Faculdade de Saúde Pública

Resistência a tetraciclinas em isolados clínicos e ambientais de *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae* e *Aeromonas* spp.: identificação e mapeamento do ambiente genético de genes *tet*

Livia Carminato Balsalobre

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Serviços de Saúde Pública.

Orientação: Profª. Associada Maria Helena Matté.

São Paulo
2014

Resistência a tetraciclinas em isolados clínicos e ambientais de *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae* e *Aeromonas* spp.: identificação e mapeamento do ambiente genético de genes *tet*

Livia Carminato Balsalobre

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Serviços de Saúde Pública.

Orientação: Profª. Associada Maria Helena Matté.

São Paulo
2014

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

DEDICATÓRIA

A meu pai por me ensinar a olhar a natureza, isso desenvolveu meu instinto,
à minha mãe por me ensinar praticidade, isso me tornou racional e
ao meu marido por me ensinar a amar, isso me tornou alguém

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por colocar dificuldades no meu caminho, sem elas eu não seria quem sou hoje e não entenderia o que é ser feliz;

A São Francisco de Assis, por me proteger e me iluminar e por acompanhar todas as formas de vida, nos momentos tristes e felizes;

A meus pais, sem vocês nada disso teria propósito porque deixá-los orgulhosos é o que me motiva;

A meu marido, por ser e estar sempre presente, por me amar mesmo com tantos defeitos, por aguentar minhas manias e maluquices e por me permitir ser quem eu sou, sempre;

A meu avô, por gerar tantas manias amáveis e frases célebres, por estar sempre de bom humor, por fingir que nos escuta e principalmente por ser forte;

A meu irmão Danilo, meus primos Fábia, Fábio, Alexandre, Fernanda, Dani, Bia por estarem sempre perto e me mostrarem que mesmo se todos se forem eu não estarei sozinha;

À Milena, por ser a irmã que eu não tive, por ser sempre sincera e compreensiva, por trazer em mim sempre o melhor;

À minha madrinha, Ronalda, que mesmo sem perceber me ensinou a dar valor a coisas antes sem importância para mim, me mostrou que sempre há um lado cômico em toda situação, e que é sempre melhor rir do que chorar;

A todos os meus tios e tias, que rezam e torcem por mim;

A meu cachorro Mike, por ser tão ingênuo e tão bom, à minha cachorra Hanna por me permitir amá-la e ao meu pássaro Birdie por ser tão alegre;

Obrigada família!

À minha orientadora Maria Helena, por me ensinar coisas que foram além do âmbito científico e por sempre me apoiar;

Ao professor Glavur pelo apoio nestes quatro anos;

A todos os estagiários e alunos, especialmente à Bruna e Marina, que passaram pelo laboratório durantes estes quatro anos e que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho;

Aos professores Nilton Lincopan, Maria Inês Sato, Maria Tereza Pepe Razzolini e Ana Cristina Gales, por doarem seu tempo para participar da avaliação deste trabalho e por servirem como exemplo pessoal e profissional na minha vida;

Aos professores Fredi e Rodrigo Cayo por se disponibilizarem a contribuir para o aperfeiçoamento deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro durante estes quatro anos de pesquisa e dedicação (Processos: 2010/08596-0 e 2010/12841-1).

EPÍGRAFE

“Um grande homem está sempre disposto a ser pequeno”

(Ralph Waldo Emerson)

RESUMO

Balsalobre LC. Resistência a tetraciclinas em isolados clínicos e ambientais de *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae* e *Aeromonas* spp.: identificação e mapeamento do ambiente genético de genes *tet* [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2014.

Introdução. A resistência bacteriana a antibióticos é aceita como um dos maiores problemas de saúde pública. As tetraciclinas são antibióticos de amplo espectro, e após seu uso indiscriminado observou-se o surgimento de bactérias resistentes, levando médicos e veterinários a diminuírem seu uso. **Objetivos.** Verificar o perfil de sensibilidade a tetraciclinas em isolados clínicos e ambientais de *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae* e *Aeromonas* spp., bem como pesquisar os principais genes *tet* associados à resistência a esta classe de antibióticos e determinar a potencial forma de disseminação destes genes através da caracterização de seu ambiente genético. **Material e Métodos.** Os perfis de sensibilidade à tetraciclina (TET), doxiciclina (DOX), minociclina (MIN) e tigeciclina (TGC) de 572 isolados foram obtidos através das técnicas de Disco-Difusão e Concentração Inibitória Mínima. Os isolados não-sensíveis à tetraciclina foram submetidos a reações de PCR para pesquisa de grupos Inc, genes *tet* e para a caracterização de seu ambiente genético pela pesquisa das integrases de classes 1, 2, 3 e 4, e dos elementos genéticos móveis Tn*1721,* IS*26,* Tn*10* e ISAS5. Perfis de similaridade genética dos isolados foram obtidos através das técnicas de ERIC-PCR e PFGE. Após análise destes resultados 33 cepas foram selecionadas para as técnicas de S1-PFGE e transformação. **Resultados.** A partir dos 572 isolados 18,5% foram resistentes à TET, 13,5% à DOX, 8% à MIN e nenhum à TGC. Vinte e dois por cento dos isolados clínicos e 16,3% ambientais foram resistentes à TET. Os genes codificadores de bomba de efluxo *tet*(A), *tet*(B), *tet*(C), *tet*(D) e *tet*(E), foram observados em 25,5%, 33%, 6,5%, 18,9% e 23,5% dos isolados, respectivamente. Noventa e cinco por cento, 100%, 100% e 4,5% das cepas carreando o gene *tet*(A), *tet*(B), *tet*(D) e *tet*(E), foram não-sensíveis à DOX, nesta ordem. Resistência à MIN foi observada em 4,2%, 78,8% e 100% dos isolados carreando *tet*(A), *tet*(B) e *tet*(D), respectivamente. O gene *tet*(A) estava associado a Tn*1721, tet*(B) à Tn*10* e *tet*(C) e *tet*(D) à IS*26*. Nenhuma das integrases pesquisadas estavam associadas aos genes *tet* detectados. Os grupos IncF, IncFIB e IncA/C foram observados em 54,8%, 41,1% e 28,7% dos isolados, respectivamente. Uma cepa de *Aeromonas* spp. carreava um plasmídio do grupo IncP. Através dos perfis de similaridade genética foi observado que dentre os isolados hospitalares de *K. pneumoniae* houve a ocorrência de perfis genéticos idênticos, no entanto nos demais isolados do estudo os perfis genéticos observados eram distintos. Das 33 cepas selecionadas para os experimentos de linearização plasmidial e de transformação, 8 foram transformadas com sucesso, nas quais foi observada a presença dos genes *tet* em plasmídios. **Conclusões.** Uma baixa porcentagem de resistência à TET foi detectada. Verificou-se que a TGC foi a tetraciclina mais ativa, seguida da MIN. Os genes *tet*(A) e *tet*(B) foram os mais prevalentes. Todas as cepas carreando *tet*(B) e *tet*(D) foram não-sensíveis a DOX e MIN. Plasmídios dos grupos IncF, FIB e A/C foram os mais detectados neste estudo. Os resultados sugerem que os genes *tet*(A), (B), (C) e (D) são disseminados por meio de plasmídios e estão associados aos transposons Tn*1721*, IS*10* e IS*26*. Estudos adicionais com isolados mais recentes e outros gêneros bacterianos são necessários, para contribuir com informações da resistência bacteriana a tetraciclinas.

Descritores: Saúde Pública; Resistência antimicrobiana; Transferência genética horizontal; tetraciclinas; Plasmídios; Integrons; Transposons.

ABSTRACT

Balsalobre LC. Tetracycline resistance in clinical and environmental isolates of *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae* and *Aeromonas* spp.: identification and mapping of *tet* genes genetic context [Thesis]. São Paulo (BR): Faculdade de Saúde Pública da USP; 2014.

Introduction. The antibiotic resistance is accepted as one of the major problems for public health. Tetracyclines are broad spectrum antibiotics, and its indiscriminate use promoted the emergence of resistant bacteria, leading physicians and veterinarians to decrease its use. **Objectives.** Verify the susceptibility of clinical and environmental isolates of *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae* and *Aeromonas* spp. to tetracyclines, and also search for the main *tet* genes associated with resistance to these antibiotics and determine the potential mechanism of *tet* genes dissemination by characterizing their genetic context. **Material and Methods.** Disk-Diffusion and Minimum Inhibitory Concentration tests were carried out in 572 isolates using tetracycline (TET), doxycycline (DOX), minocycline (MIN) and tigecycline (TGC). PCR was carried out in TET non-susceptible isolates for the detection of Inc groups, *tet* genes and its genetic context determination through the search of classes 1, 2, 3, and 4 integrases, and Tn*1721,* Tn*10*, IS*26* and ISAS5 mobile genetic elements. Genetic similarities patterns were determined by ERIC-PCR and PFGE techniques. After analyzing the results 33 strains were selected for the S1-PFGE and transformation experiments. **Results.** From 572 isolates, 18.5% were TET-resistant, 13.5% DOX-resistant, 8% MIN-resistant and none resistant to TGC. Twenty-two per cent and 16.3% of clinical and environmental isolates were TET-resistant, in that order. Genes *tet*(A), *tet*(B), *tet*(C), *tet*(D) and *tet*(E), coding for efflux pump mechanism, were found in 25.5%, 33%, 6.5%, 18.9% and 23.5% of the isolates, respectively. Ninety-five per cent, 100%, 100% and 4.5% of the isolates carrying *tet*(A), *tet*(B), *tet*(D) and *tet*(E) were non-susceptible to DOX, respectively. Resistance to MIN was observed in 4.2%, 78.8% and 100% of isolates carrying *tet*(A), *tet*(B) and *tet*(D), in that order. The gene *tet*(A) was associated with Tn*1721, tet*(B) with Tn*10*, and *tet*(C) and (D) with IS*26*. None of the searched integrases were associated with the *tet* genes detected. Groups IncF, IncFIB and IncA/C were respectively observed in 54.8%, 41.1% and 28.7% of the isolates. One *Aeromonas* spp. was carrying an IncP plasmid. The genetic similarities patterns demonstrated that there were identical genetic patterns among the hospital *K. pneumoniae* isolates, however all the remaining isolates possessed distinct genetic patterns. Of the 33 strains selected for plasmid linearization and transformation experiments, 8 were successfully transformed, in which the presence of *tet* genes in plasmids were observed. **Conclusions.** A low level of tetracycline resistance was detected. TGC was the most active tested antibiotic, followed by MIN. Genes *tet*(A) and *tet*(B) were the most prevalent among the isolates. All strains carrying *tet*(B) and *tet*(D) were non-susceptible to DOX and MIN. Groups IncF, IncFIB and IncA/C were the most detected in this study. The results suggest that *tet*(A), (B), (C) and (D) are disseminated by plasmids and are associated with Tn*1721,* Tn*10* and IS*26*. Additional studies assembling recent isolates and other genera are necessary in order to contribute with information about the bacteria resistance to tetracyclines.

Descriptors: Public Health; Antimicrobial resistance; Horizontal gene transfer; tetracyclines; Plasmids; Integrons; Transposons.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO..... **21**
1.1 Considerações gerais..... 21
1.2 Antibióticos e o panorama atual..... 25
1.3 A resistência bacteriana na área da Saúde Pública..... 28
1.4 O papel do ambiente na resistência bacteriana..... 29
1.5 Classes de antibióticos..... 32
1.6 Tetraciclinas..... 33
1.6.1 Mecanismos de ação das tetraciclinas 37
1.6.2 Mecanismos de resistência à tetraciclinas..... 39
1.7 Aquisição genética e a resistência bacteriana..... 43
1.7.1 Plasmídios..... 45
1.7.2 Elementos genéticos mobilizáveis: transposons e integrons..... 49
1.7.3 A disseminação de genes *tet*..... 57
1.8. Relevância do estudo em Saúde Pública..... **62**
2. OBJETIVOS..... **65**
2.1 Objetivo Geral..... 65
2.2 Objetivos Específicos..... 65
3. MATERIAL E MÉTODOS..... **66**
3.1 Seleção dos isolados..... 66
3.2 Testes fenotípicos para detecção de resistência a tetraciclinas..... 67
3.2.1 Detecção de genes *tet*..... 67
3.2.1.1 Extração de DNA total..... 67
3.2.1.2 Detecção de genes tet pela PCR..... 68
3.3 Caracterização do ambiente genético dos genes *tet*..... 69

3.3.1 Pesquisa de integrases de classes 1, 2, 3 e 4..... 69
3.3.2 Mapeamento de integrons..... 70
3.3.3 Pesquisa e mapeamento de transposons..... 71
3.4 Tipagem plasmidial..... 78
3.5 Tipagem molecular..... 79
3.5.1 Extração do DNA genômico..... 79
3.5.2 ERIC-PCR..... 80
3.5.3 PFGE para DNA cromossômico..... 81
3.6 Critérios para seleção de cepas para metodologias posteriores..... 81
3.7 Determinação da localização dos genes..... 82
3.7.1 Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE) – Preparo dos Plugs..... 82
3.7.2 Linearização e determinação do tamanho dos plasmídios..... 82
3.7.3 Transformação de plasmídios..... 82
3.7.3.1 Preparação de células competentes..... 82
4. ANÁLISE DOS DADOS..... **84**
5. RESULTADOS..... **86**
5.1 Resistência fenotípica a tetraciclinas..... 86
5.2 Detecção de genes *tet*..... 91
5.3 Pesquisa de transposons..... 96
5.3.1 Caracterização do ambiente genético dos genes *tet*..... 100
5.4 Integrons..... 102

5.5 Detecção de grupos de incompatibilidade (Inc)..... 104
5.6 Genotipagem..... 106
5.7 Seleção das cepas para localização dos genes *tet*..... 107
6. DISCUSSÃO..... **112**
6.1 Resistência fenotípica a tetraciclinas..... 114
6.2 Genes *tet* e determinação de seu ambiente genético..... 119
6.3 Integrons..... 129
6.4 Grupos Inc..... 130
6.5 Limitações do estudo..... 133
6.6 Considerações Finais..... 134
7. CONCLUSÕES..... **138**
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... **140**

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Desenvolvimento da resistência aos antibióticos introduzidos na prática clínica comparados com o ano de aprovação pelo FDA (Food Drug Administration) (adaptado de: BUSH, 2004)..... 24
Quadro 2. Síntese das características das cepas utilizadas neste estudo..... 66
Quadro 3. Iniciadores usados para detectar genes *tet* para os diferentes mecanismos de resistência..... 68
Quadro 4. Sequências de iniciadores para a detecção da presença de integrases de classes 1, 2, 3 e 4..... 70
Quadro 5. Iniciadores para amplificação de integrons completos de classes 1 e 2.. 71
Quadro 6. Sequências de iniciadores para triagem dos elementos genéticos móveis, Tn*1721*, Tn*10* e IS*26*..... 72
Quadro 7. Sequências de iniciadores para mapeamento do elemento genético Tn*1721* associado aos genes *tet* detectados..... 73
Quadro 8. Sequências de iniciadores para mapeamento da transposase IS*10* relacionada ao elemento móvel Tn*10* associado aos genes *tet*(B) detectados..... 74
Quadro 9. Iniciadores para mapeamento da IS*26* e sua associação com os genes *tet*(D) detectados..... 75
Quadro 10. Iniciadores para mapeamento de IS*26* e sua associação com os genes *tet*(C) detectados..... 76
Quadro 11. Iniciadores para mapeamento do ambiente genético de *tet*(E)..... 77
Quadro 12. Iniciadores para a tipagem plasmidial em grupos Inc de acordo com o protocolo desenvolvido CARATTOLI et al. (2005)..... 78
Quadro 13. Cepas não-clonais de *K. pneumonie, E. coli* e *Aeromonas* spp. selecionadas para a metodologia de transformação..... 109
Quadro 14. Características das cepas de *Aeromonas, E. coli* e *K. pneumoniae* isoladas de amostras clínicas e ambientais positivas para o experimento de transformação..... 111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Determinação dos perfis de sensibilidade à tetraciclina obtidos pela técnica de Disco-Difusão (DD), seguida da verificação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) nos isolados não-sensíveis à tetraciclina..... 86
Tabela 2. Testes de disco-difusão e Concentração Inibitória Mínima (CIM) para doxiciclina, minociclina e tigeciclina das cepas não-sensíveis à tetraciclina..... 87
Tabela 3. Disposição dos valores da CIM_{50}, CIM_{90} e do *range* dos antibióticos tetraciclina, doxiciclina, minociclina e tigeciclina com relação às cepas clínicas e ambientais de *Aeromonas* spp*., K. pneumoniae* e *E. coli*..... 87
Tabela 4. Distribuição dos genes *tet* entre os isolados positivos de acordo com seus perfis fenotípicos de resistência e de acordo com as espécies *Aeromonas*, *E. coli* e *K. pneumoniae* e suas respectivas fontes de isolamento... 95
Tabela 5. Distribuição de isolados positivos na triagem para as transposases dos elementos genéticos Tn*1721,* Tn*10* e IS*26* com relação aos resultados para a ocorrência dos genes *tet*..... 100
Tabela 6. Isolados positivos para grupos Inc e suas combinações, distribuídos de acordo com os microrganismos *Aeromonas* spp., *E. coli* e *K. pneumoniae* e seus locais de origem de isolamento..... 105

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema sobre a introdução dos antibióticos na prática clínica (parte superior) e a década em que o primeiro relato de resistência foi divulgado (parte inferior) (adaptado de: HOGBERG et al., 2010)..... 23
Figura 2. Principais mecanismos de resistência bacteriana. Diminuição da permeabilidade da membrana (a); expulsão da droga através de bombas de efluxo (b); mutação ou alteração do sítio onde o antibiótico irá se ligar (c) e (d); superprodução de uma molécula que imita o sítio onde o antibiótico irá se ligar (e); proteínas especializadas que removem o antibiótico do sítio alvo (f); modificação da molécula da droga (g); degradação enzimática do antibiótico (h) (adaptado de: WILSON, 2014)..... 33
Figura 3. As moléculas de diferentes antibióticos que compõe a classe das tetraciclinas divididos em primeira, segunda e terceira gerações..... 34
Figura 4. Os mecanismos de resistência a tetraciclinas e a distribuição dos determinantes genéticos de acordo com o mecanismo (adaptado de: THAKER et al., 2010)..... 36
Figura 5. Ilustração do mecanismo de ação das tetraciclinas, indicando a sua ligação à subunidade 30S do cromossomo impedindo a síntese de proteínas pela não associação do aminoacil-tRNA (Adaptado de: http://www.antibiotics-info.org/tetracycline.html). 38
Figura 6. Estrutura geral de uma sequência de inserção (Fonte: LODISH et al., 2003)..... 53
Figura 7. Estrutura do Transposon composto denominado Tn*10* (Fonte: GRIFFITH et al., 2011)..... 53
Figura 8. Estrutura de transposon não-composto (Fonte: MULLIGAN, 2002.. 54
Figura 9. Esquema ilustrando a associação de *tet*(A) e Tn*1721* elaborado por SCHNABEL e JONES (1999) modificado neste estudo pela adição de flechas que indicam a localização dos iniciadores. Os números acompanhando as flechas indicam os números dos iniciadores descritos no Quadro 8..... 72
Figura 10. A. Esquema da estrutura móvel que mostra a associação de *tet*(B) a IS*10* descrita por SCHNABEL e JONES (1999). B. As flechas representam os iniciadores desenhados e os números acima das flechas indicam os iniciadores citados no Quadro 9..... 74
Figura 11. Esquema da estrutura móvel mapeada neste estudo associando *tet*(D) a IS*26*. As flechas representam as regiões onde os iniciadores foram desenhados e os números indicam os iniciadores no Quadro 10..... 75
Figura 12. Esquema da estrutura móvel mapeada para os genes *tet*(C) associados a IS*26*. As flechas representam as regiões onde os iniciadores foram desenhados e os números indicam os iniciadores no Quadro 11..... 76
Figura 13. Distribuição de isolados sensíveis e não-sensíveis à tetraciclina, doxiciclina, minociclina e tigeciclina, calculados a partir do total de 572 isolados testados neste estudo..... 88
Figura 14. Porcentagem dos isolados sensíveis e não-sensíveis à tetraciclina de acordo com a origem clínica ou ambiental da amostra..... 89

Figura 15. Isolados não-sensíveis à tetraciclina de acordo com o tipo de amostra: água superficial, esgoto e lodo, hospital universitário e fezes diarreicas e as espécies estudadas: *Aeromonas* spp., *Escherichia coli* e *K. pneumoniae*..... 90
Figura 16. Distribuição de isolados não-sensíveis à doxiciclina e minociclina de acordo com o tipo da amostra e as espécies estudadas..... 91
Figura 17. Distribuição dos genes *tet* dentre os 106 isolados positivos para pelo menos um dos genes pesquisados. Os valores separados por vírgula indicam o número de isolados e sua porcentagem dentre as cepas positivas..... 92
Figura 18. Ocorrência dos genes *tet* isoladamente ou em combinações de acordo com a origem clínica ou ambiental da amostra..... 93
Figura 19. istribuição de cepas não-sensíveis à doxiciclina e minociclina e sua relação com a ocorrência dos genes *tet*(A), (B), (C), (D) e (E) detectados isoladamente ou em combinações..... 94
Figura 20. Distribuição dos genes *tet* com ocorrência isolada ou em combinações no gênero *Aeromonas* e nas espécies *K. pneumoniae* e *Escherichia coli*..... 96
Figura 21. Distribuição das transposases associadas aos elementos genéticos móveis pesquisados de acordo com a origem clínica ou ambiental dos isolados..... 97
Figura 22. Distribuição de Tn*1721*, IS*26* e Tn*10* isoladamente e em combinações, com suas porcentagens calculadas baseadas nas 91 cepas positivas para a presença de pelo menos um dos elementos genéticos móveis.. 98
Figura 23. Distribuição das transposases relacionadas a Tn*1721,* Tn*10* e IS*26* de acordo com os microrganismos estudados e a origem de seu isolamento..... 99
Figura 24. Distribuição de Int1 e Int2 de acordo com o gênero *Aeromonas* e as espécies *E. coli* e *K. pneumoniae*; e a origem do isolados..... 103
Figura 25. Representação da ocorrência dos grupos Inc distribuídos entre os 91 isolados positivos para pelo menos um dos grupos pesquisados. Grupos Inc separados por vírgula indicam que os grupos ocorreram na mesma proporção, mas não necessariamente em conjunto no mesmo isolado..... 104
Figura 26. Distribuição dos grupos Inc de acordo com a origem clínica ou ambiental da amostra..... 106

1. INTRODUÇÃO

Crise na Saúde Pública

"_O que você faz quando se depara com uma infecção em um paciente muito doente, e você recebe um relatório do laboratório e todos os antibióticos estão listados como resistentes?" perguntado ao Dr. Fred Tenover do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC). "_Este é o começo da maior crise na área da saúde pública".

1.1. Considerações gerais

O ecossistema microbiano é extremamente competitivo. As bactérias se utilizam de substâncias químicas produzidas por elas mesmas e que fazem parte de seu metabolismo, para se sobressaírem umas sobre as outras nesta competição. Baseando-se nestas substâncias, após um longo caminho percorrido, os humanos foram capazes de desenvolver compostos químicos para curar diversos tipos de doenças infecciosas (BENNET e CHUNG, 2001; NIGAM et al., 2014).

Atualmente mais de 100 tipos diferentes de antibióticos foram descobertos e apesar da relevante quantidade de medicamentos que podem combater infecções, a existência da resistência bacteriana a estas drogas tornou-se um desafio para pesquisadores, médicos e até mesmo a população (LIVERMORE, 2004; DONG et al., 2007).

A resistência bacteriana não é um fenômeno novo em nossa sociedade. Desde o início do uso de antibióticos na medicina terapêutica, o sistema de saúde é desafiado por esta problemática (BARBOSA e LEVI, 2000; THOMAS, 2009). Esta situação não está representada somente em uma área; mas envolve um diverso grupo

de setores no âmbitos: político, econômico, biológico, social e ecológico, os quais podem ser atingidos por consequências desconhecidas e sem solução imediata (BALSALOBRE et al., 2014).

A ocorrência da resistência à penicilina ocorreu nos anos 40, logo após o uso do antibiótico em larga escala. Médicos, farmacêuticos e microbiologistas acompanharam a ascensão da resistência bacteriana até a metade dos anos 80, quando a situação global passou a ser tratada como um problema e ameaça crescentes e permanentes para o sistema de Saúde Pública (EDGAR et al., 2009; THOMAS, 2009; WIESCH et al., 2011).

A história das infecções bacterianas pode ser dividida em três eras: a era pré-antibióticos, a era dos antibióticos e a era da ascensão da resistência bacteriana. O aumento da resistência no mundo atual criou uma situação arriscada e um dilema para os médicos no tratamento de seus pacientes. Quando deparado com uma infecção bacteriana o clínico tem a opção de preservar os antibióticos mais eficazes como último recurso para a terapia na expectativa de conseguir tratar a infecção no momento em que os microrganismos estão mais suscetíveis. No entanto corre-se o risco destas bactérias já possuírem os mecanismos para se tornarem resistentes a estas drogas (SIEGEL, 2008; GOTTLIEB e NIMMO, 2011). Sendo assim, na última década o aumento da resistência bacteriana a antibióticos causou um drástico impacto nas opções terapêuticas dos tratamentos de infeções comunitárias e nosocomiais adquiridas (RICE, 2009; SVARA e RANKIN, 2011).

