(11):725.

Rozenblum GT, Lopez VG, Vitullo AD, Radrizzani M. Aptamers: current challenges and future prospects. *Expert Opin Drug Discov*. 2016;11(2):127-35.

Samuelsen Ø, Naseer U, Tofteland S, Skutlaberg DH, Onken A, Hjetland R, Sundsfjord A, Giske CG. Emergence of clonally related Klebsiella pneumoniae isolates of sequence type 258 producing plasmid-mediated KPC carbapenemase in Norway and Sweden. *J Antimicrob Chemother*. 2009;63(4):654-8.

Savory N, Lednor D, Tsukakoshi K, Abe K, Yoshida W, Ferri S, Jones BV, Ikebukuro K. In silico maturation of binding-specificity of DNA aptamers against Proteus mirabilis. *Biotechnol Bioeng*. 2013;110(10):2573-80.

Schneider D, Gold L, Platt T. Selective enrichment of RNA species for tight binding to Escherichia coli rho factor. *FASEB J*. 1993;7(1):201-7.

Schulmeyer KH, Diaz MR, Bair TB, Sanders W, Gode CJ, Laederach A, Wolfgang MC, Yahr TL. Primary and Secondary Sequence Structure Requirements for Recognition and Discrimination of Target RNAs by Pseudomonas aeruginosa RsmA and RsmF. *J Bacteriol*. 2016;198(18):2458-69.

Sefah K, Shangguan D, Xiong X, O'Donoghue MB, Tan W. Development of DNA aptamers using Cell-SELEX. *Nat Protoc*. 2010;5(6):1169-85.

Shi X, Zhang J, He F. A new aptamer/polyadenylated DNA interdigitated gold electrode piezoelectric sensor for rapid detection of Pseudomonas aeruginosa. *Biosens Bioelectron*. 2019;132:224-9.

Shin HS, Gedi V, Kim JK, Lee DK. Detection of Gram-negative bacterial outer membrane vesicles using DNA aptamers. *Sci Rep*. 2019;9(1):13167.

Song MY, Nguyen D, Hong SW, Kim BC. Broadly reactive aptamers targeting bacteria belonging to different genera using a sequential toggle cell-SELEX. *Sci Rep*. 2017;7:43641.

Soundy J, Day D. Delivery of antibacterial silver nanoclusters to Pseudomonas aeruginosa using species-specific DNA aptamers. *J Med Microbiol*. 2020;69(4):640-52.

Soundy J, Day D. Selection of DNA aptamers specific for live Pseudomonas aeruginosa. *PLoS One*. 2017;12(9):e0185385.

Su CH, Tsai MH, Lin CY, Ma YD, Wang CH, Chung YD, Lee GB. Dual aptamer assay for detection of Acinetobacter baumannii on an electromagnetically-driven microfluidic platform. *Biosens Bioelectron*. 2020;159:112148.

Su W, Kim SE, Cho M, Nam JD, Choe WS, Lee Y. Selective detection of endotoxin using an impedance aptasensor with electrochemically deposited gold nanoparticles. *Innate Immun*. 2013;19(4):388-97.

Taur Y, Xavier JB, Lipuma L, Ubeda C, Goldberg J, Gobourne A, Lee YJ, Dubin KA, Socci ND, Viale A, Perales MA, Jenq RR, van den Brink MR, Pamer EG. Intestinal domination and the risk of bacteremia in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis*. 2012;55(7):905-14.

Taylor DD, Martin JN, Morley PS, Belk KE, White AE, Scallan Walter EJ. Survey of production animal veterinarians' prescription practices, factors influencing antimicrobial drug use, and perceptions of and attitudes toward antimicrobial resistance. *J Am Vet Med Assoc*. 2020;257(1):87-96.

Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, Gales AC, Biedenbach DJ, Jones RN, Walsh TR. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J Antimicrob Chemother*. 2002;50(5):673-9.