O retorno à era pré-antibiótico pode tornar-se rapidamente uma realidade em muitas partes do mundo (SOULI et al., 2008; GIAMARELLOU, 2010), o que

evidencia que estamos entrando em uma era onde os benefícios que os antibióticos irão trazer serão menores. Portanto nunca foi tão importante conhecer os detalhes de mecanismos e rotas de resistência, para que os tratamentos, as práticas, o monitoramento e as pesquisas possam se utilizar destas informações para adaptação ao novo e próximo cenário, minimizando o aumento da resistência no futuro (BALSALOBRE et al., 2014).

A introdução de cada nova classe de antibióticos foi seguida pelo aparecimento da resistência àquela e outras classes de agentes antimicrobianos e em muitos casos os organismos presentes no ambiente já possuem resistência aos antibióticos antes dos mesmos serem aprovados pelo FDA (Food and Drug Administration), deixando os pacientes vulneráveis a infecções intratáveis pelos antibióticos disponíveis (BUSH, 2004; SANTOS et al., 2008; KOUYOS et al. 2011) (Figura 1 e Quadro 1).

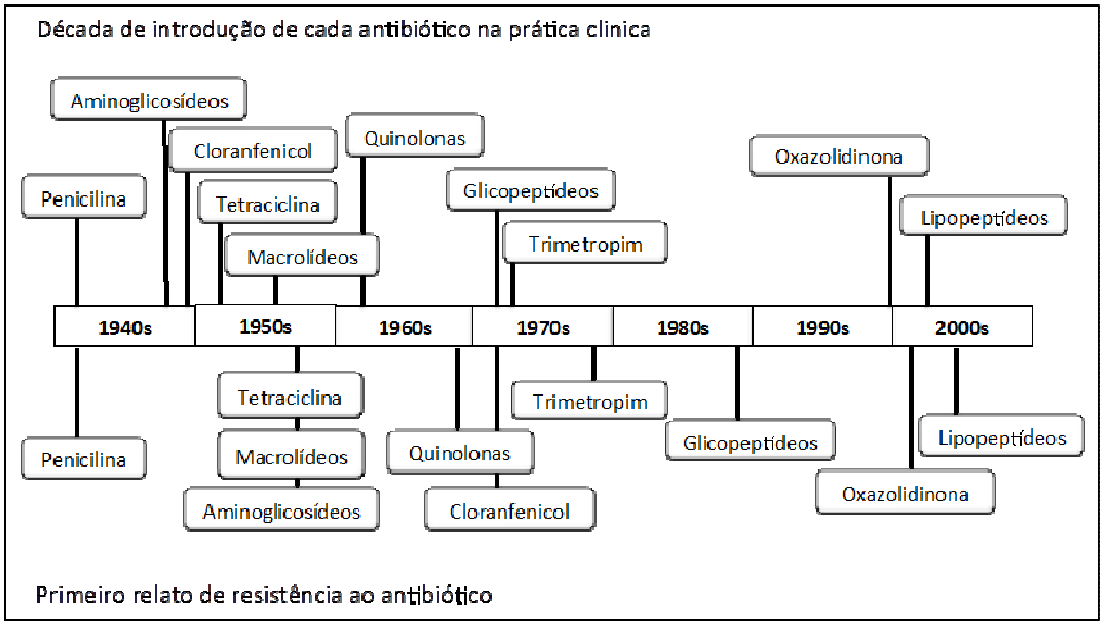

Figura 1. Esquema sobre a introdução dos antibióticos na prática clínica (parte superior) e a década em que o primeiro relato de resistência foi divulgado (parte inferior) (adaptado de: HOGBERG et al., 2010).

Quadro 1. Observa-se o rápido desenvolvimento da resistência aos antibióticos introduzidos na prática clínica comparados com o ano de aprovação pelo FDA (Food Drug Administration) (adaptado de: BUSH, 2004).

Antibiótico	Ano de aprovação pelo FDA	Primeiro relato de resistência
Penicilina	1943	1940
Estreptomicina	1947	1947
Tetraciclina	1952	1956
Meticilina	1960	1961
Ácido Nalidíxico	1964	1966
Gentamicina	1967	1969
Vancomicina	1972	1987
Cefotaxima	1981	1981 (AmpC β-lactamase) 1983 (ESBL)
Linezolida	2000	1999

O aumento da resistência e multi-resistência em cepas bacterianas tornou-se um problema global para os sistemas de saúde (HÖGBERG et al., 2010; MUNIR e XAGORARAKI, 2011). Do ponto de vista econômico, as infecções causadas por organismos multirresistentes são uma preocupação constante. O impacto econômico das escolhas de antibióticos em infeções causadas por organismos multirresistentes é um problema em crescimento, uma vez que muitas pesquisas documentam o alto custo extra para o sistema de saúde e procuram destacar para o cuidado na prescrição de antibióticos e para a procura por informações em antigas e novas drogas e a sua eficácia (CUNHA, 2006; WILKE, 2010).

Sabe-se que cepas bacterianas multirresistentes frequentemente causam maiores danos ao paciente infectado quando comparadas a cepas suscetíveis ou resistentes a poucos antibióticos. Estes dados podem ser observados em infecções

causadas por bactérias como *Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa, Enterobacter*, entre outros. A razão para resultados insatisfatórios não está necessariamente ligada ao perfil de virulência da cepa, mas sim à terapêutica antibiótica inicial administrada nestes pacientes e ao quadro geral clínico do paciente hospitalizado (ISTURIZ, 2010).

1.2. Antibióticos e o panorama atual

A utilização de antibióticos é uma das intervenções médicas mais importantes na história mundial com relação à redução da morbidade e mortalidade. (ANDERSSON e HUGHES, 2010; BLÁZQUEZ et al., 2012).

Sempre que uma droga é prescrita a um paciente uma pressão de sobrevivência atinge a comunidade bacteriana daquele paciente, sendo esta comunidade a causa da infeção ou não. Este evento leva a um processo evolucionário caracterizado pela competição entre cepas resistentes e suscetíveis, consequentemente favorecendo a seleção de bactérias resistentes aos antibióticos. Estes processos podem ocorrer naturalmente em pacientes, em populações assintomáticas ou no ambiente (WIESCH et al., 2011).

A resistência aos antibióticos atualmente disponíveis vem aumentando em um nível alarmante. Ao mesmo tempo, o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos para o tratamento de sérias infecções bacterianas vem decaindo. Como resultado do aumento e disseminação da resistência em muitas espécies bacterianas, a descoberta de novas drogas tornou-se uma das prioridades no cenário mundial da resistência antimicrobiana. No entanto muitas companhias farmacêuticas abandonaram ou diminuíram os programas de desenvolvimento para novos

antibióticos (BUSH, 2004; PANKEY, 2005; HOGBERG et al., 2010; BONELLI et al., 2014).

O mundo acompanha a adaptação bacteriana contra antigas e novas drogas, e repetitivamente são vivenciadas crises nas políticas de saúde, que afetam o governo, comitês hospitalares, companhias farmacêuticas, pesquisadores e a população, os quais frequentemente se deparam com dificuldades em promover avanços nos tratamentos de infecções por cepas multirresistentes (BALSALOBRE et al., 2014).

O panorama atual no cenário da resistência a antibióticos destaca-se como extremamente preocupante quando alguns estudos consideram alternativas para o tratamento de doenças infecciosas em uma situação na qual os antibióticos tornam-se obsoletos perante à resistência. Alternativas como terapia com fagos, bacteriocinas e atividades antibacterianas de drogas que não sejam antibióticos estão sendo estudadas com o objetivo de obter opções terapêuticas (NIGAM et al., 2014).

A situação em países em desenvolvimento também deve ser considerada. Nestes países a gravidade dos problemas é elevada, considerando que a população dos mesmos possui qualidade de vida e condições de infra-estrutura sanitária diferentes, vivendo em aglomerados ou locais precários para habitação e estão frequentemente mais suscetíveis a infecções (BONELLI et al., 2014).

As razões para o aumento da resistência antimicrobiana são complexas, mas através de estudos tornou-se evidente que o uso excessivo de antibióticos está ligado ao aumento e à seleção da resistência (HUTTNER et al., 2010). Mas apesar do dogma estabelecido há alguns anos, o aumento e a disseminação da resistência não são somente causados ou restritos a hospitais e ao uso excessivo de antibióticos.

Bactérias resistentes presentes em esgoto, água, alimentos, solo e outros ambientes, demonstram a participação da pressão ambiental em cepas bacterianas. A associação destas informações com a presença de antibióticos no ambiente, e seu uso na terapia veterinária e agricultura levaram pesquisadores do mundo a expandirem seus estudos para outros ambientes além do clínico (BALSALOBRE et al., 2014).

A presença de genes de resistência é frequentemente associada com a redução do desempenho da bactéria perante suas funções gerais e de metabolismo acarretando uma maior utilização de energia para manutenção destas e novas funções. Portanto, tem sido proposto que a redução no uso de antibióticos beneficiaria cepas sensíveis, as quais teriam melhor desempenho, permitindo com o tempo que estas cepas estivessem em maior número que as cepas resistentes. Estudos experimentais apóiam este conceito, mas outros processos como a evolução e a seleção genética desaprovam o conceito e demonstram que é muito mais complexo reverter a resistência a antibióticos (ANDERSSON e HUGHES, 2010; PERRY e WRIGHT 2013).

Baseando-se nas informações anteriores, o uso racional de antibióticos em práticas clínicas, no ambiente e em procedimentos da saúde ainda é a melhor forma de impedir o aumento e a disseminação da resistência bacteriana. A coleta de informações, pesquisas inovadoras e trocas de dados entre centros de pesquisas, médicos, enfermeiros e qualquer profissional desta área da saúde são fundamentais para amenizar os efeitos da resistência bacteriana e as consequências trazidas por ela para a saúde da população.

1.3. A resistência bacteriana na área da Saúde Pública

A história dos esforços para controlar patógenos infecciosos mostra um fato desconcertante: à medida que os antimicrobianos foram sendo utilizados por períodos prolongados, a resistência bacteriana evoluiu. Essa resistência diminuiu substancialmente nossa habilidade de controlar muitas doenças importantes, com prejuízos não só econômicos, mas também sociais para a Saúde Pública (MUNIR e XAGORARAKI, 2011; WIESCH et al., 2011).

A resistência bacteriana a antibióticos, um processo que mundialmente conheceu um rápido e descontrolado crescimento nas últimas duas décadas, é aceito hoje como um dos maiores problemas de Saúde Pública (COCULESCU, 2009; EDGAR et al., 2009; HOGBERG et al., 2010; HUTTNER et al., 2010; KUREK et al., 2011; SVARA e RANKIN, 2011).

Órgãos de saúde reconhecidos mundialmente como a Organização Mundial da Saúde (OMS) e o CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) disponibilizam documentos atualizados sobre a situação da resistência bacteriana no mundo. A OMS defende que determinar o escopo da problemática é essencial para formular e monitorar uma resposta efetiva dentro do panorama da resistência bacteriana. Relatórios elaborados em colaboração por diversos profissionais e organizações fornecem informações mais precisas sobre a dimensão da resistência bacteriana e o estado atual da vigilância global (WHO, 2014).

O impacto que a resistência bacteriana pode causar depende do nível de resistência da bactéria, o sítio de infecção, a disponibilidade de terapias efetivas e o quadro clínico geral do paciente (RICE, 2009; ISTURIZ, 2010). O aumento da

resistência consequentemente manifesta o aumento da infecção ou a sintomatologia clínica prolongada, o aumento no número de dias de hospitalização, e não menos importante, o aumento exorbitante de custos na área da saúde (COCULESCU, 2009; WILKE, 2010).

O combate à resistência bacteriana deve ser liderado por cientistas biológicos, no entanto cientistas sociais desempenham um importante papel nos aspectos comportamentais do problema. Ambos, pacientes e profissionais da saúde, devem estar cientes de que o aumento da resistência bacteriana é em parte causada por comportamentos inapropriados em relação a diversos fatores como, por exemplo, o seguimento da terapia médica pelo paciente, a automedicação, a prescrição da droga, a adesão às medidas preventivas e de controle de infeções, entre outros (EDGAR et al., 2009; HUTTNER et al., 2010; SHRANK et al., 2010).

Muitas práticas de controle de infecções, saúde pública e melhoria da qualidade da saúde, foram descritas ao longo dos anos. Campanhas nacionais e internacionais, vêm sendo lançadas para combater, remediar ou minimizar os danos causados por bactérias resistentes e multirresistentes, no entanto essas intervenções requerem um equilíbrio entre o direito do indivíduo e a proteção da população (SANTOS et al., 2008; HOGBERG et al., 2010; HUTTNER et al., 2010).

1.4. O papel do ambiente na resistência bacteriana

Bactérias resistentes provenientes do ambiente são motivo de alarme para profissionais da área da saúde uma vez que estas bactérias podem afetar a saúde humana tanto pela exposição direta dos pacientes ao patógeno resistente quanto pela disseminação de determinantes genéticos.

A presença de antibióticos e outros poluentes no ambiente também contribui para a permanência de genes relacionados à resistência bacteriana (KRUSE e SORUM, 1994; GOÑI-URRIZA et al., 2000; HUDDLESTON et al., 2006; RADHOUANI et al., 2011) e o fato de determinantes genéticos terem sido observados em organismos de comunidades de ambientes naturais, aumenta a preocupação sobre o risco que estes reservatórios de resistência podem configurar para a saúde humana e ecológica (CHEE-SANFORD et al., 2001; SCHWARTZ et al., 2003; HENRIQUES et al., 2006; SEYFRIED et al., 2010).

Pesquisas têm estudado a presença de genes codificadores de resistência em isolados de bactérias de fontes não-clínicas, como alimentos e matrizes ambientais, e solo e água de diversas origens. Porém, o papel do ambiente na origem e transmissão da resistência a partir dos alimentos ou pela contaminação da água e culturas agrícolas é um tema que ainda necessita de investigação (MOURA et al., 2007; PRADO et al., 2008; ANSARI e MALIK, 2009; DROPA et al., 2009; LACHMAYR et al., 2009; BALSALOBRE et al., 2010).

Sabe-se que a maioria das espécies bacterianas existentes hoje não são organismos patogênicos. Estas bactérias interagem com uma variedade de substâncias químicas no ambiente, produzidas por outras bactérias, fungos, plantas, animais e até mesmo pelo homem (ZHANG et al., 2009; WRIGHT, 2010). E considerando os problemas ambientais causados por estas substâncias, a disseminação, persistência e aumento da resistência bacteriana estão diretamente associados a estes problemas ambientais.

Organismos resistentes presentes na água podem representar a resistência intrínseca de populações microbianas comuns àquele ambiente. Alternativamente, podem ser resultados da contaminação de fontes humanas como áreas agrícolas ou aqüicultura. A contaminação da água por antibióticos é um problema que tem aumentado a preocupação sobre a ocorrência e disseminação dos genes de resistência (WRIGHT, 2010).

A adaptabilidade genética fornece à bactéria uma considerável vantagem sobre a raça humana. Um ambiente poluído e antropicamente afetado contém um reservatório de resistência, onde uma diversidade de espécies e gêneros bacterianos, mantém, desenvolvem e trocam determinantes genéticos que constituem um risco para a saúde humana e ecológica (BALSALOBRE et al., 2014).

No entanto, existem evidências de que bactérias autóctones ambientais carreavam certos genes de resistência nunca antes detectados em bactérias patogênicas. Isto pode ser explicado pelo fato de que diversos antibióticos em uso pelo homem são produzidos por microrganismos ambientais ou são derivados de antibióticos naturais. Estes microrganismos provavelmente possuem mecanismos para se protegeram da atividade destes antibióticos produzidos por eles mesmos; e estes mecanismos podem ser os genes de resistência. A análise do genoma destes microrganismos mostrou que eles possuem genes pertencentes às mesmas famílias de genes de resistência observados em patógenos humanos (MARTÍNES e BAQUERO, 2014).

A maioria dos genes de resistência detectados são adquiridos via transferência horizontal de elementos geneticamente móveis, como plasmídios. Estes elementos

foram observados em patógenos isolados antes da era dos antibióticos, e não continham genes de resistência. A origem dos genes de resistência ainda é incerta, porém existem informações de que os genes de resistência a antibióticos detectados em bactérias patogênicas surgiram do ambiente (DROPA et al., 2009; BALSALOBRE et al., 2010; WILKE et al., 2010; WRIGHT, 2010; PERRY e WRIGHT, 2013).

1.5. Classes de antibióticos

Agentes antimicrobianos podem ser bactericidas, os quais possuem ação letal contra as bactérias; ou bacteriostáticos, os quais inibem seu crescimento. Agentes bactericidas são mais eficazes, mas agentes bacteriostáticos podem ser extremamente benéficos uma vez que permitem que as defesas normais do hospedeiro destruam os microrganismos (NEU e GOOTZ, 1996).

As principais classes de antibióticos foram descobertas há mais de 50 anos e afetam uma limitada parte da fisiologia bacteriana, como biossíntese de parede celular (β-lactâmicos e glicopeptídeos), integridade de membranas celulares (colistina e daptomicina), topoisomerases tipo II (fluoroquinolonas), ribossomos (macrolídeos, aminoglicosídeos, tetraciclinas, linezolida), transcrição (rifampicina), e biossíntese de folato (sulfonamidas e trimetoprim) (GWYNN et al., 2010). Na Figura 2 estão ilustrados os principais mecanismos de resistência bacteriana.

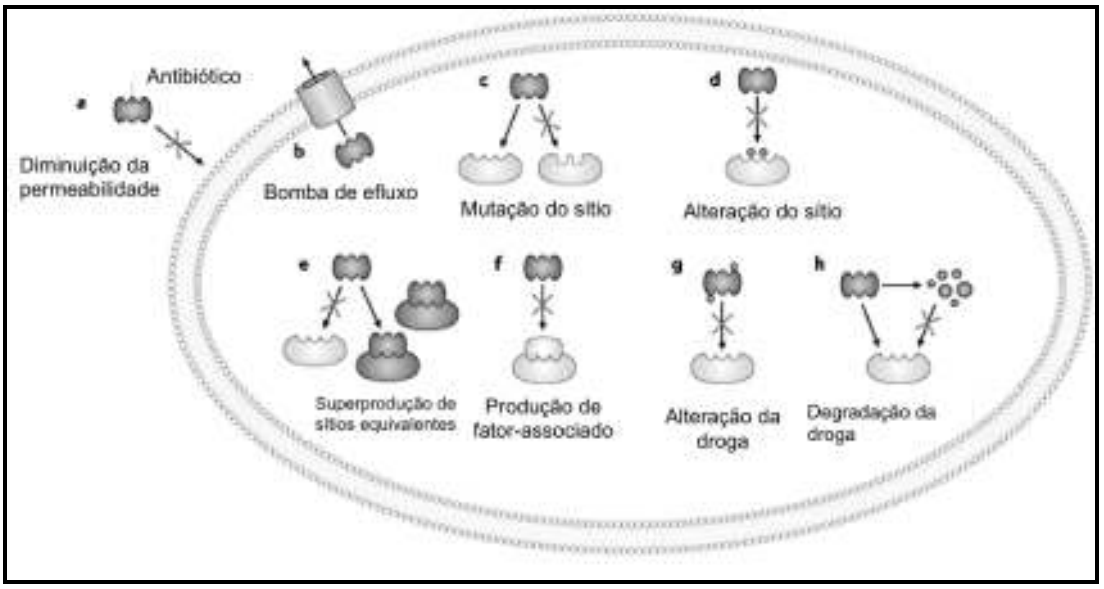

Figura 2. Principais mecanismos de resistência bacteriana. Diminuição da permeabilidade da membrana (a); expulsão da droga através de bombas de efluxo (b); mutação ou alteração do sítio onde o antibiótico irá se ligar (c) e (d); superprodução de uma molécula que imita o sítio onde o antibiótico irá se ligar (e); proteínas especializadas que removem o antibiótico do sítio alvo (f); modificação da molécula da droga (g); degradação enzimática do antibiótico (h) (adaptado de: WILSON, 2014).

1.6. Tetraciclinas

Os antibióticos da classe das tetraciclinas oferecem uma bagagem de experiência no surgimento, queda e ressurgimento de um antibiótico em larga escala no que se refere à seleção e ao aumento da resistência. Como tal, a trajetória das tetraciclinas fornece importantes informações no impacto da resistência em uma classe de antibióticos e as opções e estratégias para pesquisadores e clínicos em manter um valioso grupo de drogas (THAKER et al., 2010).

Descoberta há 60 anos como a primeira classe de antibióticos de amplo-espectro, as tetraciclinas foram rapidamente utilizadas na medicina humana, na veterinária e na agricultura, especialmente por possuírem poucos efeitos colaterais (CHOPRA e ROBERTS, 2001; ROBERTS, 2003; THAKER et al., 2010).

Onze diferentes derivados de tetraciclina chegaram ao mercado farmacêutico. Todos, exceto a tigeciclina, podem ser administrados por via oral, e 5 (oxitetraciclina, limeciclina, doxiciclina, minociclina e tigeciclina) podem ser usados de forma parenteral (ROBERTS, 2003; PEREIRA-MAIA et al., 2010).

A tetraciclina representa a primeira geração dos antibióticos dessa classe, seguida da segunda geração composta pela minociclina e doxiciclina e recentemente a terceira geração foi introduzida no mercado farmacêutico tendo como representante a tigeciclina, a qual embora tenha sido quimicamente nomeada como uma glicilciclina, neste estudo será considerada como parte da classe das tetraciclinas (Figura 3) (THAKER et al., 2010).

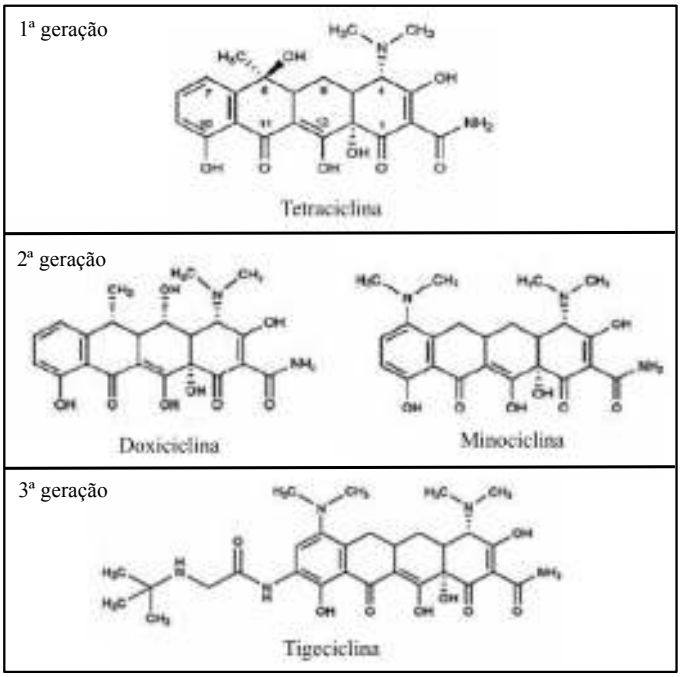

Figura 3. As moléculas de diferentes antibióticos que compõe a classe das tetraciclinas divididos em primeira, segunda e terceira gerações.

A primeira e segunda gerações destes antibióticos podem ser administrados no tratamento de pneumonias atípicas, infecções causadas pelos gêneros *Rickettsia* e *Chlamydia*, doença de Lyme, cólera, sífilis, periodontites, acne, rosácea, úlceras

pépticas causadas por *Helicobacter pylori*, tratamento de infecções causadas por *Bacillus anthracis* (anthrax), dentre outros. Enquanto que a tigeciclina é utilizada no tratamento de infecções graves de pele, tecidos moles e intra-abdominais (ROBERTS, 2003; PEREIRA-MAIA et al., 2010; BAHRAMI et al., 2012). A tigeciclina e a minociclina são também indicadas no tratamento de infecções causadas por *Staphyloccocus aureus* resistentes a meticilina (MRSA), sendo umas das poucas opções disponíveis para o tratamento desta linhagem bacteriana (PEREIRA-MAIA et al., 2010).

As utilidades clínicas das tetraciclinas podem ir além de suas propriedades antimicrobianas. Estudos têm apontado novos usos destes antibióticos, principalmente com relação à tetraciclina, doxiciclina e minociclina. A maioria destas novas potenciais indicações de uso são nas áreas cardiovasculares, neurológicas, doenças inflamatórias e imunossupressoras, e no tratamento do câncer (PEREIRA-MAIA et al., 2010; BAHRAMI et al., 2012).

As tetraciclinas possuem um excelente índice terapêutico e baixo custo, além de a maioria destes antibióticos estarem disponíveis para uso oral. Estas características fizeram destas drogas as principais opções no tratamento de pacientes. Infelizmente, o uso excessivo e por longo tempo das tetraciclinas manteve uma contínua pressão seletiva, o que proporcionou o surgimento da resistência a essas drogas em bactérias previamente suscetíveis. Como resultado, o uso de tetraciclinas diminuiu significativamente durante os anos seguintes (THAKER et al., 2010). Apesar disso a tetraciclina continua a ser usada para tratamento em uma variedade de infecções por organismos Gram-positivos e Gram-negativos, bactérias intracelulares e infecções causadas por protozoários (ROBERTS, 2005).

Algumas desvantagens na utilização das tetraciclinas podem ser citadas, como o fato de serem bacteriostáticas e não bactericidas, além de não poderem ser usadas para tratamento em gestantes ou em crianças, pois prejudicam o crescimento de ossos e causam amarelamento dos dentes em crianças. Existe também o problema de descontinuidade do tratamento por parte do paciente, uma vez que este geralmente envolve múltiplas doses. Apesar destas características, a combinação de baixa toxicidade e a atividade de amplo espectro compensam as desvantagens que os antibióticos desta classe possuem (SPEER et al., 1992).

O fator mais importante que contribui para a resistência a tetraciclinas resulta da aquisição de genes *tet*, por meio de elementos móveis, o que consequentemente levou à seleção de um grande número de determinantes genéticos denominados "o resistoma da classe tetraciclina" (*the tetracycline resistome*) (Figura 4).

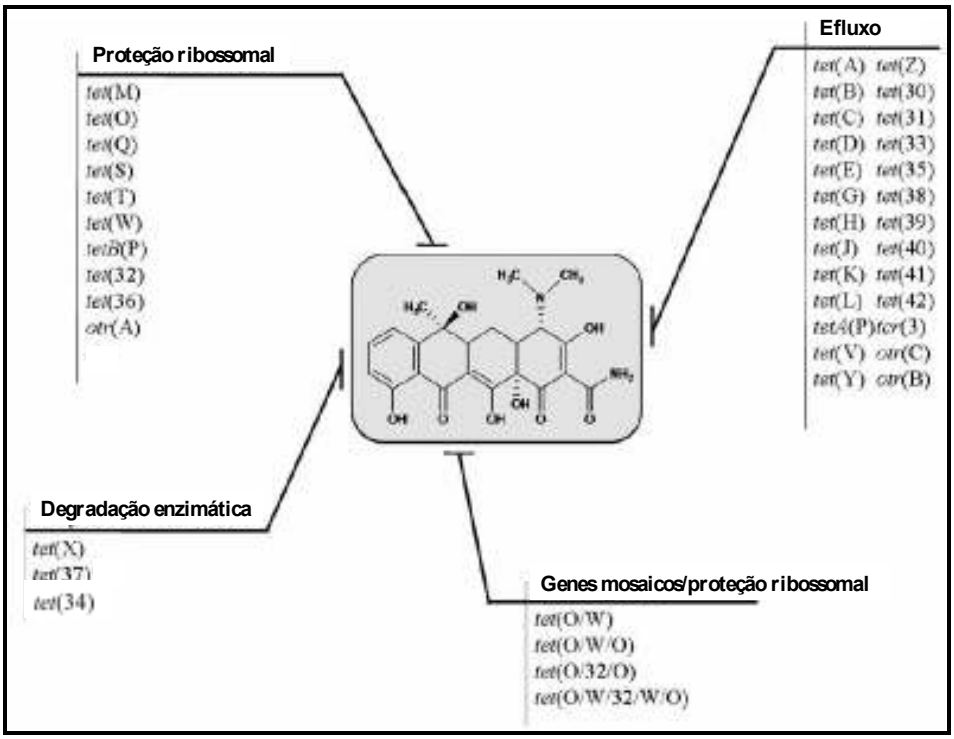

Figura 4. Os mecanismos de resistência a tetraciclinas e a distribuição dos determinantes genéticos de acordo com o mecanismo (adaptado de: THAKER et al., 2010).

O conceito de "resistoma" refere-se à agregação de todos os genes de resistência antimicrobiana, e que não somente abrangem mecanismos detectados em patógenos, mas também genes de resistência detectados em bactérias ambientais autóctones normalmente não associadas a doenças (THAKER et al., 2010). A diversidade do "resistoma" da classe da tetraciclina inclui mais de 1189 genes descritos, identificados em mais de 84 gêneros e 354 espécies de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (LIU e POP, 2009).

Os genes *tet* são frequentemente carreados por plasmídios conjugativos, os quais permitem a mobilidade através da transferência genética, inseridos em transposons (AUERBACH et al., 2007), mas existem relatos da presença de genes *tet* no cromossomo bacteriano (CHENG et al., 1994; AMMOR et al, 2008; ZHANG et al., 2009).

Estudos de resistência a tetraciclinas ocorrendo naturalmente em bactérias ambientais autóctones, representativas de populações existentes antes do uso abrangente de tetraciclinas, suportam a visão de que o surgimento da resistência é um evento que seguiu a introdução desses agentes no uso clínico, veterinário e agrícola (ROBERTS, 2005).

1.6.1. Mecanismos de ação das tetraciclinas

Tetraciclinas inibem a síntese de proteínas não permitindo a associação do aminoacil-tRNA com o ribossomo bacteriano (Figura 5). Portanto, para interagir com seus alvos essas moléculas precisam atravessar uma ou mais membranas dependendo se o microrganismo é Gram-positivo ou Gram-negativo. A maneira como as tetraciclinas se ligam ao ribossomo ou como funciona a sua atividade contra

bactérias e protozoários ainda vem sendo discutida pelos pesquisadores (SPEER et al., 1992; CHOPRA e ROBERTS, 2001; ROBERTS, 2003; THAKER et al., 2010).

Estudos demonstraram que as tetraciclinas têm uma preferência por se ligarem a subunidade 30S do ribossomo e que a proteína ribossomal 7S faz parte do sítio de ligação e possivelmente a região altamente conservada do 16S rRNA, o que explicaria a atividade de amplo espectro das tetraciclinas (SPEER et al., 1992; CHOPRA e ROBERTS, 2001; ROBERTS, 2003; O'GRIFFIN et al., 2010).

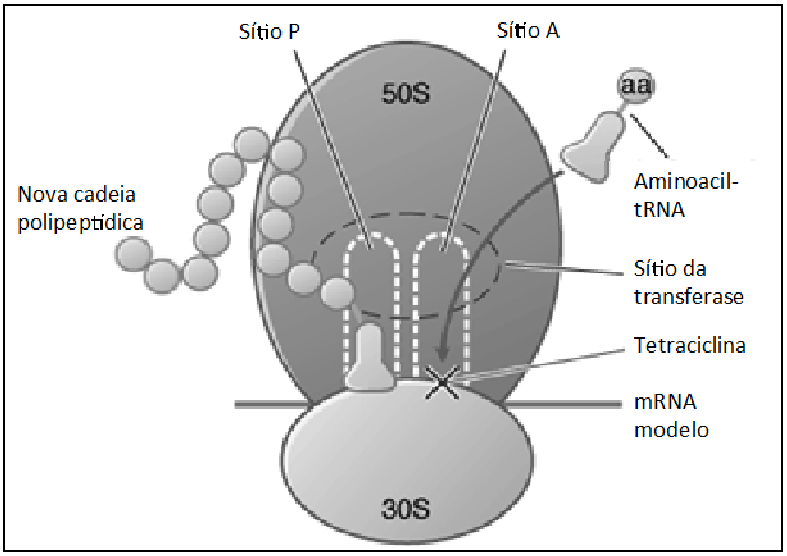

Figura 5. Ilustração do mecanismo de ação das tetraciclinas, indicando a sua ligação à subunidade 30S do cromossomo impedindo a síntese de proteínas pela não associação do aminoacil-tRNA (Adaptado de: http://www.antibiotics-info.org/tetracycline.html).

A tigeciclina é um 9-*t*-butilglicilamido semi-sintético derivado da minociclina. A mudança estrutural na posição 9 é responsável pelas diferenças observadas em relação à afinidade de ligação aos sítios do ribossomo bacteriano, quando comparada aos outros antibióticos da classe. Estudos demonstraram que a tigeciclina se liga às subunidades 30S e 70S do ribossomo e que essa ligação é cinco vezes mais forte quando comparada às outras tetraciclinas. Estas características

causadas pelas modificações na estrutura molecular da tigeciclina conferem a este antibiótico um espectro de atividade maior e permite que ele seja ativo mesmo em isolados que possuem mecanismos de resistência a tetraciclinas, direcionando novamente a atenção às drogas desta classe (ROSSI e ANDREAZZI, 2006; HAWKEY e FINCH, 2007).

1.6.2. Mecanismos de resistência a tetraciclinas

As bactérias podem utilizar três estratégias para se tornar resistentes às tetraciclinas: (1) limitar o acesso do antibiótico ao ribossomo expulsando o mesmo da célula bacteriana através de bombas de efluxo, (2) alterar o ribossomo para prevenir a ligação das tetraciclinas a ele, e (3) produzir enzimas que inativem as tetraciclinas.

Bombas de efluxo

As bombas de efluxo estão distribuídas entre bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. De acordo com a nomenclatura dos determinantes de resistência a tetraciclina, vinte e sete classes estão definidas A–E, G, H, I, J, K, L, P, V, Y, Z, 30, 31, 33, 35, 38, 39, 41, 42, *tcr3, otrB, otrC* e A(P) (AMINOV et al., 2002; GUILAUME et al., 2004, THAKER et al., 2010).

A utilização de bombas de efluxo permite à bactéria diminuir a concentração do antibiótico dentro da célula através de um sistema de expulsão da droga (SPEER et al., 1992; CHOPRA e ROBERTS, 2001; ROBERTS, 2003; NG et al., 2001; AMINOV et al., 2002; THAKER et al., 2010).

As bombas de efluxo codificadas para tetraciclina possuem uma seletividade por seu substrato, diferente de algumas bombas de efluxo não seletivas (ZECHINI e VERSACE, 2009). Os genes que codificam as bombas de efluxo pertencem à maior superfamília de proteínas, MFS, a qual inclui mais de 300 proteínas individuais (CHOPRA e ROBERTS, 2001; THAKER et al., 2010). A regulação da expressão para essas proteínas MFS está freqüentemente ligada a um repressor de proteína da família TetR, o qual se liga à região "upstream" do operador de genes codificadores de bombas de efluxo e negativamente regula a expressão da proteína. As tetraciclinas também se ligam a TetR resultando numa mudança conformacional que enfraquece sua interação com o DNA consequentemente levando à dissociação da região do operador, permitindo a síntese da proteína (THAKER et al., 2010).

Genes codificadores de bomba de efluxo são observados em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. A maioria destes genes confere resistência à tetraciclina, mas não à minociclina ou à tigeciclina. No entanto, o gene *tet*(B) de bactérias Gram-negativas codificam uma proteína de efluxo que confere resistência à tetraciclina e minociclina, mas não à tigeciclina; porém, mutações promovidas em laboratório nos genes *tet*(A) ou *tet*(B) levaram à resistência à tigeciclina, sugerindo que as bactérias podem se tornar resistentes a esta droga com o passar do tempo e seu uso clínico (SPEER, 1992; CHOPRA e ROBERTS, 2001; THAKER et al., 2010). O gene *tet*(B) é o mais detectado em bactérias patogênicas, portanto se a bactéria em questão carrear alguns dos outros genes de bomba de efluxo que não seja o *tet*(B), a terapia com minociclina pode ser eficaz (ROBERTS, 2003).

Suscetibilidade diminuída à tigeciclina foi observada em cepas que apresentaram superexpressão de *mep*A, um gene pertencente à família MATE de bombas de efluxo (MCALEESE et al., 2005) e em cepas contendo mutações espontâneas em complexos genéticos associados a bombas de efluxo como *lon, acr*R e *mar*R (LINKEVICIUS et al., 2013). Em outro estudo realizado por VILLA et al. (2013) a resistência à tigeciclina em cepas de *K. pneumoniae* foi associada a uma mutação no gene *ramR* causando a superexpressão do sistema de efluxo AcrAB-TolC, consequentemente levando à resistência a tigeciclina. Neste mesmo estudo, uma mutação na proteína ribossômica S10 também foi detectada em outra cepa de *K. pneumoniae* resistente à tigeciclina.

Proteção ribossômica

Existem 12 genes *tet* codificando proteínas de proteção ribossômica, o mais recentemente descrito foi denominado *tet*(44) (http://faculty.washington.edu/marilynr /tetweb1.pdf; ROBERTS, 2005) e entre os mais amplamente distribuídos estão *tet*(M), *tet*(W), *tet*(O) e *tet*(Q) (AMINOV et al., 2001).

A hipótese de como este mecanismo atua se dá da seguinte forma: sob condições ordinárias os ribossomos possuem conformações e funções normais. Este equilíbrio é modificado com a introdução da tetraciclina no sistema. O antibiótico liga-se aos ribossomos mudando sua conformação, o que gera a interrupção da elongação do ciclo e a síntese proteica é interrompida. Proteínas de proteção ribossômica interagem com a base da proteína h34, dentro do ribossomo, causando um desligamento do sítio de ligação primário da tetraciclina com o ribossomo e fazendo com que as moléculas do antibiótico se soltem do ribossomo, o qual retorna

à sua conformação normal e a síntese protéica continua (SPEER et al., 1992; ROBERTS, 2003; ROBERTS, 2005; THAKER et al., 2010).

Outra hipótese sugere que as proteínas de proteção ribossômica ligam-se ao ribossomo, mudando sua conformação e impedindo que as tetraciclinas se liguem a ele, impedindo a interrupção da síntese protéica (CHOPRA e ROBERTS, 2001). No entanto, a primeira hipótese é aparentemente a mais aceita por pesquisadores da área (THAKER et al., 2010).

As proteínas de proteção ribossômica (RPP – *ribossomal protection proteins*) são codificadas por uma classe de genes amplamente distribuída entre os determinantes de resistência a tetraciclinas, sendo encontradas em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Através deste mecanismo as bactérias apresentam resistência à primeira e segunda geração de tetraciclinas, mas não à terceira geração, como a tigeciclina (THAKER et al., 2010).

Apesar de apenas duas proteínas deste grupo, Tet(M) e Tet(O), terem sido extensivamente estudadas, outras como Tet(S), Tet(T), Tet(Q), TetB(P), Tet(W) e Otr(A) podem ser encontradas (CHOPRA e ROBERTS, 2001; CHOPRA, 2002; AMINOV et al., 2001; OLESEGUN e ROBERTS, 2011).

Inativação enzimática

Diferentemente de outras classes de antibióticos como os β-lactâmicos e aminoglicosídeos, onde a inativação e modificação das drogas são predominantes, existem apenas alguns casos de inativadores de tetraciclinas e poucos estudos sobre este mecanismo. Três genes foram descritos até o momento com associações à inativação enzimática das tetraciclinas, *tet*(X), *tet*(34) e *tet*(37) (SPEER et al., 1992;

ROBERTS, 2005; THAKER et al., 2010). No entanto somente o gene *tet*(X) teve seu papel comprovado na inativação das tetraciclinas, incluindo a inativação enzimática da terceira geração, composta pela tigeciclina, como descrito por MOORE et al. em 2005.

Genes mosaicos

Uma nova classe de determinantes genéticos foi recentemente descoberta. Uma classe de genes mosaicos, derivados de genes previamente conhecidos, nos quais pelo menos uma parte do gene possui 80% de homologia com um gene de resistência à tetraciclina e a outra parte homóloga a outro gene *tet* conhecido ou um novo determinante. A sequência de DNA dos genes mosaicos encontrados são compostos por sequências de genes *tet* que conferem resistência por proteção ribossomal. A maioria das bactérias que possuem esses genes foi encontrada em fazendas de criação animal ou em humanos, o que reflete a oportunidade de evolução da resistência na presença da droga (THAKER et al., 2010).

Como pôde ser observado existe uma variedade de genes *tet* e diferentes mecanismos de resistência compostos pelos diversos genes dificultando a atualização de pesquisadores e profissionais da área. Portanto, Marylin Roberts, em 2001, lançou na rede um website que traz informações relevantes sobre os genes *tet*. As informações podem ser acessadas em http://faculty.washington.edu/marilynr/.

1.7. Aquisição genética e a resistência bacteriana

A existência de elementos genéticos associados à resistência bacteriana tornou uma problemática ainda mais preocupante pela disseminação destes elementos por transferência genética horizontal, processo pelo qual a bactéria adquire

genes de resistência do ambiente ou de outras bactérias. Muitos dos genes de resistência conhecidos são detectados em elementos como transposons, plasmídios, bacteriófagos, ilhas genômicas ou integrons, os quais podem ser mobilizados e transferidos para outra bactéria de mesma ou diferente espécie (ALLEN et al., 2010; ANDAM et al., 2011; JUHAS, 2013).

A aquisição de genes por transferência horizontal pode mudar completamente o comportamento das células bacterianas, uma vez que estas podem adquirir mais de um gene ao mesmo tempo, cada um com uma função diferente, permitindo desde a utilização de novos substratos até a sobrevivência em ambientes tóxicos (JUHAS, 2013). Sendo assim, tornou-se de interesse científico a investigação de comunidades bacterianas ambientais, para verificar a presença da diversidade de elementos móveis que podem conter, incluindo principalmente plasmídios, integrons e transposons (SCHLÜTER et al., 2007; BAQUERO et al., 2008; RAHMAN et al., 2009).

A quantidade de material que pode ser horizontalmente transferido varia de fragmentos de genes até operons, superoperons e até mesmo cromossomos inteiros (ANDAM et al., 2011). Por estes motivos a transferência horizontal contribui para a trajetória da diversidade genética e evolucionária das populações bacterianas, sendo considerado um dos processos mais importantes para o aumento, recombinação e disseminação de bactérias multirresistentes, uma vez que fornece inovação metabólica e fisiológica para o organismo receptor, permitindo que este explore funções e habilidades previamente não existentes (ANDAM et al., 2011; DOMINGUES et al., 2012).

O conteúdo genético de uma bactéria é representado por dois tipos de estrutura: o nucleóide, que corresponde ao cromossomo, o qual contém os genes essenciais; e uma segunda categoria de estruturas representada por elementos genéticos extracromossômicos: plasmídios. Ambas as estruturas podem conter transposons, integrons, seqüências de inserção, etc; conhecidos como elementos móveis, os quais carreiam genes acessórios que permitem à célula adaptar-se a novas condições do ambiente (COCULESCU, 2009; CAMBRAY et al., 2010).

Bactérias sensíveis a antibióticos podem tornar-se resistentes devido a certas mudanças cromossômicas (em 10-20% dos casos) ou extracromossômicas (aproximadamente 80% dos casos de resistência). A resistência antimicrobiana adquirida surge por seleção, consequentemente à exposição a antibióticos, o que pode ocorrer em espécies naturalmente resistentes ou devido ao surgimento de variantes de resistência em algumas espécies previamente sensíveis (WITTE, 1998; KNAPP et al., 2008; COCULESCU, 2009; JUHAS, 2013).

A transferência de DNA pode acontecer de três maneiras diferentes, através de plasmídios, fagos ou pela incorporação de DNA livre (COCULESCU, 2009; HOGBERG et al., 2010; SVARA e RANKIN, 2011). Neste trabalho será abordada a transferência por plasmídios e elementos genéticos móveis, como transposons e integrons.

1.7.1. *Plasmídios*

Essencialmente qualquer um dos elementos genéticos móveis observados em bactérias são capazes de adquirir genes de resistência e disseminá-los. Existem similaridades e diferenças entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, no

entanto a transmissão de genes de resistência por plasmidios é o mecanismo mais comum de transferência horizontal (DAVIES e DAVIES, 2010; CARATTOLI, 2013).

Os plasmídios são moléculas de DNA extra-cromossômicas capazes de se replicar independentemente da replicação do cromossomo, contendo genes essenciais para iniciar e controlar sua replicação, e genes acessórios que podem ser úteis à sua célula hospedeira como genes de virulência, podendo também conferir à célula hospedeira resistência às maiores classe de antibióticos, incluindo β-lactâmicos, tetraciclinas, cloranfenicol, sulfonamidas, trimetropim, marolídeos e quinolonas (CARATOLLI et al., 2005; CARATOLLI, 2009; CARATOLLI, 2013). Portanto, diretamente ligados à disseminação dos genes de resistência, os plasmídios podem ser transmitidos e incorporados através da conjugação por diversas espécies e gêneros bacterianos, permitindo que a resistência seja disseminada e persista em nichos mesmo sem a presença dos antibióticos (HOGBERG et al., 2010; SVARA e RANKIN, 2011).

Uma das principais e mais importantes características do plasmídio é a sua propriedade de adquirir elementos genéticos móveis, como integrons e trasnposons, os quais mobilizam genes de resistência a antibióticos. Os plasmidios também são responsáveis por promover a transferência horizontal de genes entre bactérias de espécies e gêneros diferentes, dependendo da sua capacidade de alcance de hospedeiros, suas propriedades conjugativas e sua eficiência na conjugação (THOMAS e NIELSEN, 2005; CARATOLLI, 2013).

Frequentemente, no mesmo plasmídio podem ser detectados diferentes determinantes genéticos que conferem resistência a diversas classes de antibióticos, permitindo uma vantagem seletiva à bactéria receptora quando esta entra em contato com diferentes grupos de antibióticos administrados ao paciente ou presentes no ambiente. Plasmídios que conferem resistência a diferentes classes de antibióticos normalmente apresentam-se como plasmídios de alto peso molecular, com aproximadamente 50kb ou maiores. São conjugativos e codificam mecanismos sofisticados para controlar seu número de cópias, regulando o ritmo da replicação (NORDSTROM, 2006).

Os plasmídios podem ser divididos em dois grupos: conjugativos, que possuem todos os genes necessários para conjugação, sendo auto-transmissíveis; e mobilizáveis, os quais possuem apenas uma parte do aparato de conjugação e só podem ser transmitidos na presença de um plasmídio conjugativo (FROST et al., 1994; FRANCIA et al., 2004; ZAHRL et al., 2007; CARATTOLI, 2009; GARCILLÁN-BARCIA et al., 2009; DOMINGUES et al., 2012).

Plasmídios conjugativos

Apresentando um tamanho geralmente maior que 30kb, os plasmidios conjugativos carregam a estrutura completa responsável pela transferência. Esta estrutura é basicamente composta por: (1) uma origem de replicação oriV (genes *oriV*), (2) uma origem de transferência oriT (genes *oriT*), por onde se inicia toda transferência por conjugação; (3) e pelas proteínas do sistema Tra (genes *tra*), as quais formam o pilus conjugativo e o canal de transferência, e também codificam a

enzima relaxase (FROST et al., 1994; ZAHRL et al., 2007; GARCILLÁN-BARCIA et al., 2009).

A conjugação tem seu início com a secreção das proteínas do pilus, aproximando a célula doadora da receptora. Em seguida é formado o canal protéico de ligação entre as células, iniciando a transferência. A relaxase reconhece a região oriT de seu próprio plasmídio, clivando-a e permanecendo ligada covalentemente a ele, transportando ativamente o complexo relaxase/plasmídio fita simples (relaxossoma) pelo canal protéico para a célula receptora. A relaxase então une as extremidades da fita simples e se separa do plasmídio. Ocorre então a replicação das fitas e cada célula fica com uma cópia do plasmídio conjugativo (FROST et al., 1994; GARCILLÁN-BARCIA et al., 2009).

Plasmídios mobilizáveis

Os plasmídios mobilizáveis são geralmente menores que 15kb, e possuem em sua composição a origem de replicação oriV (genes *oriV*), origem de transferência oriT (genes *oriT*), e a enzima relaxase, além de outras proteínas acessórias (genes *mob*).

Apesar de codificarem sua própria enzima relaxase e possuírem o mesmo processo de clivagem da região oriT, este tipo de plasmídio precisa utilizar o sistema de transferência montado por plasmídios conjugativos, com a finalidade de realizar a transferência horizontal. Neste caso, tanto o plasmídio mobilizável como o conjugativo são transferidos e replicados (FRANCIA et al., 2004; GARCILLÁN-BARCIA et al., 2009).

Grupos de Incompatibilidade

Os grupos de incompatibilidade foram criados para classificar os tipos de plasmídios. Dois plasmídios com sistemas de replicação semelhantes não se propagam na mesma linhagem celular e a partir desta característica os plasmídios foram separados em grupos Inc. Os primeiros grupos Inc definidos foram IncI, IncN, IncF e IncP, e na família *Enterobacteriaceae* há 27 grupos Inc reconhecidos, entre eles 6 variantes de IncF e 3 variantes de IncI (CARATTOLI, 2009; CARATOLLI, 2013).

Esquemas de tipagem plasmidial baseados em *replicons* (regiões de replicação clonadas) foram propostos utilizando os grupos Inc *Southern Blot* e hibridização foram técnicas inicialmente utilizadas para tipagem de plasmídios. No entanto com a utilização da reação em cadeia pela polimerase (PCR), em uma técnica denominada *PCR-based replicon typing*, PBRT, padronizada para os grupos Inc de *Enterobacteriaceae* foi possível realizar a tipagem plasmidial com mais especificidade (CARATTOLI et al., 2005; KANG et al., 2008; CARATTOLI, 2009; JOHNSON e NOLAN, 2009; POOLE et al., 2009). A limitação desta técnica é que os plasmídios podem carregar múltiplos replicons ou apresentar mosaicismo nos mesmos, além de se aplicar unicamente às enterobactérias (GARCILLÁN-BARCIA et al., 2009).

1.7.2. Elementos genéticos mobilizáveis: transposons e integrons

Bactérias possuem métodos de troca genética diferentes dos métodos utilizados por eucariotos, mas ainda assim seguem as leis da evolução por seleção natural (STOKES e GILLINGS, 2011; IYER et al., 2013). Elementos mobilizáveis

associados com a transferência de genes de resistência pré-datam da era dos antibióticos, assim como os genes de resistência (STOKES e GILLINGS, 2011; JANSEN et al., 2013).

Existem diversos tipos de estruturas genéticas que podem se mover de um sítio para outro dentro de um mesmo genoma ou de uma célula para outra. Estes elementos genéticos móveis podem ser divididos em dois grupos: aqueles chamados elementos genéticos móveis intercelular como plasmidios e bacteriófagos, que podem se mover de uma célula para outra; e aqueles que não podem se auto-transferir mas que se utilizam dos elementos do primeiro grupo para se moverem, chamados elementos genéticos móveis intracelular, como transposons e integrons (SIGUIER et al., 2014).