Tsai SS, Huang JC, Chen ST, Sun JH, Wang CC, Lin SF, Hsu BR, Lin JD, Huang SY, Huang YY. Characteristics of Klebsiella pneumoniae bacteremia in community-acquired and nosocomial infections in diabetic patients. *Chang Gung Med J*. 2010;33(5):532-9.

Tsay RW, Siu LK, Fung CP, Chang FY. Characteristics of bacteremia between community-acquired and nosocomial Klebsiella pneumoniae infection: risk factor for mortality and the impact of capsular serotypes as a herald for community-acquired infection. *Arch Intern Med*. 2002;162(9):1021-7.

Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*. 1990;249(4968):505-10.

Tuerk C, MacDougal-Waugh S. In vitro evolution of functional nucleic acids: high-affinity RNA ligands of HIV-1 proteins. *Gene*. 1993;137(1):33-9.

Ulrich H, Martins AH, Pesquero JB. RNA and DNA aptamers in cytomics analysis. *Cytometry A*. 2004;59(2):220-31.

Vashist J, Tiwari V, Das R, Kapil A, Rajeswari MR. Analysis of penicillin-binding proteins (PBPs) in carbapenem resistant Acinetobacter baumannii. *Indian J Med Res*. 2011;133(3):332-8.

Wang CH, Wu JJ, Bin LG. Screening of highly-specific aptamers and their applications in paper-based microfluidic chips for rapid diagnosis of multiple bacteria. *Sensors Actuators, B Chem*. 2019b;284:395-402.

Wang KY, Zeng YL, Yang XY, Li WB, Lan XP. Utility of aptamer-fluorescence in situ hybridization for rapid detection of Pseudomonas aeruginosa. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011;30(2):273-8.

Wang N, Dai H, Sai L, Ma H, Lin M. Copper ion-assisted gold nanoparticle aggregates for electrochemical signal amplification of lipopolysaccharide sensing. *Biosens. Bioelectron*. 2019a;126,529-34.

Wang S, Mao B, Wu M, Liang J, Deng L. Influence of aptamer-targeted antibiofilm agents for treatment of Pseudomonas aeruginosa biofilms. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2018;111(2):199-208.

Wu JH, Wang CH, Ma YD, Lee GB. A nitrocellulose membrane-based integrated microfluidic system for bacterial detection utilizing magnetic-composite membrane microdevices and bacteria-specific aptamers. *Lab Chip*. 2018;18(11):1633-40.

Yang S, Guo Y, Fan J, Yang Y, Zuo C, Bai S, Sheng S, Li J, Xie G. A fluorometric assay for rapid enrichment and determination of bacteria by using zirconium-metal organic frameworks as both capture surface and signal amplification tag. *Mikrochim Acta*. 2020;187(3):188.

Yao W, Shi J, Ling J, Guo Y, Ding C, Ding Y. SiC-functionalized fluorescent aptasensor for determination of Proteus mirabilis. *Mikrochim Acta*. 2020;187(7):406.

Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, Walsh TR. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in Klebsiella pneumoniae sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(12):5046-54.

Yoo SM, Kim DK, Lee SY. Aptamer-functionalized localized surface plasmon resonance sensor for the multiplexed detection of different bacterial species. *Talanta*. 2015;132:112-7.

Yu F, Chen J, Wang Z, Yang H, Li H, Jia W, Xue S, Xie H, Xu D. Screening aptamers for serine β-lactamase-expressing bacteria with Precision-SELEX. *Talanta*. 2021;224:121750.

Zhao M, Li W, Liu K, Li H, Lan X. C4-HSL aptamers for blocking qurom sensing and inhibiting biofilm formation in Pseudomonas aeruginosa and its structure prediction and analysis. *PLoS One*. 2019;14(2):e0212041.

Zheng Y, Xu N, Pang J, Han H, Yang H, Qin W, Zhang H, Li W, Wang H, Chen Y. Colonization With Extensively Drug-Resistant Acinetobacter baumannii and Prognosis in Critically Ill Patients: An Observational Cohort Study. *Front Med (Lausanne)*. 2021;8:667776.