Elementos genéticos móveis são sequências de DNA que possuem a habilidade de se integrar no genoma em um novo sítio dentro da mesma célula de origem. Os principais tipos de elementos móveis atualmente envolvidos na captura e mobilização de genes de resistência são observados em bactérias Gram-negativas (PARTRIDGE, 2011).

Transposons

Elementos transponíveis são sequências de DNA capazes de mudar sua posição dentro do genoma, criando novas mutações e podendo modificar o tamanho do genoma. Estes elementos possuem duas características principais que os diferenciam dos demais elementos genéticos, por serem móveis eles são capazes de mudar de ambiente genético, assim também modificando o local onde vão se inserir; e por alguns destes elementos possuírem a habilidade de se multiplicar durante o

processo de transposição consequentemente aumentando seu número de cópias (WICKER et al., 2007; BAO et al., 2009; SHAPIRO, 2010; HUA-VAN et al., 2011; IYER et al., 2013).

Os transposons podem se estabilizar e persistir nos genomas por milhões de anos, porém essa tarefa requer um equilíbrio entre a replicação e repressão de sua atividade, por este motivo os transposons normalmente possuem regiões alvo-específicas que exploram áreas como regiões reprimidas pela transcrição ou regiões não codificadoras, consideras mais seguras e que permitem que os transposons se mantenham por períodos mais longos (MARTIN et al., 2003). Transposons podem se mover de um plasmídio para um DNA cromossômico bacteriano ou de um plasmídio para outro plasmídio dentro de uma mesma célula (GRIFFITH et al., 2011).

Esses elementos são geralmente excisados de um sitio no genoma e integrado em outro do mesmo genoma, e são divididos em duas classes de acordo com seu mecanismo de transposição, para a classe I o mecanismo chamado "copia e cola" (replicativo) e o mecanismo "corta e cola" (conservativo) (KAZAZIAN, 2004; KAPITONOV e JURKA, 2008).

No mecanismo replicativo uma nova cópia do elemento é gerada no momento da transposição. O DNA resultante copiado será inserido no genoma em uma nova posição (KAPITONOV e JURKA, 2008; GRIFFITH et al., 2011). No mecanismo conservativo a enzima chamada transposase localizada entre sequências repetidas e invertidas nas extremidades liga-se nessas sequências ou próxima a elas e ao DNA alvo, removendo o transposon do primeiro sítio e inserindo-o no sítio alvo. Algumas destas transposases não necessitam um sítio especifico para se ligarem, outras no

entanto se ligam a uma sequência alvo-específica (KAZAZIAN, 2004; KAPITONOV e JURKA, 2008; GRIFFITH et al., 2011; IYER et al., 2013).

Os transposons também podem ser classificados de acordo com suas características de transferência; neste caso alguns transposons são mobilizáveis enquanto outros são conjugativos. Transposons mobilizáveis não codificam as funções para se auto transferirem, mas podem se aproveitar de outros elementos genéticos móveis para se movimentarem. Transposons conjugativos possuem a habilidade de se excisar do cromossomo onde estão localizados e promover sua própria transferência para um novo hospedeiro, sem a ajuda de outros elementos; (JUHAS, 2013).

E de acordo com sua estrutura os transposons podem ser divididos em Sequências de inserção (IS), Transposons Compostos e Transposons Simples (KLECKNER, 1981; BURRUS et al., 2002; MULLANY, 2002).

Seqüências de Inserção - IS

Sequências de inserção são segmentos de DNA capazes de se mover de uma posição para outra no mesmo cromossomo e carregam apenas os genes necessários para sua movimentação. Quando sequências de inserção aparecem localizadas no meio de algum gene elas interrompem a sequência codificadora e inativam a expressão daquele gene. Apesar dos elementos IS diferirem em suas sequências de DNA, eles possuem muitas características em comum. Todas as IS codificam uma proteína chamada transposase, a qual é uma enzima necessária para o movimento das IS de um sítio para outro; e todas as IS começam e terminam com uma pequena sequência repetida e invertida chamada IR (inverted repeat) também necessária para

sua mobilidade (Figura 6) (VIZVÁRYOVÁ e VALKOVÁ, 2004; GRIFFITH et al., 2011; SIGUIER et al., 2014).

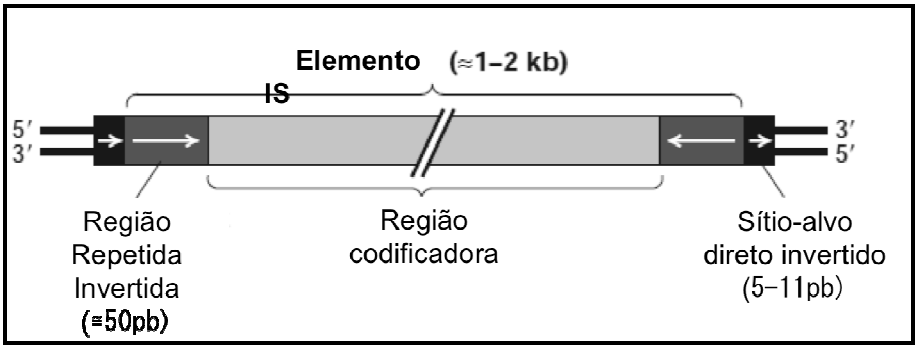

Figura 6. Estrutura geral de uma sequência de inserção (Fonte: LODISH et al., 2003).

Transposon composto

Os transposons compostos contém uma variedade de genes que se localizam entre os elementos IS que são orientados em direções opostas, formando as sequências repetidas invertidas. A transposase codificada por uma das IS é necessária para fazer a movimentação do transposon inteiro. Como exemplos de transposons compostos, as famílias Tn*9* e Tn*10*, que codificam genes de resistência entre as suas ISs (LODISH et al., 2002; GRIFFITH et al., 2011) (Figura 7).

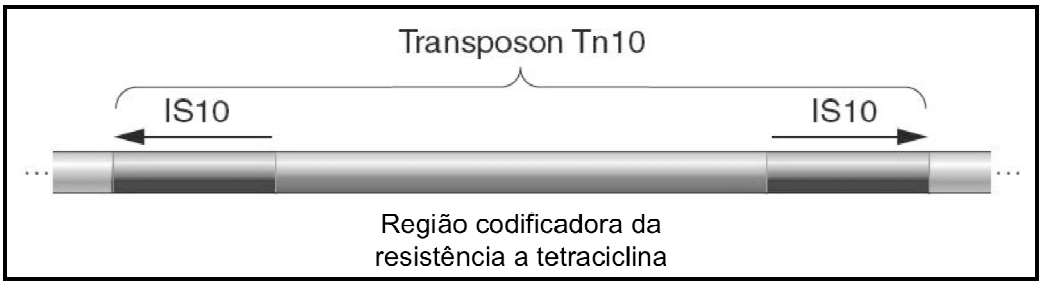

Figura 7. Estrutura do Transposon composto denominado Tn*10* (Fonte: GRIFFITH et al., 2011).

Transposons simples

Os transposons simples consistem em genes bacterianos flanqueados por sequências repetidas invertidas, no entanto essas sequências são pequenas, contendo

aproximadamente 50 pares de base. Esse tipo de transposon não codifica a enzima transposase que é necessária para a transposição, no entanto esses elementos codificam sua própria enzima transposase na região entre as sequências repetidas invertidas, juntamente com os genes que estão carreando (Figura 8). São exemplos as famílias Tn*3* e Tn*21* (SNYDER e CHAMPNESS, 1997; GRIFFITH et al., 2011).

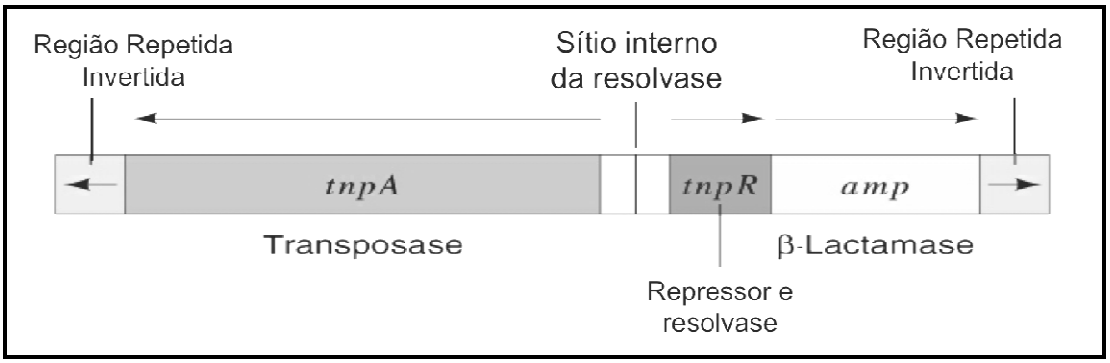

Figura 8. Estrutura de transposon não-composto (Fonte: MULLIGAN, 2002).

Transposons conjugativos

Transposons conjugativos são elementos mosaicos em sua estrutura, que possuem integrases semelhantes à de fagos e transferência semelhante à de plasmídios, portanto possuem a habilidade de se auto-transferirem, como por exemplo o Tn*916*. Os transposons conjugativos excisam do DNA e formam uma estrutura circular, se auto-transferindo de uma célula bacteriana para a outra, inclusive entre gêneros e espécies diferentes, como um plasmídio, no entanto o transposon conjugativo não se replica no hospedeiro. Os transposons conjugativos se auto-transferem por conjugação, uma vez que possuem os genes *tra* e oriT, necessários para sua mobilização (SALYERS et al., 1995; BURRUS et al., 2002; PEMBROKE et al., 2002; VIZVÁRYOVÁ e VALKOVÁ, 2004).

IS26, Tn10 e Tn1721

A sequência de DNA da IS*26* possui 820pb, carrega sequências repetidas invertidas terminais de 14pb e possui um única região aberta de leitura que codifica a transposase (MOLLET et al., 1983; PARTRIDGE, 2011). Estes elementos podem ser detectados em altas cópias em um mesmo genoma, sendo encontradas mais de 10 cópias em alguns plasmídios. Esta habilidade pode ser útil para a célula bacteriana na captura e aquisição de genes de resistência (PARTRIDGE, 2011; TOLEMAN e WALSH, 2011). A transposição da IS*26* é acompanhada por replicação e portanto cria uma fusão de plasmídios replicados ou uma cointegração (MAHILLON e CHANDLER, 1998). IS*26* foi uma das primeiras sequências de inserção a ser reconhecida por estar envolvida na aquisição de genes de resistência (TERAWAKI et al., 1967). A sequência de inserção IS*26* é o elemento que flanqueia diversos transposons compostos (MOLLET et al., 1983; DOUBLET et al., 2008).

IS*10* possui um tamanho de 1329pb com 22pb de sequências repetidas invertidas nas extremidades. A transposição ocorre pelo mecanismo "corta e cola" e aparentemente essa sequência de inserção procura por uma especificidade no alvo de integração. IS*10* é comumente encontrada como parte de um transposon composto chamado Tn*10*, que carrega genes de resistência a tetraciclina (MAHILLON e CHANDLER, 1998; LAWLEY et al., 2000; VIZVÁRYOVÁ e VALKOVÁ, 2004; PARTRIDGE, 2011). O número de cópias de IS*10*/Tn*10* aparenta ser limitado a apenas uma ou poucas cópias (CHALMERS et al., 2000).

Tn*1721* é um transposon derivado do subgrupo Tn*21* por sua vez pertencente à família Tn*3,* com uma estrutura diferenciada que inclui 3 sequências repetidas

invertidas de 38pb e uma sequência duplicada do gene *tnpA,* sendo a segunda cópia não funcional e a primeira responsável por codificar a transposase. A transposição deste elemento se dá através da cointegração, assim como a IS*26.* Genes de resistência à tetraciclina são carreados pelo Tn*1721* e em uma outra porção da estrutura pode ser observada uma sequência referente a Tn*1722* denominada por alguns trabalhos de transposon-menor*,* o qual pode se mover independentemente. Sequências completas do Tn*1721* são raramente encontradas no banco de dados Genbank (ALTENBUCHNER et al., 1983; GRINSTED et al., 1990; ALLMEIER et al., 1992; VIZVÁRYOVÁ e VALKOVÁ, 2004; PARTRIDGE, 2011).

Integrons

Diversos genes de resistência a antimicrobianos estão localizados em plasmídios e transposons, os quais permitem sua transferência entre uma variedade de espécies bacterianas. No entanto, um terceiro mecanismo de disseminação de genes de resistência foi descoberto. Este mecanismo envolve um elemento de DNA, denominado integron, que realiza a integração de genes de resistência através de um mecanismo de recombinação sítio-específica e possui promotores capazes de realizar a expressão do cassete de genes incorporado (LÉVESQUE et al., 1995; CAMBRAY et al., 2010).

Integrons possuem dois segmentos conservados separados por uma região variável, a qual inclui integrados genes de resistência a antimicrobianos ou cassete de funções desconhecidas. Em sua estrutura pode-se observar a região conservada 5' (5'CS) que inclui o sítio de recombinação *attI* onde os genes capturados são integrados, juntamente com uma sequência adjacente codificando uma integrase

*Int*I1 (no caso de integrons de classe 1, essa denominação muda de acordo com a classe do integron). Dois promotores estão localizados entre *Int*I e *att*I, P1 para expressão de *Int*I e Pc para expressão do cassete de genes. A região conservada 3' (3'CS) geralmente consiste de uma porção incompleta do gene *qac* (*qac*EΔ1) e o gene *sul*1 que conferem resistência a certos tipos de detergentes e sulfonamidas, respectivamente. O cassete de genes pode ser detectado numa forma de moléculas circular consistindo em uma região aberta de leitura e outra região de 59-bases (*att*C) (PELLEGRINI et al., 2011; DOMINGUES et al., 2012).

Os integrons são classificados de acordo com a sua sequência de integrase (MOURA et al., 2007) e também podem ser divididos em móveis e imóveis. Os integrons imóveis são os denominados super-integrons e os integrons móveis são classificados de 1 a 5, e quando associados a outros elementos móveis como transposons e plasmídios conjugativos, são mobilizáveis intra e inter-espécies (MAZEL, 2006; DROPA, 2013).

1.7.3. A disseminação de genes *tet*

Até o ano de 2001, CHOPRA e ROBERTS reportaram que 39 gêneros de bactérias Gram-negativas e 23 gêneros de Gram-positivas haviam sido associados com a ocorrência de genes *tet*. Atualmente não se sabe qual a amplitude de dispersão de genes *tet* em bactérias.

Os genes *tet* são detectados em uma variedade de bactérias isoladas de humanos, animais e do ambiente. A maior parte dos genes de resistência a tetraciclinas estão localizados em transposons, transposons conjugativos, plasmídios de uma variedade de grupos de incompatibilidade, e/ou integrons, o que permite a

transferência genética por conjugação de uma espécie para outra, ou mesmo entre gêneros. Os elementos móveis aos quais os genes *tet* estão relacionados podem carrear outros genes codificadores de resistência a diferentes antibióticos e/ou metais pesados (SPEEER et al., 1991; CHOPRA e ROBERTS, 2001; ROBERTS, 2005).

Apesar de muitos genes *tet* estarem localizados em plasmídios não conjugativos ou transposons incompletos no cromossomo, alguns genes codificadores de bombas de efluxo e proteção ribossômica ainda estão amplamente disseminados em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (ZHANG et al., 2009).

Os genes codificadores de bomba de efluxo, como *tet*(B), são geralmente associados a plasmídios de alto peso molecular disseminados por conjugação, mas também podem ser observados em transposons inseridos em uma variedade de plasmídios e em integrons. Genes para proteção ribossômica estão geralmente associados a transposons conjugativos, como *tet*(M), e não conjugativos integrados no cromossomo, como é o caso dos genes *tet*(Q) e *tet*(W). Podem também estar relacionados a plasmídios, porém é um evento mais raro (CHOPRA e ROBERTS, 2001; ROBERTS, 2003; KNAPP et al., 2008).

Mais informações sobre o aparato genético associado aos genes *tet* foram verificadas em alguns estudos, os quais demonstraram a associação dos genes com transposons e seqüências de inserção, como *tet*(A) e Tn*1720*, *tet*(B) e Tn*10* *tet*(C) e Tn*1404* e *tet*(D) e IS*26* (COLEMAN et al., 1983; ALLMEIER et al., 1992; ALLARD et al., 1993; KIM et al., 1994; SCHNABEL e JONES, 1999). Estes elementos, juntamente com plasmídios e integrons permitem que os genes *tet* se disseminem entre espécies e gêneros (CHOPRA e ROBERTS, 2001).

Genes *tet* de bactérias Gram-negativas, inicialmente descritos nas famílias *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonadaceae*, são agora observados em *Neisseria, Haemophilus, Treponema* e *Vibrio*. O gene *tet*(B) é o gene *tet* codificador de bomba de efluxo mais amplamente disseminado, sendo observado em 20 gêneros de bactérias Gram-negativas, enquanto que o gene *tet*(M) foi detectado em 26 gêneros entre Gram-negativos e Gram-positivos. O gene *tet*(E) parece estar menos disseminado pois está provavelmente localizado em plasmídios não conjugativos e também já foi detectado no cromossomo bacteriano (LEE et al., 1993; CHOPRA e ROBERTS, 2001). Outros autores encontraram o gene *tet*(E) associado com plasmídios transferíveis e de alto peso molecular em isolados de um criadouro de peixes, e foi provada a sua capacidade de ser transferido para outras espécies (AGERSO et al., 2007).

Em 1992 JONES et al. descobriram uma relação entre os grupos de incompatibilidade plasmidial (Inc) e os genes *tet* carreados. Neste estudo os autores sugeriram que alguns genes *tet* podem ter se tornado geneticamente mais propícios a se ligarem a determinados grupos Inc e, portanto observando a distribuição destes genes seria possível inferir a ocorrência de certos grupos Inc em gêneros e espécies específicas. No entanto esta hipótese não foi examinada mais detalhadamente.

Dentre os estudos brasileiros relacionados com resistência a tetraciclinas podem ser citadas pesquisas com *Escherichia coli*, *Neisseria gonorrhoeae, Shigella* spp., *Samonella enterica, Aeromonas* spp., entre outros (LIMA et al., 1995; DILLON et al., 2001; PEIRANO et al., 2006; BALASSIANO et al., 2007; SCALETSKY et al., 2010).

No entanto, são poucos os estudos nacionais que pesquisam a resistência a tetraciclinas em organismos específicos ou que fazem a relação da ocorrência dos genes com diferentes espécies de bactérias ou até mesmo de diferentes fontes de isolamento. Este tipo de estudo torna-se importante para o conhecimento da distribuição de genes de resistência, sua ocorrência e relação entre cepas ambientais e clínicas, como no estudo realizado por BALSALOBRE et al. (2010) onde o gene $bla_{\text{TEM-116}}$ foi detectado em isolados ambientais de *Aeromonas jandaei* e *Aeromonas hydrophila* não-ESBL, enquanto que DROPA et al. (2009), encontraram o gene em um isolado clínico de *Klebsiella pneumoniae* multirresistente.

Enterobacteriaceae

O aumento nos índices de resistência a antimicrobianos na família *Enterobacteriaceae* reduz o número de drogas efetivamente eficazes que podem ser usadas para tratar as infecções causadas por estes patógenos (FALAGAS et al., 2010). A terapia tradicional para enterobactérias incluí aminoglicosídeos, β-lactâmicos, fluoroquinolonas, inibidores de folato e tetraciclinas. No entanto, o aumento da resistência bacteriana tem diminuído a efetividade clínica desses antibióticos (HAWKEY e FINCH, 2007; BONELLI et al., 2014).

A resistência antimicrobiana em patógenos entéricos é de extrema importância em países em desenvolvimento, uma vez que o índice de doenças diarréicas é alta. O contínuo uso inapropriado de antibióticos, e por conseqüência a pressão seletiva, contribuíram para o aumento de bactérias multirresistentes. *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp. patogênicas mostraram aumento na resistência

antimicrobiana nos últimos anos (AKORTHA e EGBULE, 2008; BONELLI et al., 2014).

Dentre a diversidade de genes *tet*, pode-se observar uma maior ocorrência dos determinantes A, B, C, D e M em *K. pneumoniae*, e A, B, C, D, E, G, M e Y em *E. coli* (FLUIT et al., 2004, HAWKEY e FINCH, 2007).

Gênero Aeromonas

Membros do gênero *Aeromonas* têm sido associados a uma variedade de doenças em humanos, incluindo desordens gastrintestinais e infecções sistêmicas tanto em hospedeiros imunocomprometidos quanto em hospedeiros saudáveis (BALSALOBRE et al., 2009). A prevalência de *Aeromonas* no ambiente é uma importante ameaça para a Saúde Pública, já que as infecções causadas por este gênero geralmente são adquiridas pelo consumo de água e alimento contaminados (CHOPRA e HOUSTON, 1999; SEN e RODGERS, 2004; EPA, 2006; HUDDLESTON et al., 2006; PALÚ et al., 2006).

Em adição aos fatores de virulência presentes no gênero, altos índices de resistência a antimicrobianos foram relatados na literatura, já sendo comprovada a existência de 3 genes cromossomicamente localizados responsáveis por resistência a ampicilina, carbapenêmicos e cefamicinas (TALAVERA et al., 2006; BALSALOBRE et al., 2009). Autores descreveram a presença de plasmídios carreadores de determinantes genéticos de resistência a tetraciclina em espécies de *Aeromonas*, inclusive em isolados brasileiros, sendo os mais comuns caracterizados como *tet*(A) e *tet*(E) (RHODES et al., 2000; SCHMIDT et al., 2001; L.ABÉE-LUND e SORUM, 2002; BALASSIANO et al., 2007). E a presença da sequência de

inserção denominada ISAS5 em cepas carreando genes de resistência à tetraciclina, foi encontrada em espécies de *Aeromonas* (TRUDEL et al., 2013).

1.8. Relevância do estudo em Saúde Pública

A resistência antimicrobiana é mundialmente causa de preocupação devido ao seu crescimento nas últimas décadas. Na literatura encontra-se informações sobre as causas da emergência da resistência antimicrobiana, entre elas, o uso indiscriminado de antibióticos na medicina veterinária e humana, bem como na agricultura e aqüicultura.

Antibióticos como as cefalosporinas e carbapenens são alvos de pesquisas e interesse de pesquisadores e profissionais da área, já que atualmente são os compostos mais utilizados nos tratamentos clínicos e consequentemente os mais suscetíveis a adaptação bacteriana. No entanto, sabe-se que a velocidade em que as bactérias se adaptam é alta, e portanto, é proposta por diversos pesquisadores, a vigilância da ocorrência de genes de resistência e a determinação de seu mecanismo, não só relacionados aos antibióticos mais utilizados, mas também relacionaos àqueles antibióticos que podem ser utilizados como opções de tratamento quando todos os outros forem descartados frente a uma cepa multirresistente.

Bactérias isoladas de fontes clínicas eram os principais alvos das pesquisas mundiais. Esse panorama vem se modificando gradativamente, uma vez que os pesquisadores têm se deparado com dados que associam bactérias isoladas de fontes clínicas com aquelas isoladas de fontes ambientais. Essa informação alertou os profissionais e pesquisadores da área para o fato de que genes de resistência

presentes em hospitais e infecções hospitalares, também estavam sendo observados em bactérias isoladas de fontes ambientais, como água e solo.

A classe de antibióticos tetraciclinas teve um extenso uso na medicina e agricultura logo após sua descoberta há seis décadas, gerando a seleção de um considerável número de determinantes genéticos de resistência, e com o intuito de resistir ao antibiótico, as bactérias se utilizaram de diferentes mecanismos moleculares. Com o surgimento de novas drogas, a utilização da tetraciclina e seus análogos foi consideravelmente diminuída. No entanto, nos últimos anos a doxiciclina e a minociclina surgiram como novos antibióticos dessa classe, porém tiveram seu uso rapidamente diminuído devido à resistência bacteriana. E recentemente um novo composto desta classe denominado tigeciclina foi sintetizado e tornou-se alvo de interesse dos pesquisadores e clínicos, uma vez que esta droga possui propriedades de tratar as infecções bacterianas em cepas resistentes não só a outras classes de antibióticos, mas também à classe das tetraciclinas.

Este estudo foi elaborado baseado em duas hipóteses: (1) se a resistência bacteriana à tigeciclina estará disseminada nos isolados clínicos e ambientais do presente estudo, e se os determinantes genéticos que conferem resistência a tetraciclina, doxiciclina e minociclina podem ser os mesmos que conferem resistência à tigeciclina e (2) se a resistência à tetraciclinas estará presente na maior parte dos isolados selecionados para o estudo e quais são seus mecanismos de disseminação.

Portanto, visando reunir dados sobre a ocorrência da resistência a tetraciclinas, os mecanismos de resistência dos genes relacionados à essa resistência

e a caracterização de seus ambientes genéticos, o presente estudo propõe a busca destas informações em isolados ambientais de *Aeromonas* spp., *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, e em isolados clínicos de *E. coli* e *K. pneumoniae.*

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Verificar o perfil de sensibilidade a tetraciclinas em isolados clínicos e ambientais de *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae* e *Aeromonas* spp., bem como pesquisar os principais genes *tet* associados à resistência a esta classe de antibióticos e determinar a potencial forma de disseminação destes genes por meio da caracterização de seus ambientes genéticos.

2.2. Objetivos específicos

1. Verificar a resistência fenotípica à tetraciclina, doxiciclina, minociclina e tigeciclina;
2. Pesquisar genes *tet* que conferem resistência a tetraciclinas através dos mecanismos de proteção ribossomal, bombas de efluxo e produção enzimática, e caracterizar o ambiente genético dos genes observados;
3. Realizar a tipagem plasmidial por meio da determinaçãoo de grupos de incompatibilidade (Inc);
4. Determinar o perfil de similaridade genética dos isolados, evitando a seleção de isolados clonais nos experimentos de transformação e linearização dos plasmídios;
5. Determinar a localização (plasmidial ou cromossômica) dos genes *tet* detectados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Seleção dos isolados

Os 572 isolados selecionados para o estudo fazem parte da coleção de cultura do Laboratório de Prática de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. O estudo inclui isolados ambientais de *Aeromonas* spp., *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae,* e isolados clínicos de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*. Os isolados foram obtidos a partir de projetos de pesquisa previamente realizados no laboratório. Todos os isolados foram coletados dentro do estado de São Paulo.

Cepas ambientais:- 237 isolados de *Aeromonas hydrophila*, 23 isolados de *Klebsiella pneumoniae* e 95 isolados de *Escherichia coli*. ***Cepas clínicas:*** - 95 isolados de *Klebsiella pneumoniae* e 122 isolados de *Escherichia coli* (Quadro 2).

Quadro 2. Síntese das características dos isolados utilizados neste estudo.

Isolado	Microrganismo	n°	Isolamento	Ano	Projeto
Ambiental	*Aeromonas*	30	Águas superficiais[a]	1995, 1996	1
	Aeromonas	207	Esgoto e lodo[b]	2008-2009	2
	K. pneumoniae	23	Esgoto e lodo[b]	2008-2009	2
	E. coli	95	Esgoto e lodo[b]	2008-2009	2
Clínico	*K. pneumoniae*	95	Hospital universitário[c]	2004-2005	3
	E. coli	5	Hospital universitário[c]	2004-2005	3
	E. coli	117	Fezes diarréicas	2007	4

[a]Isolados provenientes de ambiente aquático e/ou de coleta em pontos de captação de água e recreação no Estado de São Paulo.
[b]Isolados provenientes de amostras de esgoto bruto e tratado, e lodo de esgoto.
[c]Isolados provenientes de infecções relacionadas à assistência à saúde, infecções comunitárias ou colonizações.
1 – (Genotipagem de *Aeromonas* spp isoladas de amostras ambientais, fatores de virulência e genes de resistência - Financiado pela FAPESP 2007-2009, Processo 2007/02266-7).
2 – (Detecção e genotipagem de *Aeromonas*, *Cryptosporidium* e *Giardia* em amostras ambientais - Financiado pela FINEP 2008-2010 - Financiadora de Estudos e Projetos).
3 – (Identificação molecular de genes de resistência codificadores de ESBL, detectados em cepas clínicas de *Enterobacteriaceae* relacionadas a infecções hospitalares - Financiado pela FAPESP 2009-2010, Processo 2008/08312-3).
4 – (Dissertação de mestrado - Etiologia das diarréias dos adultos atendidos nos pronto-socorros do município de Itapevi, 2007 - Eliana Suzuki).

3.2. Testes fenotípicos para detecção de resistência a tetraciclinas

Os isolados foram submetidos ao antibiograma utilizando primeiramente discos de tetraciclina. Apresentando-se resistente à tetraciclina, deu-se continuidade aos testes com doxiciclina, minociclina e tigeciclina (OXOID – UK). Os diâmetros de sensibilidade foram medidos e interpretados de acordo com CLSI, 2010, CLSI, 2012 e CLSI 2014 utilizando os valores padronizados para *Aeromonas* spp. e a família *Enterobacteriaceae*, respectivamente. Para interpretação da sensibilidade à tigeciclina foram utilizados valores padronizados pelo EUCAST, 2011.

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos isolados resistentes foi determinada utilizando-se fitas de Etest® (BioMerieux) para tetraciclina, doxiciclina, minociclina e tigeciclina. As instruções do fabricante foram seguidas e as CIM foram determinadas de acordo com as recomendações do fabricante.

3.2.1. Detecção de genes *tet*

3.2.1.1. Extração de DNA total

A extração do DNA total foi realizada por meio de choque térmico segundo CHAPMAN et al. (2001). As cepas foram semeadas em 2mL de Caldo Lúria 1% NaCl e incubadas a 35°C por 18-24h. O caldo foi transferido para tubos de 1,5mL e centrifugados a 12000rpm, a 24°C por 3 minutos. Descartado o sobrenadante, o sedimento (*pellet*) foi ressuspenso em 1mL de água mQ estéril. Os microtubos foram centrifugados a 12000rpm, a 24°C por 3min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 200µL de água mQ® estéril. A suspensão foi colocada em banho-maria a 95°C, por 10 minutos, e em seguida colocada em freezer -20°C, por 30 minutos. Os microtubos foram retirados do freezer e mantidos em repouso em

temperatura ambiente até o descongelamento. Os microtubos foram centrifugados a 12000rpm, a 24°C por 10min e o sobrenadante foi transferido para um tubo de 1,5mL do tipo eppendorf. Os tubos foram armazenados em freezer a -20°C.

3.2.1.2. Detecção de genes tet pela PCR

Em isolados não-sensíveis à tetraciclina foi realizada a pesquisa dos genes *tet*(A), (B), (C), (D), (E), (G), (H), (J), (K), (L), (Y), (Z) e (30) codificadores de bomba de efluxo; *tet*(B/P), (M), (O), (OTR), (Q), (S), (T) e (W) para proteção ribossômica e *tet*(X) para inativação enzimática. Os fragmentos obtidos a partir da PCR foram purificados com o kit Illustra™ GFX™ PCR DNA (GE – UK), sequenciados usando o 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems-US) e comparados com a base de dados GenBank utilizando a ferramenta BLAST. As reações de PCR foram padronizadas para todos os genes, com modificações na temperatura de anelamento para cada gene: 95°C por 5 minutos, seguido de 25 ciclos com denaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento por 15 segundos, e extensão a 72°C por 40 segundos, extensão final de 1 minuto e manutenção a 4°C (Quadro 3).

Quadro 3. Iniciadores usados para detectar genes *tet* para os diferentes mecanismos de resistência.

Iniciador	Seqüência 5'- 3'	Anelamento	Produto	Referência
Tet B-FW Tet B-RV	TACGTGAATTTATTGCTTCGG ATACAGCATCCAAAGCGCAC	61°C	206	AMINOV et al., 2002
Tet C-FW Tet C-RV	GCGGGATATCGTCCATTCCG GCGTAGAGGATCCACAGGACG	61°C	207	
Tet D-FW Tet D-RV	GGAATATCTCCCGGAAGCGG CACATTGGACAGTGCCAGCAG	56°C	187	
Tet E-FW Tet E-RV	GTTATTACGGGAGTTTGTTGG AATACAACACCCACACTACGC	52°C	199	
Tet G-FW Tet G-RV	GCAGAGCAGGTCGCTGG CCYGCAAGAGAAGCCAGAAG	60°C	134	
Tet H-FW Tet H-RV	CAGTGAAAATTCACTGGCAAC ATCCAAAGTGTGGTTGAGAAT	50°C	185	

Quadro 3 (continuação). Iniciadores usados para detectar genes *tet* para os diferentes mecanismos de resistência.

Iniciador	Seqüência 5'- 3'	Anelamento	Produto	Referência
Tet J-FW Tet J-RV	CGAAAACAGACTCGCCAATC TCCATAATGAGGTGGGGC	52°C	184	AMINOV et al., 2002
Tet Z-FW Tet Z-RV	CCTTCTCGACCAGGTCGG ACCCACAGCGTGTCCGTC	55°C	181	
Tet Y-FW TetY-RV	ATTTGTACCGGCAGAGCAAAC GGCGCTGCCGCCATTATGC	55°C	204	
Tet 30-FW Tet 30-RV	CATCTTGGTCGAGGTGACTGG ACGAGCACCCAGCCGAGC	58°C	210	
TetB/P-FW TetB/P-RV	AAAACTTATTATATTATAGTG TGGAGTATCAATAATATTCAC	42°C	169	AMINOV et al. 2001
TetM-FW TetM-RV	ACAGAAAGCTTATTATATAAC TGGCGTGTCTATGATGTTCAC	47°C	171	
TetO-FW TetO-RV	ACGGARAGTTTATTGTATACC TGGCGTATCTATAATGTTGAC	50°C	171	
OTR-FW OTR-RV	GGCATYCTGGCCCACGT CCCGGGGTGTCGTASAGG	57°C	212	
TetQ-FW TetQ-RV	AGAATCTGCTGTTTGCCAGTG CGGAGTGTCAATGATATTGCA	53°C	169	
TetS-FW TetS-RV	GAAAGCTTACTATACAGTAGC AGGAGTATCTACAATATTTAC	49°C	169	
TetT-FW TetT-RV	AAGGTTTATTATATAAAAGTG AGGTGTATCTATGATATTTAC	45°C	169	
TetW-FW TetW-RV	GAGAGCCTGCTATATGCCAGC GGGCGTATCCACAATGTTAAC	57°C	168	
TetX-FW TetX-RV	CAATAATTGGTGGTGGACCC TTCTTACCTTGGACATCCCG	55°C	468	NG et al. 2001
TetK-FW TetK-RV	TCGATAGGAACAGCAGTA CAGCAGATCCTACTCCTT	50°C	169	
TetL-FW TetL-RV	TCGTTAGCGTGCTGTCATTC GTATCCCACCAATGTAGCCG	50°C	267	

3.3. Caracterização do ambiente genético dos genes *tet*

Após identificação dos genes *tet,* o ambiente genético dos mesmos foi determinado por meio de PCR e os fragmentos obtidos foram sequenciados e posteriormente analisados no software *BioEdit* (Biological Sequence Alignment Editor).

3.3.1. Pesquisa de integrases de classes 1, 2, 3 e 4

Integrases de classes 1, 2, 3 e 4 foram pesquisadas (Quadro 4). Os fragmentos obtidos a partir da PCR foram purificados com o kit Illustra™ GFX™ PCR DNA

(GE – UK), seqüenciados usando o 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems-US) e comparados com a base de dados GenBank utilizando a ferramenta BLAST.

Quadro 4. Sequências de iniciadores para a detecção da presença de integrases de classes 1, 2, 3 e 4.

Iniciador	Sequência 5'-3'	Produto	Referência
IntI1 F **IntI1 R**	ACATGTGATGGCGACGCACGA ATTTCTGTCCTGGCTGGCGA	569pb	PAN et al., 2006
IntI2 F **IntI2 R**	GTAGCAAACGAGTGACGAAATG CACGGATATGCGACAAAAAGGT	789pb	PAN et al., 2006
IntI3 F **IntI3 R**	CATTTGTGTTGTGGACAAC GACAGATACGTGTTTGGCAA	717pb	XU et al., 2009
IntI4 F **IntI4 R**	CGGTATGTCTAATTGCTCTTG TGGCCACAAAGACTCAATCAC	696pb	GOLDSTEIN et al., 2001

As reações de PCR foram realizadas com as seguintes características para a pesquisa de IntI1 e IntI2: 95°C por 5 minutos, seguido de 25 ciclos com denaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento 60°C por 15 segundos, e extensão a 72°C por 1 minuto, e uma extensão final de 1 minuto e manutenção a 4°C até a retirada do termociclador. Para IntI3 e IntI4 a temperatura de anelamento utilizada foi de 55°C.

3.3.2. Mapeamento de integrons

Isolados positivos para presença de integrases foram submetidos à reação de PCR para detecção da associação de genes *tet* aos integrons. PCR utilizando iniciadores (Quadro 5) para amplificação do integron completo foi realizado. Os genes *tet* possuem aproximadamente um tamanho de 1200pb, portanto na análise dos géis de agarose para visualização de fragmentos obtidos através da reação de PCR para a região variável de integrons inteiros, isolados com fragmentos inferiores a este tamanho foram descartados, uma vez que o objetivo foi verificar a associação do gene com o elemento móvel. Os fragmentos maiores que 1200pb foram purificados

com o kit Illustra™ GFX™ PCR DNA (GE – UK) e utilizados como amostra em um PCR interno com iniciadores (Quadro 3) referentes aos genes *tet* detectados nos respectivos isolados.

Quadro 5. Iniciadores para amplificação de integrons completos de classes 1 e 2.

Iniciador	Sequência 5'-3'	Produto	Referência
intIca-F **intIca-R**	GATAAAAACAGCCTGACCTCTTC CCCACTTGACATCTCATCAATAC	Variável	PAN et al. 2006
intI2ca-F **intI2ca-R**	GATAAAAACAGCCTGACCTCTTC CCCACTTGACATCTCATCAATAC	Variável	PAN et al. 2006

As reações de PCR foram realizadas com as seguintes características: 95°C por 5 minutos, seguido de 25 ciclos com denaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento 60°C por 30 segundos, e extensão a 72°C por 7 minutos, e uma extensão final de 1 minuto e manutenção a 4°C até a retirada do termociclador.

3.3.3. Pesquisa e mapeamento de transposons

Após o sequenciamento e identificação dos genes *tet*, o ambiente genético dos mesmos foi verificado com relação à sua associação com transposons.

A partir do levantamento bibliográfico realizado e das sequências de transposons alinhadas e analisadas no software *BioEdit* (Biological Sequence Alignment Editor) foi possível desenvolver iniciadores para a triagem de transposases e para verificação da associação dos genes *tet* detectados com os elementos genéticos móveis pesquisados.

Primeiramente foi feita uma triagem para a presença dos elementos genéticos móveis Tn*1721*, Tn*10* e IS*26* associados aos genes *tet* detectados. O iniciadores utilizados foram desenhados neste estudo e estão descritos no Quadro 6.

Quadro 6. Sequências de iniciadores para triagem dos elementos genéticos móveis, Tn*1721*, Tn*10* e IS*26.*

Iniciador	Sequência 5'-3'	Alvo	Produto
P1 tn1721 Fw **P2 tn1721 Rv**	GCAGTTCCGCGACTTCGAC GCCATCTTGGTCAGCCCGAGG	transposase	420pb
Tn10 Fw **Tn10 Rv**	GAGCTTCAGTCGCACTACACG GAACGCCCGCAAGCCAACATG	transposase	670pb
IS26 Fw **IS26 Rv**	CAGCGTGACATCATTCTGTGGGC TCTGCTTACCAGGCGCATTTCGC	transposase	600pb

Para a triagem dos elementos do Quadro 6, as reações de PCR seguiram-se da seguinte forma para todas as transposases: 95°C por 5 minutos, seguido de 25 ciclos com denaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento 60°C por 15 segundos, e extensão a 72°C por 1 minuto, e uma extensão final de 1 minuto e manutenção a 4°C até a retirada do termociclador.

Para determinar a associação do gene *tet*(A) ao elemento móvel Tn*1721* foram desenvolvidos iniciadores utilizando o esquema desenvolvido por SCHNABEL e JONES (1999) (Figura 9) juntamente com sequências do elemento Tn*1721* disponíveis no banco de dados GenBank e alinhadas no software *BioEdit* para desenho dos iniciadores (Quadro 7).

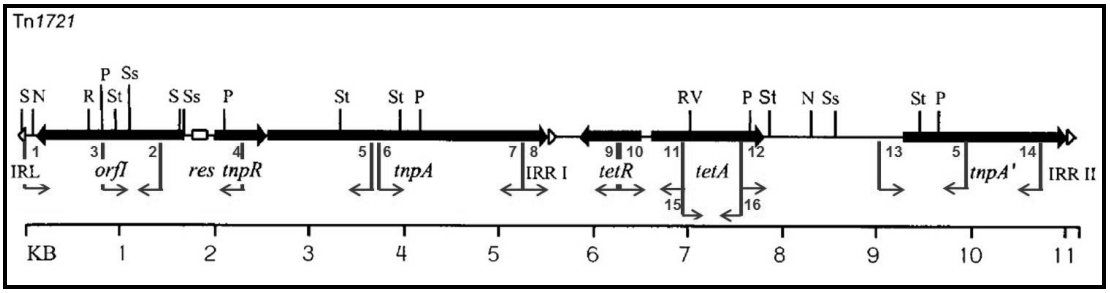

Figura 9. Esquema ilustrando a associação de *tet*(A) e Tn*1721* elaborado por SCHNABEL e JONES (1999) modificado neste estudo pela adição de flechas que indicam a localização dos iniciadores. Os números acompanhando as flechas indicam os números dos iniciadores descritos no Quadro 7.

Quadro 7. Sequências de iniciadores para mapeamento do elemento genético Tn*1721* associado aos genes *tet* detectados.

n°	Iniciador	Sequência 5'-3'	Produto
1	tn1721 IRLFw	GGGGGAACCGCAGAATTCGGA	1376pb
2	tn1721 IRLRv	CTCAATTGAGAAGCGGGAAGGC	
3	ORF1 tnpR Fw	CATGCCGGCAGCCATTGCGCTT	1474pb
4	ORF1 tnpR Rv	GGATCAGCGACAGGTCGGAGTC	
3	ORF1 tnpR Fw	CATGCCGGCAGCCATTGCGCTT	2300pb
5	P2 Rv	GCCATCTTGGTCAGCCCGAGG	
6	Px Fw	CGACCGTGATCGATGAGCTGG	2044pb
7	P3 Rv	TCCAGTCTGCGGCTCTGCCG	
8	P3 Fw	CGGCAGAGCCGCAGACTGGA	690pb
9	tetR Fw m-end	CGGCCGACGCGCAGCTTCGC	
10	tetR Fw-opos	CAGAGGAAGCGAAGCTGCGCG	562pb
11	tetAR1	CGAGTGAACCAGATCGCGC	
12	P4 Fw	ACTTGCTCTGCCTGCCGGCG	2175pb
5	P2 Rv	TCCAGTCTGCGGCTCTGCCG	
13	tnpA2Fw	GCCGAGGATGAAGATGCGC	2510pb
14	A-tnpA2 Rv	GGGAGCCCGCAGAATTCGG	
15	tetAFw	TCCGCGCGTTCAATCGGACC	1209bp
16	tetARv	CCCGCGACGCAGCGCCGGCA	

Para o mapeamento do elemento Tn*1721* as reações de PCR seguiram-se da seguinte forma: 95°C por 5 minutos, seguido de 25 ciclos com denaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento 60°C por 30 segundos, e extensão a 72°C por 1 minuto – Combinações de iniciadores 8,9 e 10,11; 1 minuto e 30 segundos – Combinações de iniciadores 1,2 – 3,4 e 15,16; e 2 minutos e 30 segundos – Combinações de iniciadores – 3,5 – 6,7 – 12,5 e 13,14, e uma extensão final de 5 minutos e manutenção a 4°C até a retirada do termociclador.

Com base também no esquema descrito por SCHNABEL e JONES (1999) (Figura 10) os iniciadores foram desenhados para mapeamento do elemento móvel Tn*10* e detecção de sua associação ao gene *tet*(B). A principio os iniciadores foram desenhados com base na Figura 7-A, no entanto conforme sequenciamento de alguns fragmentos observou-se que a estrutura do elemento genéticos nos isolados

estudados era menor do que o descrito na literatura e portanto fez-se necessário o desenho de novos iniciadores e a elaboração de um novo esquema para o mapeamento de Tn*10* nos isolados em estudo (Figura 7-B) (Quadro 8).

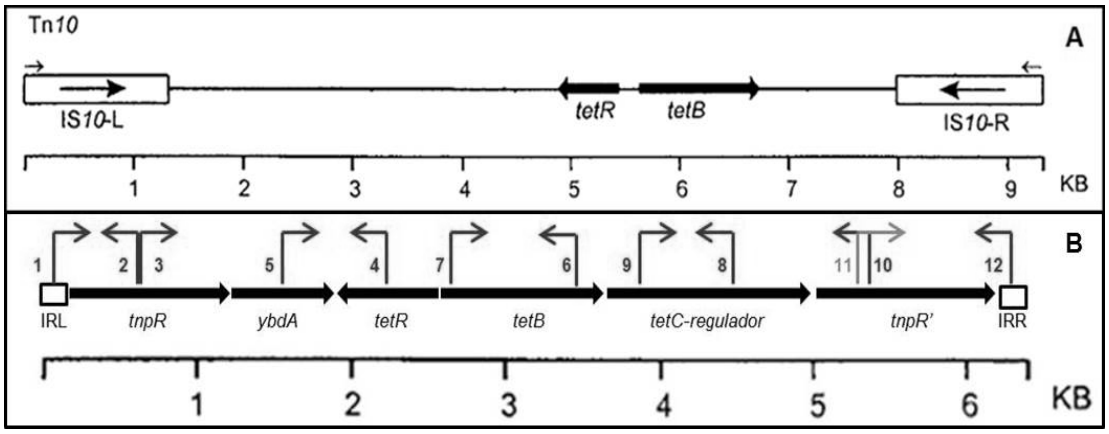

Figura 10. A. Esquema da estrutura móvel que mostra a associação de *tet*(B) a IS*10* descrita por SCHNABEL e JONES (1999). B. As flechas representam os iniciadores desenhados e os números acima das flechas indicam os iniciadores citados no Quadro 8.

Quadro 8. Sequências de iniciadores para mapeamento da transposase IS*10* relacionada ao elemento móvel Tn*10* associado aos genes *tet*(B) observados.

n°	Iniciador	Sequência 5'-3'	Produto
1	**IS10-IRL**	CTGATGAATCCCCTAATG	1104pb
2	**IS10 Rv-transp**	GAACGCCCGCAAGCCAACATG	
3	**Tn10 end Fw**	GGGACAAGCACTTCCAGGC	1060pb
4	**tetR B Rv**	CTAAGTCATCGCGATGGAGC	
5	**ybdA Fw-IS10**	GGGGATCTCCTTAAACCATGGCG	666pb
4	**tetR B Rv**	CTAAGTCATCGCGATGGAGC	
5	**ybdA Fw-IS10**	GGGGATCTCCTTAAACCATGGCG	2207pb
6	**tetBcompR**	TCCTGTTTACTCCCCTGAGC	
7	**tetBcompF**	GATGCCATGGGGATTGGCCTT	2422pb
8	**UnkregRv**	CGTGGCTGCAACCCTACTAGC	
9	**UnkregFw**	GGCACCTTTGGTCACCAACGC	1518pb
10	**IS10 Fw-transp**	GAGCTTCAGTCGCACTACACG	
11	**IS10-int Fw**	CGGACTAGGCCTACGCCATAG	1035pb
12	**IS10-IRR**	CTGATGAATCCCCTAATG	
7	**tetBcompF**	GATGCCATGGGGATTGGCCTT	2510pb
6	**tetBcompR**	TCCTGTTTACTCCCCTGAGC	

Para o mapeamento de Tn*10* as reações de PCR seguiram-se da seguinte forma: 95°C por 5 minutos, seguido de 25 ciclos com denaturação a 95°C por 30

segundos, anelamento 58°C por 30 segundos, e extensão a 72°C por 1 minuto – Combinações de iniciadores 3,4 – 5,4 e 11,12; 1 minuto e 30 segundos – Combinações de iniciadores 1,2 – 9,10; e 2 minutos e 30 segundos – Combinações de iniciadores – 5,6 – 7,8 e 7,6, e uma extensão final de 5 minutos e manutenção a 4°C até a retirada do termociclador.

Baseando-se nos esquemas de KIM et al. (2008); SCHNABEL e JONES (1999) e utilizando as combinações de iniciadores desenhados neste estudo e apresentados na Figura 11 e Quadro 9, os isolados foram pesquisados para verificar a associação de seus respectivos genes mapeando o elemento IS*26*.

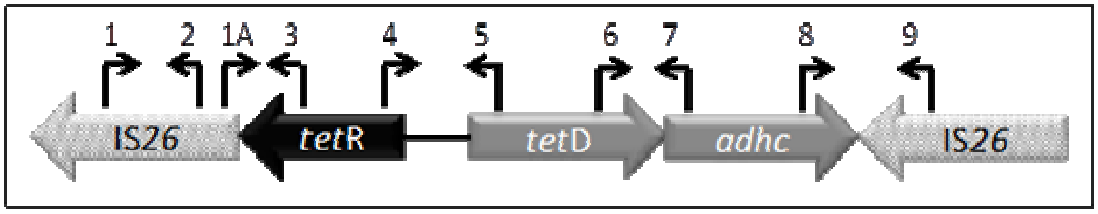

Figura 11. Esquema da estrutura móvel mapeada neste estudo associando *tet*(D) a IS*26*. As flechas representam as regiões onde os iniciadores foram desenhados e os números indicam os iniciadores no Quadro 9.

Quadro 9. Iniciadores para mapeamento da IS*26* e sua associação com os genes *tet*(D) detectados.

nº	Iniciador	Sequência 5'-3'	Produto	Referência
1	IS*26* Fw	CAGCGTGACATCATTCTGTGGGC	662pb	DROPA, 2012
2	IS*26* Rv	TCTGCTTACCAGGCGCATTTCGC		
1A	IS*26*F	TGCCGGCCTTTGAATGGGTTC	370pb	Este estudo
3	tetR2compl Rv	GCACCTCGGCACCCGCCCTG		
4	tetR2complFw	CAGGGCGGGTGCCGAGGTGC	420pb	Este estudo
5	tetDbeginRv	ACCAGCGCGATGACAGCGGGT		
6	tetDendFw	GCACCGGTGGCGGCCACCT	140pb	Este estudo
7	adhCRv	GCATCTTCCACCATTCCCGGC		
8	adhCendFw	GCCGGGAATGGTGGAAGATGC	560pb	Este estudo
9	IS26-beginRv	TCCCCTGGGCGAAATGCGCC		

Para o mapeamento da estrutura associando IS*26* e *tet*(D) as reações de PCR seguiram-se da seguinte forma: 95°C por 5 minutos, seguido de 25 ciclos com

denaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos, e extensão a 72°C por 1 minuto para todas as combinações de iniciadores; exceto a combinação de iniciadores 6-7 na qual foi utilizada uma extensão de 30 segundos. Todas as reações foram seguidas de uma extensão final de 5 minutos e manutenção a 4°C até a retirada do termociclador.