Zhong Z, Gao X, Gao R, Jia L. Selective capture and sensitive fluorometric determination of Pseudomonas aeruginosa by using aptamer modified magnetic nanoparticles. *Mikrochim Acta*. 2018;185(8):377.

Zhou J, Rossi J. Aptamers as targeted therapeutics: current potential and challenges. *Nat Rev Drug Discov*. 2017;16(3):181-202.

Zou X, Wu J, Gu J, Shen L, Mao L. Application of Aptamers in Virus Detection and Antiviral Therapy. *Front Microbiol*. 2019;10:1462.

APÊNDICES

Apêndice A - Artigo publicado

NIH National Library of Medicine
National Center for Biotechnology Information
Log in
PubMed.gov
Search
Advanced
User Guide
Save Email Send to Display options

Front Cell Infect Microbiol. 2022 Jun 30;12:818737. doi: 10.3389/fcimb.2022.818737.
eCollection 2022.

Selection and Identification of a DNA Aptamer for Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Using an In-House Cell-SELEX Methodology

Marina Farrel Côrtes [1], Taniela Marli Bes [1], Beatriz Ribeiro Deo [1], Beatriz Barbosa Dos Anjos [1], Andrés Jimenez Galisteo Jr [1], Ester Cerdeira Sabino [1], Carlos Santos [2], Silvia Figueiredo Costa [1]

Affiliations + expand

PMID: 35846753 PMCID: PMC9280162 DOI: 10.3389/fcimb.2022.818737

Free PMC article

FULL TEXT LINKS
FREE Full text PMC

ACTIONS
Cite
Favorites

SHARE

Title & authors
Abstract
Conflict of interest statement
Figures
Similar articles
References
Publication types
MeSH terms
Substances
LinkOut - more resources

Abstract

Infections caused by multidrug-resistant *A. baumannii* are a worldwide health concern with high mortality rates. Rapid identification of this infectious agent is critical as it can easily spread with difficult or no options for treatment. In this context, the development of reliable and economically viable detection and therapeutic methodologies are still challenging. One of the promising solutions is the development of nucleic acid aptamers capable of interacting with bacteria. These aptamers can be used for specific recognition of infectious agents as well as for blocking their functions. Cell-SELEX technology currently allows the selection and identification of aptamers and is flexible enough to target molecules present in an entire bacterial cell without their prior knowledge. However, the aptamer technology is still facing many challenges, such as the complexity of the screening process. Here, we describe the selection and identification of a new aptamer A01, using an in-house whole-cell SELEX-based methodology, against multi-resistant *Acinetobacter baumannii*, with rapid execution and low cost. In addition, this protocol allowed the identification of the aptamer A01 with the whole *A. baumannii* cell as a target. The aptamer A01 demonstrated a binding preference to *A. baumannii* when compared to *K. pneumoniae*, *C. albicans*, and *S. aureus* in fluorescence assays. Although the time-kill assay did not show an effect on bacterial growth, the potential bactericidal or bacteriostatic cannot be totally discarded. The new categorized aptamer (A01) displayed a significant binding affinity to MDR *A. baumannii*.

Keywords: Acinetobacter banumannii; Cell-SELEX; aptamer; multidrug resistance; protocol.

Copyright © 2022 Farrel Côrtes, Marli Bes, Ribeiro Deo, Barbosa dos Anjos, Jimenez Galisteo, Cerdeira Sabino, Santos and Figueiredo Costa.