Baseando-se no esquema de SCHNABEL e JONES (1999) os genes *tet*(C) foram mapeados para determinar sua associação a IS*26*, de acordo com os iniciadores desenhados neste estudo e descritos no Quadro 10 e segundo o esquema apresentado na Figura 12.

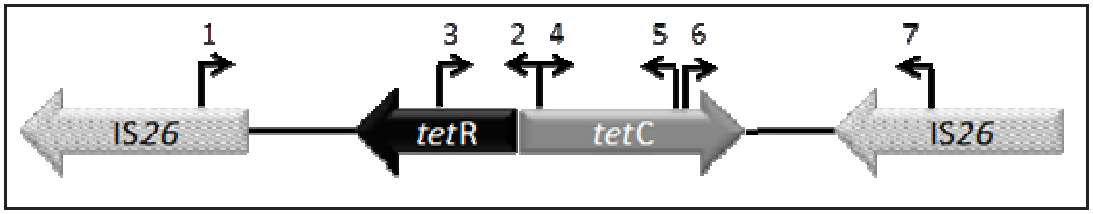

Figura 12. Esquema da estrutura móvel mapeada para os genes *tet*(C) associados a IS*26*. As flechas representam as regiões onde os iniciadores foram desenhados e os números indicam os iniciadores no Quadro 10.

Quadro 10. Iniciadores para mapeamento de IS*26* e sua associação com os genes *tet*(C) observados.

nº	Iniciador	Sequência 5'-3'	Produto
1	**IS26endFw**	TGCCGGCCTTTGAATGGGTTC	1500pb
2	**tetCbgRv**	CATCCAGGGTGACGGTGCCG	
3	**tetRCFw**	CCGCCGATGATGAGAGCCAGGC	719pb
2	**tetCbgRv**	CATCCAGGGTGACGGTGCCG	
4	**tetCFw**	CGGCACCGTCACCCTGGATG	1132pb
5	**tetCRv**	GAGGTGGCCCGGCTCCATGC	
6	**tetCendFw**	GTAGGCGCCGCCCTATACC	1186pb
7	**IS26bgRv**	TCCCCTGGGCGAAATGCGCC	

Para o mapeamento da estrutura contendo IS*26* e *tet*(C) as reações de PCR seguiram-se da seguinte forma: 95°C por 5 minutos, seguido de 25 ciclos com denaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos, e

extensão a 72°C por 1 minuto para todas as combinações de iniciadores, uma extensão final de 5 minutos e manutenção a 4°C até a retirada do termociclador.

Os genes *tet*(E) foram testados com iniciadores para transposons relacionados aos genes *tet*(A), (B), (C) e (D) de acordo com os Quadros 9, 10 e 11 de iniciadores e também foram testados para sua associação ao elemento ISAS5 com o gênero *Aeromonas* (Quadro 11). Os iniciadores foram desenhados após alinhamento e análise da sequência de *Aeromonas salmonicida* de número de acesso CP000645.1 do GenBank.

Quadro 11. Iniciadores para mapeamento do ambiente genético de *tet*(E).

Iniciador	Sequência 5'-3'	Produto
tetERFw **tetEbgRv**	GCCCGAAATGGAAGGCCG GTGCCATCATCACAGTGCGGT	643pb
tetEcompF **tetEcompR**	ACCGCACTGTGATGATGGCAC GACTGCCCTGCCGGGATAG	1167pb
ISAS5(1)Fw **ISAS5(1) Rv**	GCGACTGCGGCTGGAGGCTC GTTCTCGTGCTCTTGCGGC	1470pb
ISAS5(1)endFw **ISAS5(2)bgRv**	GTCGGTGCTGGCCAGTGGCC GCTTACGCTGCTCCCGGCTC	266pb
ISAS5(2) Fw **tetEbgRv**	CCGGCATGGCGGATGCCG GTGCCATCATCACAGTGCGGT	2288pb

Para determinação da associação do gene *tet*(E) aos elementos móveis propostos neste estudo as reações de PCR seguiram-se da seguinte forma: 95°C por 5 minutos, seguido de 25 ciclos com denaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos, e extensão a 72°C por 1 minuto para todas as combinações de iniciadores, exceto a combinação ISAS5(2)Fw e tetEbgRv, na qual foi utilizada uma extensão de 2 minutos. Para todas as combinações foi realizada uma extensão final de 5 minutos e manutenção a 4°C até a retirada do termociclador.

Na visualização dos todos os produtos de PCR amplificados o marcador de peso molecular 100bp Plus MassRuler™ DNA Ladder (Fermentas) foi utilizado e foi realizada uma eletroforese a 6V/cm em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídio e visualizado em luz ultravioleta (Epi Chemi II Darkroom, UVP Bioimaging Systems).

3.4. Tipagem plasmidial

Os plasmídios foram extraídos através do kit Wizard Plus SV Minipreps (Promega-USA) segundo as orientações do fabricante. A partir do DNA plasmidial, os grupos de incompatibilidade (Inc) foram determinados por PCR de acordo com CARATTOLI et al. (2005) (Quadro 12). Os fragmentos obtidos a partir da PCR foram purificados com o kit Illustra™ GFX™ PCR DNA (GE – UK), sequenciados usando o 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems-US) e comparados com a base de dados GenBank utilizando a ferramenta BLAST.

Quadro 12. Iniciadores para a tipagem plasmidial em grupos Inc de acordo com o protocolo desenvolvido CARATTOLI et al. (2005).

Iniciador	Sequência 5'-3'	Produto (pb)
H11 F	GGAGCGATGGATTACTTCAGTAC	471
H11 R	TGCCGTTTCACCTCGTGAGTA	
H12 F	TTTCTCCTGAGTCACCTGTTAACAC	644
H12 R	GGCTCACTACCGTTGTCATCCT	
I1 F	CGAAAGCCGGACGGCAGAA	139
I1 R	TCGTCGTTCCGCCAAGTTCGT	
X F	AACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGAT	376
X R	TGAGAGTCAATTTTTATCTCATGTTTTAGC	
L/M F	GGATGAAAACTATCAGCATCTGAAG	785
L/M R	CTGCAGGGGCGATTCTTTAGG	
N F	GTCTAACGAGCTTACCGAAG	559
N R	GTTTCAACTCTGCCAAGTTC	
FIA F	CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG	462
FIA R	GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG	
FIB F	GGAGTTCTGACACACGATTTTCTG	702
FIB R	CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT	

Quadro 12 (continuação). Iniciadores para a tipagem plasmidial em grupos Inc de acordo com o protocolo desenvolvido CARATTOLI et al. (2005).

Iniciador	Sequência 5'-3'	Produto (pb)
W F **W R**	CCTAAGAACAACAAAGCCCCCG GGTGCGCGGCATAGAACCGT	242
Y F **Y R**	AATTCAAACAACACTGTGCAGCCTG GCGAGAATGGACGATTACAAAACTTT	765
P F **P R**	CTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAA TCACGCGCCAGGGCGCAGCC	534
FIC F **FIC R**	GTGAACTGGCAGATGAGGAAGG TTCTCCTCGTCGCCAAACTAGAT	262
A/C F **A/C R**	GAGAACCAAAGACAAAGACCTGGA ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTT	465
T F **T R**	TTGGCCTGTTTGTGCCTAAACCAT CGTTGATTCACCTTAGCTTTGGAC	750
FII_s F **FII_s R**	CTGTCGTAAGCTGATGGC CTCTGCCACAAACTTCAGC	270
F_{repB} F **F_{repB} R**	TGATCGTTTAAGGAATTTTG GAAGATCAGTCACACCATCC	270
K/B F **K R**	GCGGTCCGGAAAGCCAGAAAAC TCTTTCACGAGCCCGCCAAA	160
K/B F **B/O R**	GCGGTCCGGAAAGCCAGAAAAC TCTGCGTTCCGCCAAGTTCGA	159

3.5. Tipagem molecular

3.5.1. Extração do DNA genômico

Todos os isolados resistentes à tetraciclina foram submetidos à extração de DNA genômico, por meio do protocolo CTAB (Brometo de Cetil-Trimetil-Amônio) de acordo com o preconizado por MURRAY e THOMPSON (1980), e descrito por AUSUBEL et al. (1995). Esta extração permite a obtenção de um DNA genômico mais purificado e concentrado, necessário para a realização da tipagem molecular pela PCR. Os isolados (colônias reisoladas e armazenadas em Soft Ágar Lúria 0,5%) foram semeados em 10mL de Caldo Lúria 1% e incubados a 35°C por 18-24h. Após a incubação os tubos foram centrifugados a 5000rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado, o sedimento foi ressupenso com 1mL de mQ® estéril e transferido

para microtubo tipo eppendorf. Os microtubos foram centrifugados a 12000rpm por 3 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso com 567µL de TEI (Tris-HCl 10mM, pH 7,5; EDTA 1mM, pH 8,0) estéril, 30µL de SDS 10% e 3µL de Proteinase K, em seguida levados ao banho-maria 37°C por 1h. Após esse período, foram adicionados aos microtubos 80µL de CTAB e 100µL de NaCl 5M, que foram levados ao banho-maria 65°C por 20 minutos. Em seguida, adicionou-se aproximadamente 500µL de clorofórmio e álcool-isoamílico na proporção 24:1, agitou-se fortemente e centrifugou-se a 10000rpm por 25 minutos a 24°C, em seguida a parte superior foi transferida, separada pelo CTAB, para um novo microtubo, adicionou-se1µL de RNAse e os microtubos foram colocados no banho-maria 37°C por 1h. Após esse período, aproximadamente 500µL de clorofórmio puro foram adicionados, os microtubos foram agitados fortemente e centrifugados a 10000rpm por 15 minutos a 24°C, novamente a parte superior foi transferida para um novo tubo onde 1mL de isopropanol gelado foi adicionado, então os tubos foram centrifugados a 10000rpm por 5 minutos a 24°C. Após o sobrenadante ser descartado, 1mL de etanol 70% foi adicionado e centrifugou-se a 10000rpm por 5 minutos a 24°C, descartou-se o sobrenadante e os tubos foram colocados para secar a vácuo. O DNA foi ressuspenso com 50µL de TEII (Tris-HCl 10mM, pH 7,5; EDTA 0,1mM, pH 8,0).

3.5.2. ERIC-PCR

Com o intuito de evitar a seleção de isolados clonais para os experimentos de linearização de plasmídios e transformação, os perfis de similaridade genética foram verificados, e para isso todos os isolados foram submetidos à triagem por ERIC-PCR

(*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* – PCR). O método foi realizado segundo RIVERA et al. (1995).

3.5.3. PFGE para DNA cromossômico

A partir das análises de géis de agarose obtidos através da metodologia ERIC-PCR na qual as similaridades e diferenças genéticas foram obervadas, isolados com perfis de similaridade genética iguais ou com diferença de um único fragmento foram submetidos à técnica de eletroforese em campo pulsado, na qual os isolados selecionados foram digeridos com enzima *Xba* I (10U) e analisados.

O procedimento utilizado para o preparo dos *plugs* foi a metodologia descrita pelo *Center of Diseases Control* (CDC) 2004, modificada por DROPA et al. (2009) e a interpretação do polimorfismo de fragmentos foi realizada segundo TENOVER et al. (1997). Os isolados foram classificados em clones (isolados com perfis genéticos idênticos) ou não-clones (isolados com perfis genéticos distintos), não sendo analisadas as similaridades genéticas entre os isolados por meio de softwares que utilizam os perfis de fragmentos de DNA para relacionar as cepas.

3.6. Critérios para seleção de cepas para metodologias posteriores

As cepas foram selecionadas de acordo com os seguintes critérios: (1) cepas apresentando os maiores valores de Concentração Inibitória Mínima, (2) cepas apresentando variedade de genes *tet* entre si, na tentativa de incluir na seleção cepas da mesma espécie carreando diferentes genes *tet*, (3) cepas com perfis genéticos distintos e (4) a presença de integrons e/ou transposons associados aos genes *tet* detectados nas cepas.

3.7. Determinação da localização dos genes

3.7.1. Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE) – Preparo dos Plugs

O procedimento utilizado para o preparo dos *plugs* foi a metodologia descrita pelo *Center of Diseases Control* (CDC) 2004, modificada por DROPA et al. (2009).

3.7.2. Linearização e determinação do tamanho dos plasmídios

A partir dos *plugs* preparados a enzima S1 nuclease foi usada para a conversão de plasmídios superenovelados (*supercoiled*) em plasmídios lineares (BARTÓN et al., 1995; MARTÍNEZ et al., 2007; MSHANA et al., 2009), seguida da eletroforese em campo pulsado (PFGE) (Chef Mapper (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). O gel de PFGE foi corado em brometo de etídio 1μg/mL, durante 1h, e visualizado em luz ultravioleta (Epi Chemi II Darkroom, UVP Bioimaging Systems). O tamanho dos plasmídios foi determinado pela comparação com as bandas de um marcador de alto peso molecular (Lambda Ladder PFG Marker e MidRange PFG Marker I, New England Biolabs, USA).

3.7.3. Transformação de plasmídios

Na tentativa de determinar a localização dos genes *tet*, plasmídios das cepas selecionadas foram transformados em células eletrocompetentes, as quais após transferência dos plasmídios foram submetidas a reações de PCR para confirmação molecular da presença do gene *tet* no plasmídio transferido.

3.7.3.1. Preparação de células eletrocompetentes

A partir de uma cultura pura congelada em glicerol 70% em freezer -80°C a célula *Escherichia coli* DH10B™ foi reisolada em Ágar MacConkey e incubada a

37°C por 18 horas. Após o período de incubação, uma colônia selecionada da placa de Ágar MacConkey foi semeada em 5mL de Caldo Lúria e incubada a 37°C por 18 horas. Após este período 250µL do caldo crescido foi semeado 6 tubos de Falcon de 50mL contendo cada um 25mL de Caldo Lúria. Os tubos foram encubados a 37°C sob agitação de 150rpm por 3 a 4 horas.

Todas as etapas deste protocolo foram realizadas em cabine de segurança biológica. Após incubação os tubos foram resfriados em gelo por 20 minutos e em seguida centrifugados a 5500rpm a 4°C por 15 minutos. Após centrifugação o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspenso cuidadosamente com 50mL de água destilada estéril previamente gelada.

Novamente os tubos foram centrifugados a 5500rpm a 4°C por 15 minutos, em seguida o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspenso cuidadosamente com 25mL de água destilada estéril previamente gelada. Este passo é repetido mais uma vez.

Em seguida os tubos foram novamente centrifugados a 5500rpm a 4°C por 15 minutos, seguido da retirada do sobrenadante e o pellet foi ressuspenso cuidadosamente com 10mL de água destilada estéril previamente gelada. Os tubos foram novamente centrifugados a 5500rpm a 4°C por 15 minutos, em seguida o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspensso cuidadosamente com 250µL de glicerol 10% estéril previamente gelada. De 40 a 50µL das células ressuspensas em glicerol foram distribuídos em tubos de 1,5mL tipo eppendorf® previamente gelados e imediatamente armazenados em freezer -80°C.

Eletroporação

As células eletrocompetentes foram descongeladas e mantidas em gelo, juntamente com a extração de plasmídios das cepas selecionadas e as cubetas (Gene Pulser/Micropulser Cuvettes - BioRad). 3μL da extração de plasmídios foram adicionados ao tubo contendo a célula eletrocompetente, em seguida todo o conteúdo do tubo foi transferido para a cubeta e eletroporada a 1800V (Eletroporator 2510 – Eppendorf). Em seguida todo o conteúdo da cubeta foi transferido para um tubo de Falcon de 15mL contendo 500μL de meio S.O.C (Caldo Lúria com adição de 2mM de Magnésio e 2mM de Glicose), o qual foi incubado sob agitação a 37°C por 1 hora e 30 minutos. Após incubação todo o conteúdo do tubo de Falcon foi transferido para um tubo contendo 5mL de Caldo Lúria com concentração de 8μg/mL de tetraciclina. O caldo foi incubado sob agitação a 37°C por 18 horas.

As cepas transformadas que apresentaram crescimento sob a presença de tetraciclina foram submetidas a extração de plasmídio e posteriormente PCR dos respectivos genes *tet* e grupos de incompatibilidade de plasmídios.

4. ANÁLISE DOS DADOS

Para análise, os resultados foram observados de acordo com a origem da amostra e as espécies estudadas, bem como de acordo com os antibióticos testados.

Com relação à origem das amostras, as mesmas não foram analisadas separadamente de acordo com a procedência específica cada de isolado. Portanto, os isolados provenientes de ambiente aquático e/ou de coleta em pontos de captação de água e recreação no Estado de São Paulo, foram agrupados em isolados de água

superficial; isolados provenientes de amostras de esgoto bruto e tratado, e lodo de esgoto, foram analisados em conjunto sob a referência de esgoto e lodo, e os isolados de infecções relacionadas à assistência à saúde, infecções comunitárias ou colonizações foram agrupados como isolados de um hospital universitário.

Os resultados foram dispostos em tabelas e gráficos, nos quais foram feitas comparações das porcentagens obtidas pela análise dos dados.

5. RESULTADOS

5.1. Resistência fenotípica a tetraciclinas

Um total de 572 isolados, incluindo *Aeromonas* spp., *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* foram analisados para detecção do perfil de sensibilidade para tetraciclina por disco-difusão, dos quais 106 (18,5%) apresentaram-se resistentes ou intermediárias (não-sensíveis). A partir do total de 106 isolados, fitas de Etest® foram utilizadas para detectar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) para tetraciclina. Como observado na Tabela 1, os testes de Concentração Inibitória Mínima confirmaram o perfil de sensibilidade dos isolados não-sensíveis à tetraciclina. Não houve discrepâncias entre os resultados obtidos a partir das duas técnicas para todos os antibióticos testados.

Testes de disco-difusão e para detecção da CIM para doxiciclina, minociclina e tigeciclina, foram realizados nos isolados não-sensíveis à tetraciclina (Tabela 2).

Tabela 1. Determinação dos perfis de sensibilidade à tetraciclina obtidos pela técnica de Disco-Difusão (DD), seguida da verificação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) nos isolados não-sensíveis à tetraciclina.

DD	*Aeromonas*[1] % (n=207)	*Aeromonas*[1a] % (n=30)	*K. pneumoniae*[1] % (n=23)	*K. pneumoniae*[2] % (n=95)	*E. coli*[1] % (n=95)	*E. coli*[2] % (n=122)
R	1 (2)	0	17,4 (4)	23 (22)	27,3 (26)	21,3 (26)
I	11,6 (24)	3,3 (1)	0	0	1 (1)	0
S	87,4 (181)	96,7 (29)	82,6 (19)	76,8 (73)	71,5 (68)	78,7 (96)
Total	26	1	4	22	27	26
CIM	*Aeromonas*[1] % (n=26)	*Aeromonas*[1a] % (n=1)	*K. pneumoniae*[1] % (n=4)	*K. pneumoniae*[2] % (n=22)	*E. coli*[1] % (n=27)	*E. coli*[2] % (n=26)
R	7,7 (2)	0	100 (4)	100 (22)	100 (26)	100 (26)
I	92,3 (24)	100 (1)	0	0	3,7 (1)	0
S	0	0	0	0	0	0

[1]isolados de esgoto e lodo, [1a]isolados de água superficial, [2]isolados clínicos. DD - Disco-difusão, CIM - Concentração Inibitória Mínima. R – resistente, I – intermediário, S – sensível.

Todos os isolados de *Aeromonas* isoladas de água superficial foram sensíveis para doxiciclina, minociclina e tigeciclina, e portanto não foram apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Testes de disco-difusão e Concentração Inibitória Mínima (CIM) para doxiciclina, minociclina e tigeciclina das cepas não-sensíveis à tetraciclina.

	Aeromonas[1] % (n=26)	*K. pneumoniae*[1] % (n=4)	*K. pneumoniae*[2] % (n=22)	*E. coli*[1] % (n=27)	*E. coli*[2] % (n=26)
			DD/CIM % (n)* - Doxiciclina		
R	0	100 (4)	100 (22)	85,1 (23)	84,6 (22)
I	7,7 (2)	0	0	11 (3)	11,5 (3)
S	92,3 (24)	0	0	3,7 (1)	3,9 (1)
			DD/CIM % (n)* - Minociclina		
R	0	0	95,5 (21)	14,3 (4)	15,4 (4)
I	0	50 (2)	4,5 (1)	22 (6)	30,8 (8)
S	100 (26)	50 (2)	0	63 (17)	53,8 (14)
			DD/CIM % (n)* - Tigeciclina		
R	0	0	0	0	0
I	0	0	0	0	0
S	100 (26)	100 (4)	100 (22)	100 (27)	100 (26)

* A indicação de apenas um valor representa a mesma porcentagem e número de isolados para ambas as técnicas. [1]isolados de esgoto e lodo, [1a]isolados de água superficial, [2]isolados clínicos. DD - Disco-difusão, CIM - Concentração Inibitória Mínima. R – resistente, I – intermediário, S – sensível.

Na Tabela 3 estão dispostas as concentrações de antibiótico capazes de inibir 50% (CIM_{50}) e 90% (CIM_{90}) das cepas estudadas. O *range* também está presente na Tabela 3, indicando a menor e maior concentração de inibição detectadas nas cepas em estudo.

Tabela 3. Disposição dos valores da CIM_{50}, CIM_{90} e do *range* dos antibióticos tetraciclina (TET), doxiciclina (DOX), minociclina (MIN) e tigeciclina (TGC) com relação às cepas clínicas e ambientais de *Aeromonas* spp., *K. pneumoniae* e *E. coli.*

Microrganismo	**TET (μg/mL)**			**DOX (μg/mL)**		
	CIM_{50}	CIM_{90}	*Range*	CIM_{50}	CIM_{90}	*Range*
***Aeromonas* spp.**[1a]	8	12	6 - 128	3	4	2 - 12
***K. pneumoniae*[1]**	64	256	24 - 256	32	64	16 - 64
***K. pneumoniae*[2]**	256	256	64 - 256	64	96	16 - 256
***E. coli*[1]**	256	256	8 - 256	48	96	3 - 256
***E. coli*[2]**	128	256	16 - 256	48	96	2 - 256

Microrganismo	**MIN** (μg/mL)			**TGC** (μg/mL)		
	CIM_{50}	CIM_{90}	*Range*	CIM_{50}	CIM_{90}	*Range*
***Aeromonas* spp.**[1a]	1	2	0,25 - 4	0,25	0,75	0,064 - 1
***K. pneumoniae*[1]**	6	8	1,5 - 8	0,38	1,5	0,19 - 1,5
***K. pneumoniae*[2]**	24	32	6 - 256	0,5	1	0,19 - 2
***E. coli*[1]**	4	18	0,38 - 1,5	0,094	0,38	0,032 - 1,5
***E. coli*[2]**	4	16	0,19 - 32	0,125	0,19	0,047 - 0,5

[1]isolados de esgoto e lodo, [1a]isolados de água superficial, [2]isolados clínicos.

Com base no perfil de sensibilidade dos 572 isolados avaliados neste estudo e de acordo com os testes de sensibilidade à tetraciclina; foram observados 106 (18,5%) isolados não-sensíveis. Assumindo que os resultados dos perfis de sensibilidade à tetraciclina possam ser extrapolados para os demais antibióticos testados neste estudo, a partir do total de 572 isolados, foi observado que 77 (13,5%) e 44 (8%) apresentaram-se não-sensíveis à doxiciclina e minociclina, respectivamente. E todos os isolados foram sensíveis à tigeciclina (Figura 13).

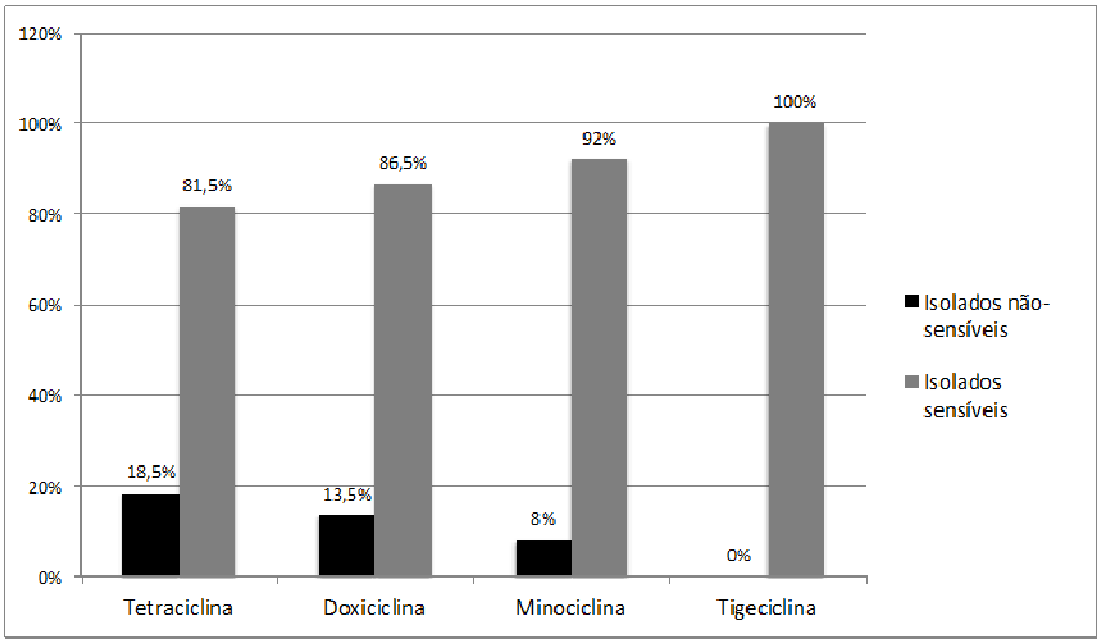

Figura 13. Distribuição de isolados sensíveis e não-sensíveis à tetraciclina, doxiciclina, minociclina e tigeciclina, calculados a partir do total de 572 isolados testados neste estudo.

Com relação à origem das amostras, 355 isolados foram obtidos de amostras ambientais, incluindo água superficial, e esgoto e lodo das quais 58 (16,3%) foram resistentes ou intermediárias (não-sensíveis) à tetraciclina. Dos isolados clínicos que totalizaram 217, 48 (22,1%) isolados foram resistentes à tetraciclina, como está observado na Figura 14.

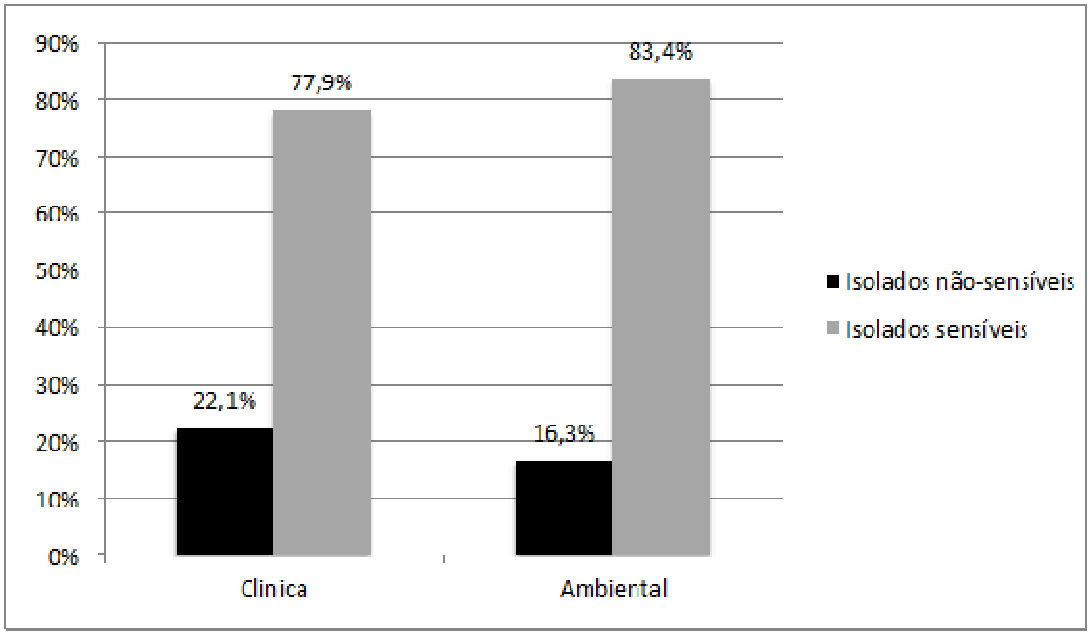

Figura 14. Porcentagem dos isolados sensíveis e não-sensíveis à tetraciclina de acordo com a origem clínica ou ambiental da amostra.

A Figura 15 mostra os isolados não-sensíveis à tetraciclina de acordo com o tipo de amostra e a espécie. Para *Aeromonas* spp., do total de 30 isolados de água superficial e dos 207 isolados de esgoto e lodo, 3,3% (1) e 26 (12,5%) apresentaram-se não-sensíveis, respectivamente. Os únicos 5 isolados de *E. coli* de um hospital universitário foram resistentes à tetraciclina. Dos 95 isolados de esgoto e lodo, e de 117 isolados de fezes diarreicas, 27 (28,4%) e 21 (17,9%) cepas foram não-sensíveis à tetraciclina, respectivamente. De 23 isolados de *K. pneumoniae* de amostras de esgoto e lodo apenas 4 (17,4%) foram resistentes à tetraciclina, enquanto que a partir de 95 isolados de um hospital universitário 22 (23,2%) apresentaram-se resistentes.

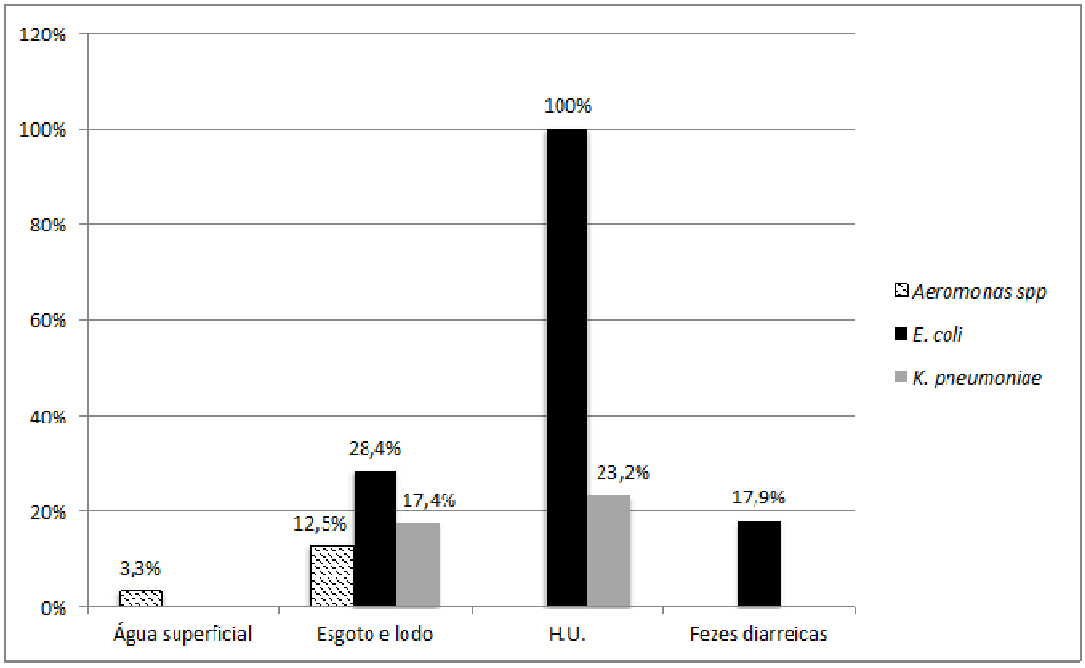

Figura 15. Isolados não-sensíveis à tetraciclina de acordo com o tipo de amostra: água superficial, esgoto e lodo, hospital universitário e fezes diarreicas e as espécies estudadas: *Aeromonas* spp., *Escherichia coli* e *K. pneumoniae.*

A Figura 16 mostra o perfil de sensibilidade dos isolados de acordo com o tipo de amostra, as espécies estudadas e os testes de sensibilidade realizados com doxiciclina e minociclina. Os resultados para tigeciclina não constam no gráfico da Figura 16 pois todos os isolados avaliados neste estudo foram sensíveis à este antibiótico.

Todos os isolados de *Aeromonas* spp. provenientes de água superficial foram sensíveis à doxiciclina e minociclina e a partir dos 26 isolados de esgoto e lodo de *Aeromonas* spp. apenas 2 (7,7%) apresentaram-se não-sensíveis à doxiciclina e nenhum à minociclina (Figura 16).

Dos 27 isolados de *E. coli* provenientes de esgoto e lodo, 26 (96,3%) e 22 (37%) foram não-sensíveis à doxiciclina e minociclina, respectivamente. Todos os 5 isolados provenientes de amostras hospitalares foram resistentes à doxiciclina e

minociclina, enquanto 20 (95,2%) e 7 (33,3%) isolados de *E. coli* de fezes diarreicas foram não-sensíveis à doxiciclina e minociclina, respectivamente (Figura 16).

A partir dos 4 isolados de *K. pneumoniae* provenientes de esgoto e lodo, 4 (100%) e 2 (50%) foram não-sensíveis à doxiciclina e minociclina, respectivamente. Enquanto que dos 22 isolados de amostras hospitalares 100% foram não-sensíveis à doxiciclina e minociclina (Figura 16).

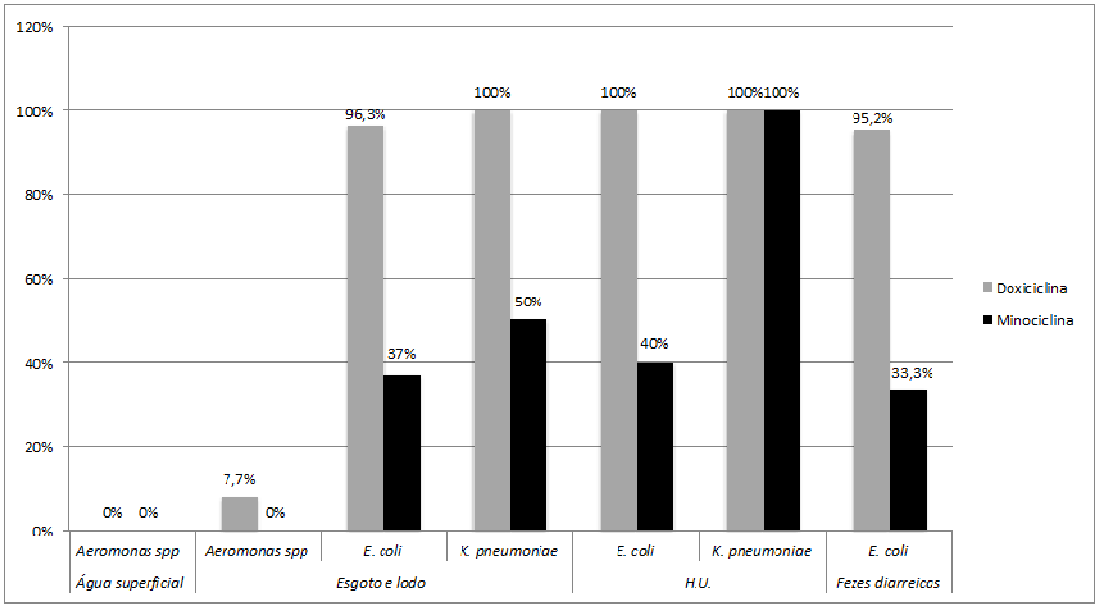

Figura 16. Distribuição de isolados não-sensíveis à doxiciclina e minociclina de acordo com o tipo da amostra e as espécies estudadas.

5.2. Detecção de genes *tet*

Os 106 isolados não-sensíveis a tetraciclinas foram submetidos à pesquisa dos genes *tet*(A), (B), (C), (D), (E), (G), (H), (J), (K), (Z) e (30) para o mecanismo de bomba de efluxo, *tet*(B/P), (L), (M), (O), (OTR), (Q), (S), (T) e (W) para o mecanismo de proteção ribossomal e *tet*(X) para inativação enzimática. Todos os isolados apresentaram pelo menos um dos genes pesquisados, ou combinações de mais de um gene, no entanto, foram positivos apenas para o mecanismo de bomba de

efluxo. Os genes *tet*(G), (H), (J), (K), (Z), (30), (B/P), (L), (M), (O), (OTR), (Q), (S), (T), (W) e (X) não foram amplificados em nenhum isolado. Portanto, os resultados concentraram-se na presença dos genes *tet*(A), (B), (C), (D) e (E).

De acordo com os resultados foi verificado que o gene *tet*(A) foi observado em 27 (25,5%), o gene *tet*(B) ocorreu em 35 (33%) dos isolados, *tet*(C) em 7 (6,5%), *tet*(D) em 20 (18,9%) e *tet*(E) em 25 (23,5%) dos isolados. Na Figura 17 verifica-se a distribuição destes genes isolados ou em combinação com outros genes *tet*. Combinações de mais de um gene no mesmo isolado foram encontradas em 8 (7,5%) dos isolados estudados.

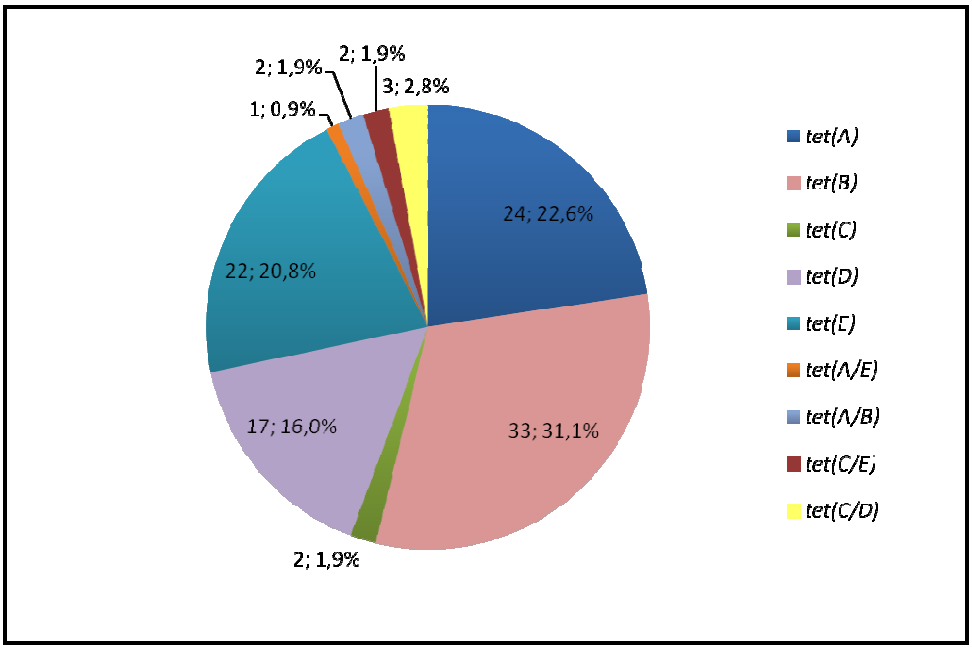

Figura 17. Distribuição dos genes *tet* dentre os 106 isolados positivos para pelo menos um dos genes pesquisados. Os valores separados por vírgula indicam o número de isolados e sua porcentagem dentre as cepas positivas.

Na Figura 18 pode ser observada a distribuição dos genes de acordo com o tipo da amostra e a ocorrência de genes *tet* isolados ou em combinações de mais de um gene *tet*. Dos 58 isolados ambientais resistentes à tetraciclina, 14 (24,1%)

possuíam o gene *tet*(A), 16 (27,6%) foram positivos para o gene *tet*(B), 2 (3,6%) carreavam o gene *tet*(C) e 22 (37,9%) possuíam o gene *tet*(E). Com relação às combinações de genes *tet*, *tet*(A)/(E) e *tet*(A)/(B) foram detectados em 1 (1,7%) isolado cada e *tet*(C)/(E) estava presente em 2 (3,5%) isolados. Dentre os 48 isolados clínicos o gene *tet*(A) estava presente em 10 (20,9%) cepas, o gene *tet*(B) e *tet*(D) eram carreados por 17 (35,4%) isolados cada, e separadamente. As combinações de genes *tet* estavam presentes em 4 cepas, sendo distribuídas da seguinte forma: *tet*(A)/(B) em 1 (2,1%) isolado e *tet*(C)/(D) em 3 (6,2%) isolados.

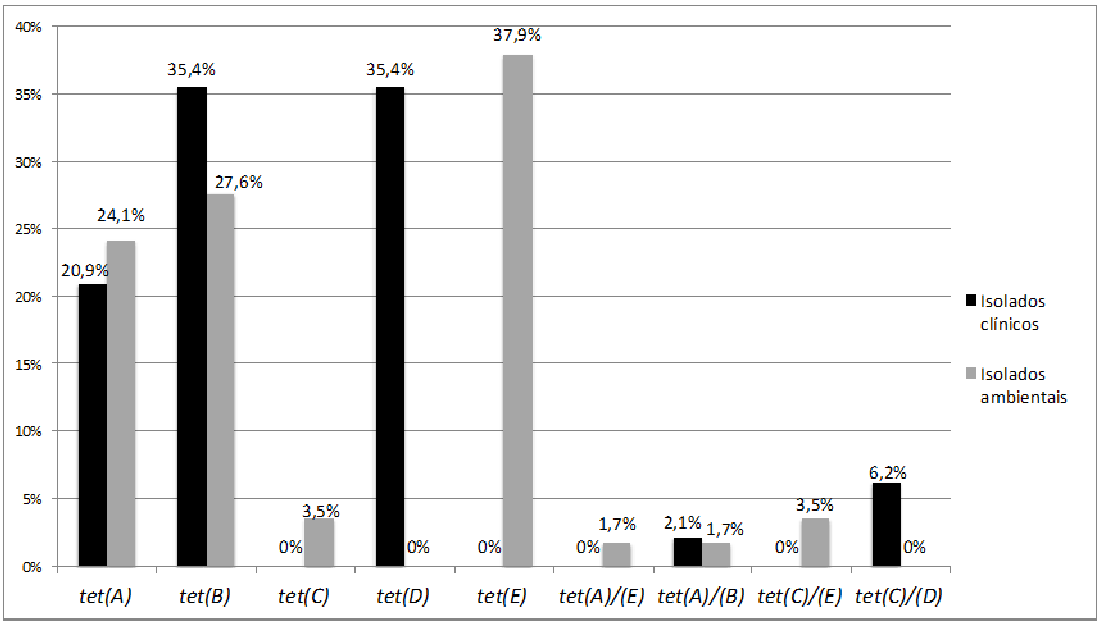

Figura 18. Ocorrência dos genes *tet* isoladamente ou em combinações de acordo com a origem clínica ou ambiental da amostra.

A Figura 19 mostra separadamente a ocorrência dos genes de acordo com os perfis de sensibilidade para doxiciclina e minociclina. Todos os isolados eram resistentes à tetraciclina e sensíveis à tigeciclina, e por este motivo estes resultados não foram ilustrados na Figura 19. Todos os isolados não-sensíveis à tetraciclina carreavam pelo menos um dos genes *tet*. A partir de 24 isolados positivos para *tet*(A) 23 (95,8%) foram não-sensíveis à doxiciclina e 1 (4,2%) à minociclina. A partir dos

33 isolados positivos para *tet*(B), 100% foi não-sensível à doxiciclina e 26 (78,8%) isolados foram não-sensíveis à minociclina. Dos 2 isolados carreando *tet*(C) ambos foram sensíveis à doxiciclina e minociclina. Todos os isolados carreando *tet*(D) foram resistentes à doxiciclina e minoclina. Entre os 22 isolados carregando *tet*(E) apenas 1 (4,5%) apresentou-se não-sensível à doxiciclina e todos os demais sensíveis à minociclina.

Com relação à suscetibilidade das cepas carreando combinações de genes *tet*, foi observado que a cepa carreando *tet*(A)/(E) apresentou-se sensível à doxiciclina e à minociclina. Das duas cepas carreando *tet*(C)/(E), uma apresentou-se não-sensível à doxiciclina e ambas foram sensíveis à minociclina. Das 3 cepas carreando a combinação *tet*(C)/(D), a resistência à doxiciclina e minociclina foi observada em todos os isolados. De duas cepas carreando *tet*(A)/(B) ambas apresentaram-se resistentes à doxiciclina e apenas uma (50%) à minociclina (Figura 19).

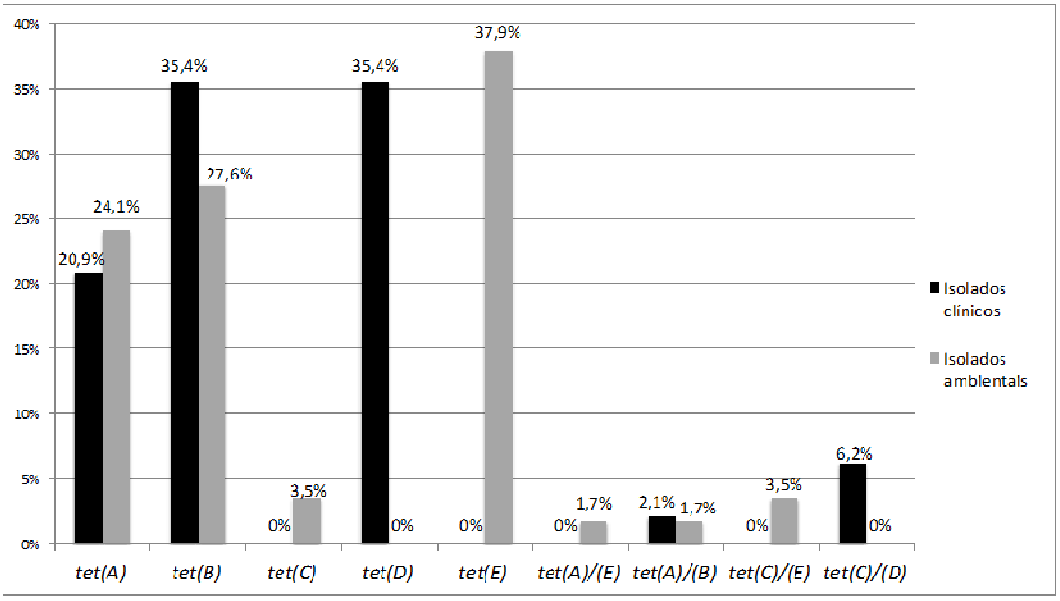

Figura 19. Distribuição de cepas não-sensíveis à doxiciclina e minociclina e sua relação com a ocorrência dos genes *tet*(A), (B), (C), (D) e (E) detectados isoladamente ou em combinações.

A distribuição dos genes *tet* pode ser analisada na Tabela 4 de acordo com as espécies estudadas, as amostras de origem e seus respectivos perfis de sensibilidade, sendo possível observar a quantidade de isolados positivos para cada gene juntamente com a distribuição dos perfis de sensibilidade.

Tabela 4. Distribuição dos genes *tet* entre os isolados positivos de acordo com com seus perfis fenotípicos de resistência e de acordo com as espécies *Aeromonas*, *E. coli* e *K. pneumoniae* e suas respectivas fontes de isolamento.

	Isolados	Genes	%(n)*	TET(n)	DOX(n)	MIN(n)
Isolados ambientais	*Aeromonas* [1] *n=26*	*tet*(A)	3,8(1)	I	S	S
		tet(C)	7,7(2)	I	S	S
		tet(E)	77(20)	I(19)/R(1)	I(1)/S(20)	S
		tet(A)/(E)	3,8(1)	I	S	S
		tet(C)/(E)	7,7(2)	I(1)/R(1)	I(1)/S(1)	S
	Aeromonas [1a] *n=1*	*tet*(E)	100(1)	I	S	S
	K. pneumoniae[1] *n=4*	*tet*(A)	75(3)	R	R	I
		tet(B)	25(1)	R	R	I
	E. coli[1] *n=27*	*tet*(A)	35,7(10)	R	I(1)/R(9)	S
		tet(B)	53,6(15)	R	R	S(3)/I(8)/R(4)
		tet(A)/(B)	3,6(1)	R	R	S
		tet(E)	3,6(1)	I	S	S
Isolados clínicos	*K. pneumoniae*[2] *n=22*	*tet*(B)	9,1(2)	R	R	I(1)/R(1)
		tet(D)	77,3(17)	R	R	R
		tet(C)/(D)	13,4(3)	R	R	R
	E. coli[2] *n=26*	*tet*(A)	38,6(10)	R	S(1)/I(3)/R(6)	S
		tet(B)	57,7(15)	R	R	S(4)/I(8)/R(3)
		tet(A)/(B)	3,8(1)	R	R	R

[1]isolados de esgoto e lodo, [1a]isolados de água superficial, [2]isolados clínicos. R – resistente, I – intermediário, S – sensível. *Valor de porcentagem e número entre parênteses referentes aos isolados positivos. TET: tetraciclina, DOX: doxiciclina, MIN: minociclina.

A Figura 20 mostra a distribuição dos genes *tet* detectados de acordo com as espécies estudadas. A partir de 27 isolados de *Aeromonas* spp., o gene *tet*(E) foi detectado em 21 (77,8%), *tet*(A)/(E) e *tet*(A) em 1 (3,7%) isolado cada, *tet*(C)/(E) e *tet*(C) em 2 isolados (7,4%) cada. Dos 53 isolados de *E. coli* não-sensíveis a tetraciclina, o gene de maior ocorrência foi *tet*(B), detectado em 30 (56,6%) isolados, seguido de *tet*(A) detectado em 20 (37,7%) isolados, *tet*(A)/(B) em 2 (3,8%) isolados

e *tet*(E) em apenas um (1,9%) isolado. De 26 isolados de *K. pneumoniae* analisados neste estudo para a presença de genes *tet*, a maioria das cepas foram positivas para o gene *tet*(D) que foi observado em 17 (65,4%) isolados, em menores quantidades os genes *tet*(A), *tet*(B) e *tet*(C)/(D) foram observados em 3 (11,5%) isolados cada.