Conflict of interest statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Apêndice B - Artigo submetido

8/29/22, 7:23 PM Gmail - Fwd: [Pharmaceutics] Manuscript ID: pharmaceutics-1914917 - Submission Received

Gmail

Taniela Bes <tanielabes@gmail.com>

Fwd: [Pharmaceutics] Manuscript ID: pharmaceutics-1914917 - Submission Received

Taniela Marli Bes <taniela.bes@usp.br> 29 de agosto de 2022 19:22
Para: "tanielabes@gmail.com" <tanielabes@gmail.com>

Get Outlook for iOS

From: susy@mdpi.com <susy@mdpi.com> on behalf of Editorial Office <pharmaceutics@mdpi.com>
Sent: Monday, August 29, 2022 6:47 PM
To: Taniela Marli Bes <taniela.bes@usp.br>
Cc: Marina Farrel Côrtes <marinafarrel@yahoo.com.br>; Carlos Santos <zeppy@me.com>; Ester Cerdeira Sabino <sabinoec@gmail.com>; Silvia Figueiredo Costa <silviacosta@usp.br>
Subject: [Pharmaceutics] Manuscript ID: pharmaceutics-1914917 - Submission Received

Dear Dr. Bes,

Thank you very much for uploading the following manuscript to the MDPI submission system. One of our editors will be in touch with you soon.

Journal name: Pharmaceutics
Manuscript ID: pharmaceutics-1914917
Type of manuscript: Review
Title: Application of aptamer technology in enterobacteria and non-fermenters: literature review.
Authors: Taniela Marli Bes *, Marina Farrel Côrtes, Carlos Santos, Ester Cerdeira Sabino, Silvia Figueiredo Costa
Received: 29 August 2022
E-mails: taniela.bes@usp.br, marinafarrel@yahoo.com.br, zeppy@me.com, sabinoec@gmail.com, silviacosta@usp.br
Submitted to section: Drug Targeting and Design, https://www.mdpi.com/journal/pharmaceutics/sections/Drug_Targeting_Design
Recent Advances in the Development of Hybrid Drugs https://www.mdpi.com/journal/pharmaceutics/special_issues/hybrid_drug

You can follow progress of your manuscript at the following link (login required):
https://susy.mdpi.com/user/manuscripts/review_info/4cbeaaa2bdfa3ad50ccb225028ba5cc0

The following points were confirmed during submission:

1. Pharmaceutics is an open access journal with publishing fees of 2400 CHF for an accepted paper (see https://www.mdpi.com/about/apc/ for details). This manuscript, if accepted, will be published under an open access Creative Commons CC BY license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), and I agree to pay the Article Processing Charges as described on the journal webpage (https://www.mdpi.com/journal/pharmaceutics/apc). See https://www.mdpi.com/about/openaccess for more information about open access publishing.

Please note that you may be entitled to a discount if you have previously received a discount code or if your institute is participating in the MDPI Institutional Open Access Program (IOAP), for more information see https://www.mdpi.com/about/ioap. If you have been granted any other special

https://mail.google.com/mail/u/0/?ik=e386feaa8d&view=pt&search=all&permmsgid=msg-f%3A1742517073470923626&simpl=msg-f%3A17425170734... 1/2

discounts for your submission, please contact the Pharmaceutics editorial office.

2. I understand that:

a. If previously published material is reproduced in my manuscript, I will provide proof that I have obtained the necessary copyright permission. (Please refer to the Rights & Permissions website: https://www.mdpi.com/authors/rights).

b. My manuscript is submitted on the understanding that it has not been published in or submitted to another peer-reviewed journal. Exceptions to this rule are papers containing material disclosed at conferences. I confirm that I will inform the journal editorial office if this is the case for my manuscript. I confirm that all authors are familiar with and agree with submission of the contents of the manuscript. The journal editorial office reserves the right to contact all authors to confirm this in case of doubt. I will provide email addresses for all authors and an institutional e-mail address for at least one of the co-authors, and specify the name, address and e-mail for invoicing purposes.

If you have any questions, please do not hesitate to contact the Pharmaceutics editorial office at pharmaceutics@mdpi.com

Kind regards,
Pharmaceutics Editorial Office
St. Alban-Anlage 66, 4052 Basel, Switzerland
E-Mail: pharmaceutics@mdpi.com
Tel. +41 61 683 77 34
Fax: +41 61 302 89 18

*** This is an automatically generated email ***