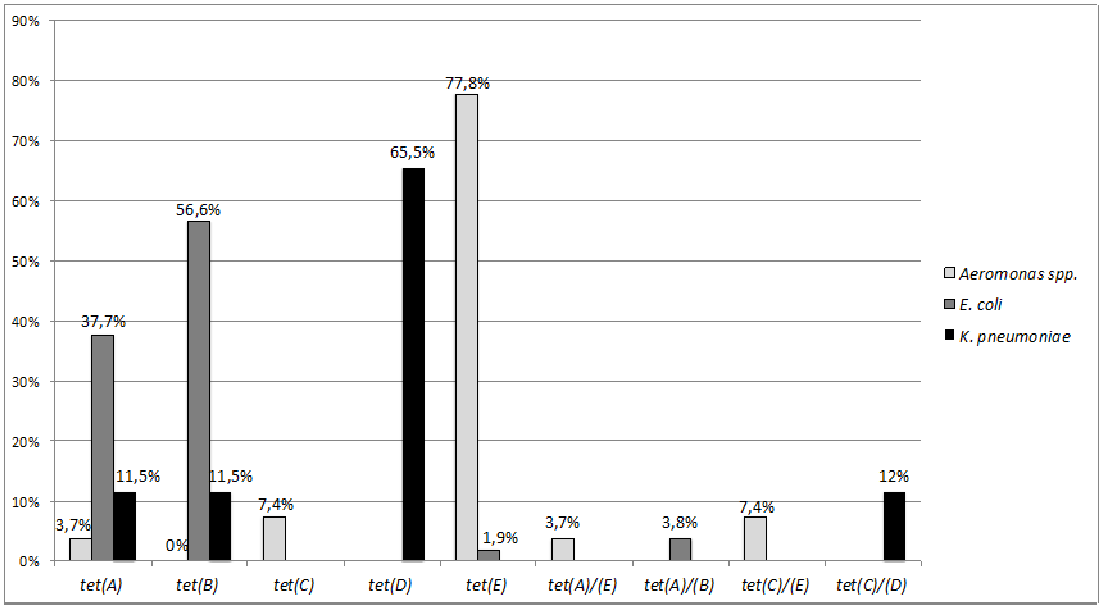

Figura 20. Distribuição dos genes *tet* com ocorrência isolada ou em combinações no gênero *Aeromonas* e nas espécies *K. pneumoniae* e *Escherichia coli.*

5.3. Pesquisa de transposons

A pesquisa das transposases dos elementos genéticos móveis Tn*1721,* Tn*10,* IS*26* e ISAS5 revelou que das 106 cepas analisadas neste estudo 91 (85,8%) possuíam pelo menos uma das transposases pesquisadas, enquanto 15 (14%) foram negativas para todas as transposases.

A partir das 91 cepas positivas para as transposases foi observado que 43 (47,2%) e 48 (52,7%) eram de origem ambiental e clínica, respectivamente. Das 43 cepas ambientais positivas, 27 (62,8%) carreavam a transposase do elemento genético móvel Tn*1721*, 32 (74,4%) carreavam IS*26* e 13 (30,2%) foram positivas para IS*10*, transposase do elemento genético móvel Tn*10* (Figura 21).

As 48 cepas clínicas carreadoras de transposases estavam distribuídas em 20 isolados (41,7%) carreando a transposase do elemento genético móvel Tn*1721*, 45 (93,7%) carreando IS*26* e 14 (29,2%) carreando IS*10* (Figura 21).

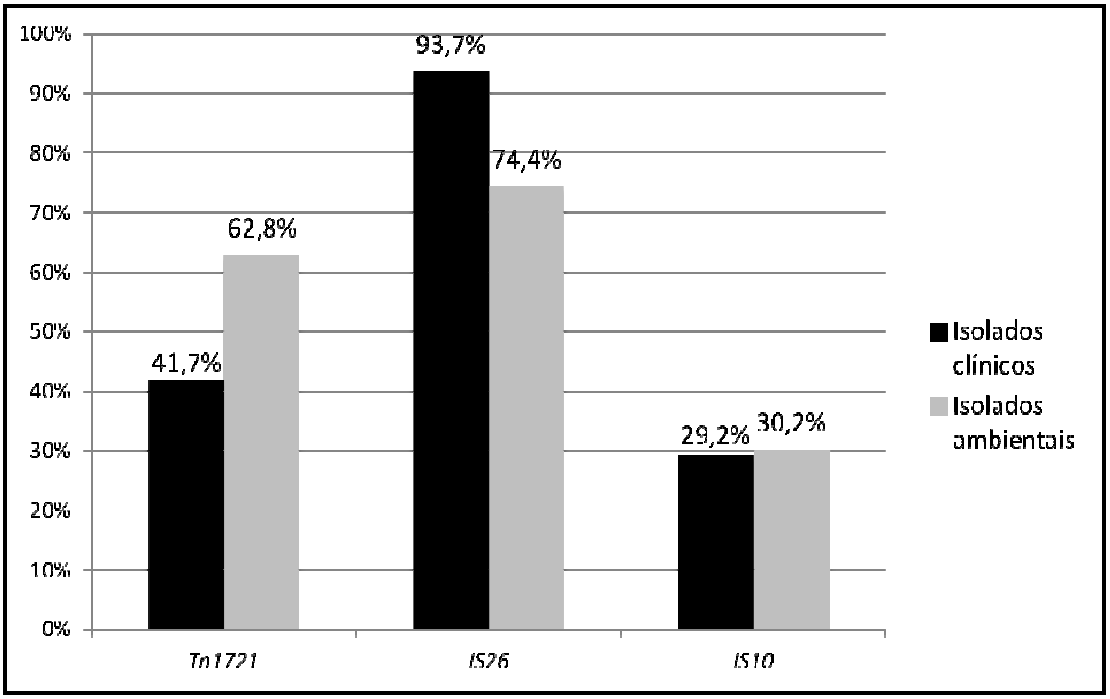

Figura 21. Distribuição das transposases associadas aos elementos genéticos móveis pesquisados de acordo com a origem clínica ou ambiental dos isolados.

Das 91 cepas positivas para as transposases, 47 (51,6%) continham a transposase relacionada ao elemento Tn*1721*, 77 (84,6%) possuíam a transposase do elemento IS*26* e 27 (29,7%) carreavam a transposase do elemento Tn*10*.

Com relação à ocorrência de mais de uma transposase na mesma cepa, foi observado que 9 (9,8%) isolados carreavam as três transposases pesquisadas, 25 (27,5%) dos isolados carreavam concomitantemente a transposase de Tn*1721* e IS*26*, em um (1,1%) isolado foram encontradas transposases relacionadas aos elementos Tn*1721* e Tn*10* e 16 (17,6%) dos isolados possuíam as transposases de IS*26* e Tn*10* concomitantemente. Em isolados carreando apenas uma das transposases

pesquisadas verificou-se a presença da transposase de Tn*1721* em 12 (13,2%) isolados, 27 (29,7%) carreavam apenas IS*26* e 1 (1,1%) isolado carreava somente IS*10*. O elemento ISAS5 pesquisado nas cepas de *Aeromonas* não foi detectado (Figura 22).

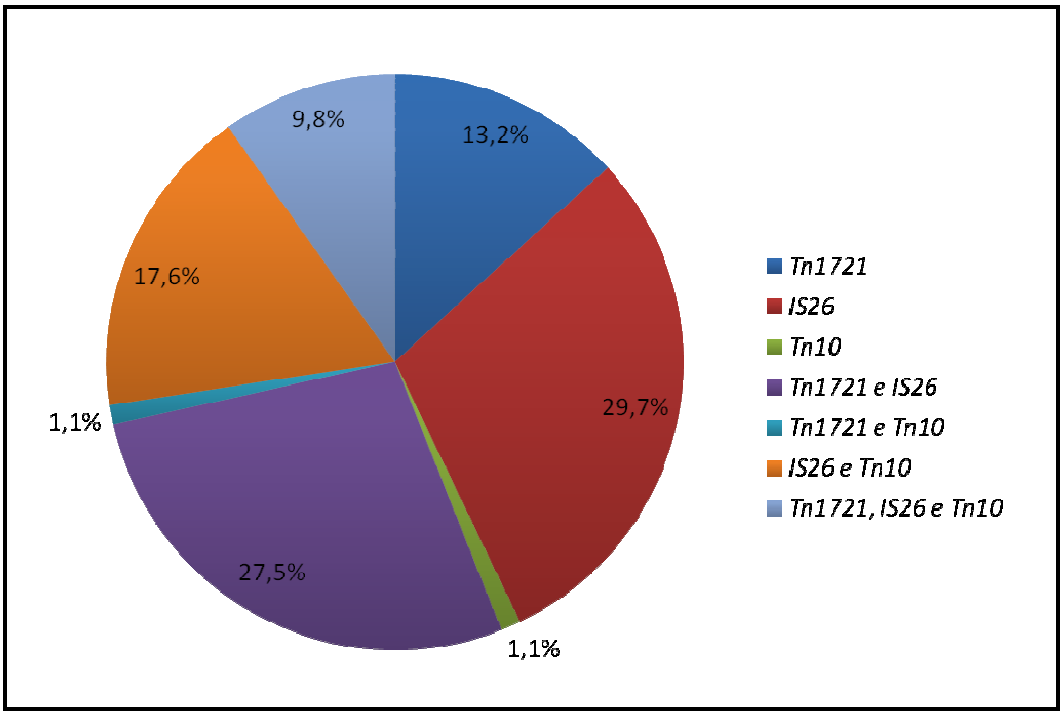

Figura 22. Distribuição de Tn*1721*, IS*26* e Tn*10* isoladamente e em combinações, com suas porcentagens calculadas baseadas nas 91 cepas positivas para a presença de pelo menos um dos elementos genéticos móveis.

Na Figura 23 observa-se a distribuição dos elementos genéticos móveis de acordo com os organismos estudados e a origem de isolamento. A única cepa de *Aeromonas* spp. proveniente de água superficial foi negativa para todos os elementos genéticos móveis pesquisados e não foi incluída na Figura 23. Dentre os isolados de amostras de lodo e esgoto, a partir das 26 *Aeromonas* spp. todas foram negativas para a presença de Tn*10,* 12 (46,1%) foram positivas para Tn*1721* e 3 (11,5%) para IS*26.* Dos 4 isolados de *K. pneumoniae,* 2 (50%) continham a transposase de Tn*1721*, 1 (25%) de Tn*10* e 3 (75%) de IS*26*. De 27 isolados de *E.*

coli, 13 (48,1%) possuíam a transposase para Tn*1721,* 12 (44,4%) foram positivas para a transposase de Tn*10* e 26 (96,2%) continham a IS*26*.

Com relação aos isolados clínicos de um hospital universitário foi observado que das 22 cepas de *K. pneumoniae*, 9 (41%) foram positivas para a presença de Tn*1721*, 2 (9,1%) para a presença de Tn*10* e 22 (100%) possuíam a transposase relacionada a IS*26*. Para as 5 cepas de *E. coli* desta mesma origem de isolamento, 3 (60%) possuíam Tn*1721*, 2 (40%) possuíam Tn*10* e 5 (100%) foram positivas para IS*26*. Nas cepas de *E. coli* isoladas de fezes diarreicas foi observado que 8 (38%) foram positivas para Tn*1721*, 10 (47,6%) para Tn*10* e 18 (85,7%) carreavam a transposase de IS*26*.

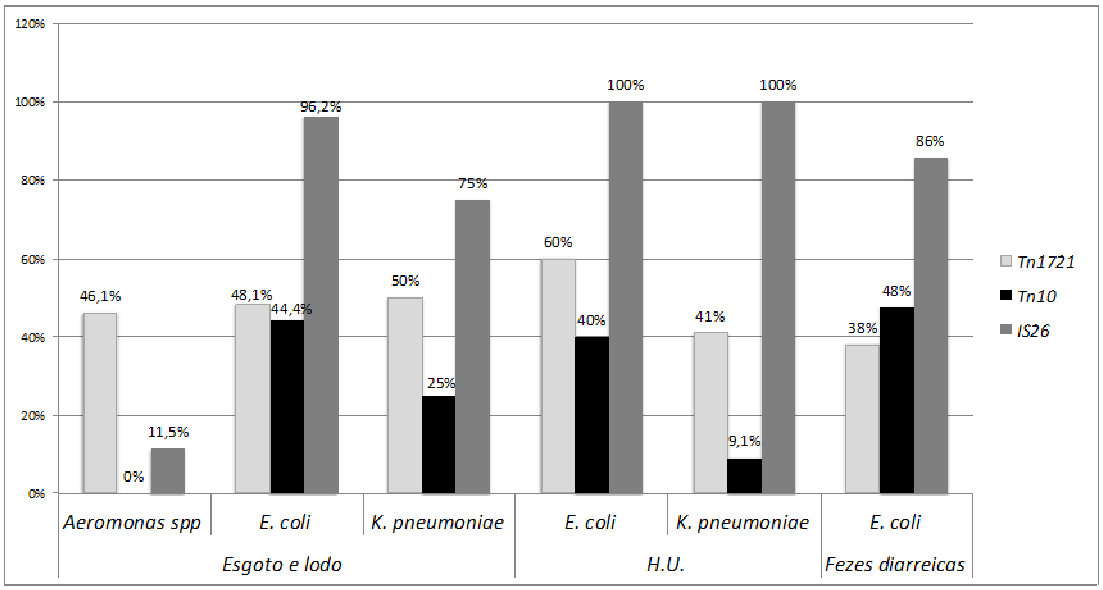

Figura 23. Distribuição das transposases relacionadas a Tn*1721,* Tn*10* e IS*26* de acordo com os microrganismos estudados e a origem de seu isolamento.

Na Tabela 5 é possível observar a distribuição dos elementos genéticos móveis de acordo com os genes *tet* pesquisados. Observa-se que Tn*1721* está distribuído dentre os isolados independentemente dos genes *tet* que estes estão carreando, porém com ocorrência destacada para as cepas carreando *tet*(A), das quais

17 (71%) de 24 cepas carreavam a transposase associada a Tn*1721*. Tn*10* teve sua presença associada somente a cepas carreadoras de *tet*(B) e uma carreando *tet*(A)/(B). A presença de IS*26* foi verificada principalmente em cepas carreadoras de *tet*(A), *tet*(B) e *tet*(D) ocorrendo em 22 (91%), 31 (94%) e 17 (100%), respectivamente.

Tabela 5. Distribuição de isolados positivos na triagem para as transposases dos elementos genéticos Tn*1721,* Tn*10* e IS*26* com relação aos resultados para a ocorrência dos genes *tet.*

Genes		*Transposases*		
tet	*Positivos*	Tn*1721*	Tn*10*	IS*26*
tet(A)	24	17	0	22
tet(B)	33	9	26	31
tet(C)	2	2	0	0
tet(D)	17	5	0	17
tet(E)	22	7	0	0
tet(A)/(E)	1	1	0	0
tet(C)/(E)	2	1	0	2
tet(C)/(D)	3	3	0	3
tet(A)/(B)	2	2	1	2

5.3.1. Caracterização do ambiente genético dos genes *tet*

Tn*1721*

Dos 47 isolados positivos para a transposase do elemento Tn*1721*, 20 carreavam o gene *tet*(A) e os outros 27 possuíam um dos outros genes *tet* pesquisados. Nenhum isolado carreando *tet*(B), (C), (D) ou (E) foi positivo para a associação destes genes ao elemento Tn*1721.* Dentre os 20 isolados que carreavam *tet*(A) associado a uma estrutura de aproximadamente 11140pb, em 5 foi possível amplificar o transposon inteiro através do mapeamento e sequenciamento das regiões (Figura 9 em Material e Métodos). Todos os isolados possuíam associação do regulador *tet*R com o gene *tet*(A). Dentre os 15 isolados restantes 9 apresentaram associação dos genes *tet*R+*tet*A com a primeira porção do transposon ligando-se à

primeira transposase e 6 possuíam *tet*R+*tet*A associados à transposase não funcional e o final do transposon.

Tn*10*

Dos 35 isolados carreadores do gene *tet*(B), 27 foram positivos para a triagem de Tn*10*. Os isolados carreando outros genes foram negativos para a triagem de Tn*10*. Dentre os 27 isolados positivos para o gene *tet*(B) e a transposase de Tn*10*, 11 apresentaram uma estrutura de aproximadamente 6317pb amplificada a partir da região IRL até a região IRR de Tn*10* (Figura 10 de Material e Métodos) caracterizadas por meio do mapeamento e sequenciamento das regiões. Os demais 16 isolados carreando *tet*(B) apresentaram a associação do gene com a estrutura de Tn*10*, no entanto com as combinações de iniciadores utilizadas não foi possível amplificar as mesmas regiões, por isso uma combinação dos iniciadores IS10-IRL e tetBRv foi utilizada na tentativa de associar o gene *tet*(B) à IRL da estrutura Tn*10*. Na visualização do gel de agarose não houve a presença de fragmentos amplificados, no entanto os produtos dessa reação de PCR foram purificados e PCRs internos com os iniciadores do Quadro 8 de Material e Métodos foram realizados e então verificou-se a presença das regiões que faltavam para completar o elemento Tn*10* dos 16 isolados.

IS*26*

Dentre os 79 isolados positivos para a transposase relacionada ao elemento IS*26*, 17 foram positivos para *tet*(A) associado a Tn*1721*, portanto estes isolados não foram mapeados para a associação do gene com IS*26*, restando 62 isolados.

Vinte isolados foram positivos para a associação do gene *tet*(D) com o elemento IS*26* formando uma estrutura de aproximadamente 5110pb. Em um, dentre

os 20 isolados, não foi possível amplificar a região adhc+IS26Rv, no entanto para todas as outras regiões pesquisadas o isolado foi positivo. Seis isolados positivos para IS*26* possuíam o gene *tet*(C) associado ao elemento, no entanto apresentando uma estrutura de aproximadamente 5300pb, diferente dos isolados carreando *tet*(D) (Figura 12 de Material e Métodos). Em dois isolados de *Aeromonas* spp. carreando *tet*(C) o elemento não pôde ser inteiramente amplificado.

***tet*(E)**

Os isolados carreando *tet*(E) não apresentaram associação a nenhum dos transposons pesquisados. O elemento móvel ISAS5 também foi pesquisado, mas sua associação com o gene *tet*(E) também não foi detectada.

5.4. Integrons

Cinquenta e cinco (52%) isolados foram positivos para Int1 e 8 (7,5%) foram positivos para Int2. Nenhuma cepa foi positiva para Int3 e Int4. Nenhum isolado foi positivo para a associação dos genes *tet* e os elementos genéticos móveis detectados com os integrons e integrases pesquisadas.

Dos isolados de água superficial todas as cepas foram negativas para as integrases pesquisadas. Dos isolados não-sensíveis à tetraciclina, um total de 63 (59,4%) cepas provenientes de amostras de esgoto e lodo, hospital universitário e fezes diarreicas foram positivas para a pesquisa das integrases de classe 1 e 2. De 55 (87,3%) isolados positivos para Int1, nos isolados de esgoto e lodo tratado foram detectados 27 (49,1%) positivos, dentre os quais 14 (25,5%) eram *Aeromonas* spp., 11 (20%) *E. coli* e 2 (3,6%) *K. pneumoniae*. Nas amostras de um hospital universitário, 4 (7,3%) e 21 (38,2%) isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* foram

positivos para a pesquisa de Int1, respectivamente. Em amostras de fezes diarreicas 3 (5,5%) isolados de *E. coli* foram positivos para Int1.

A partir dos 63 isolados positivos para as integrases, em oito (12,7%) foi encontrada a integrasse de classe 2. Dentre os quais foi observado que nas amostras de fezes diarreicas 6 (75%) isolados de *E. coli* foram positivos para Int2 e um destes isolados foi positivo para ambas as integrases. Nas amostras de esgoto e lodo, 2 cepas (25%) de *E. coli* carreavam a integrasse de classe 2. Enquanto nenhum dos isolados hospitalares foi positivo para Int2.

Na Figura 24 é possível observar o gráfico com os dados descritos anteriormente, nos quais as porcentagens para ocorrência das integrases nos diferentes microrganismos foram calculadas de acordo com o número total de isolados positivos para integrases de classes 1 e 2 separadamente. Utilizando-se, portanto para a base de cálculos de porcentagens, os totais de 55 e 8 isolados para integrase 1 e 2, respectivamente.

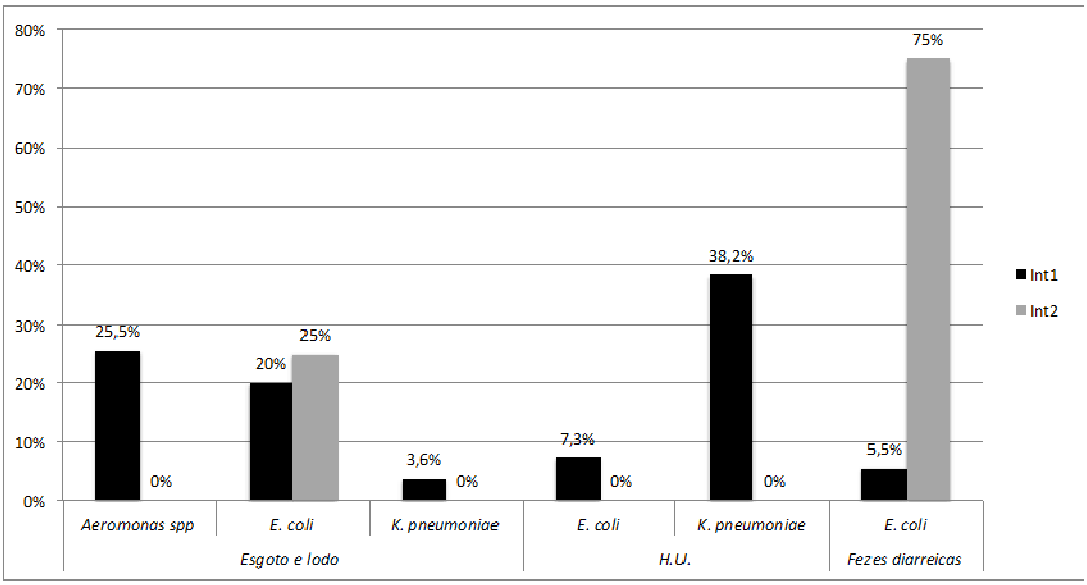

Figura 24. Distribuição de Int1 e Int2 de acordo com o gênero *Aeromonas* e as espécies *E. coli* e *K. pneumoniae,* e a origem dos isolados.

5.5. Detecção de grupos de incompatibilidade (Inc)

Dezoito grupos Inc foram pesquisados nos 106 isolados não-sensíveis carreadores de pelo menos um dos genes *tet* pesquisados. Setenta e três (68,9%) isolados foram positivos para pelo menos um dos 14 grupos pesquisados, os demais 33 (31,1%) isolados foram negativos para todos os grupos Inc. Apenas 4 dos grupos Inc não foram detectados, W, X, T e FrepB.

É possível verificar através do gráfico da Figura 25 que o grupo IncF foi de maior ocorrência neste estudo, sendo observado em 40 (54,8%) das 73 cepas positivas para este grupo. Seguido dos grupos IncFIB e IncA/C que ocorreram em 30 (41,1%) e 21(28,7%) dos isolados positivos, respectivamente. Das cepas de *Aeromonas* apenas uma foi tipada através desta técnica, sendo detectado o grupo IncP nesta cepa. Os demais grupos ocorreram em menor porcentagem e estão indicados na Figura 25 e na Tabela 6.

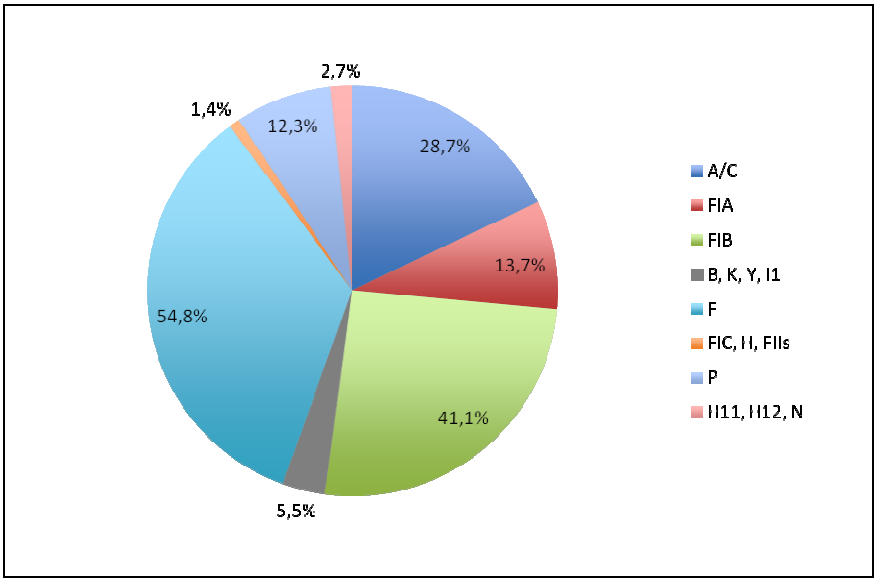

Figura 25. Representação da ocorrência dos grupos Inc distribuídos entre os 91 isolados positivos para pelo menos um dos grupos pesquisados. Grupos Inc separados por vírgula indicam que os grupos ocorreram na mesma proporção, mas não necessariamente em conjunto no mesmo isolado.

Tabela 6. Isolados positivos para grupos Inc e suas combinações, distribuídos de acordo com os microrganismos *Aeromonas* spp., *E. coli* e *K. pneumoniae* e seus locais de origem de isolamento.

	Isolados	*Grupo Inc*	*Positivos*
Isolados ambientais	*Aeromonas*[1] *n=26*	P	1
		Não tipável	25
	Aeromonas[1a] *n=1*	Não tipável	1
	K. pneumoniae[1] *n=4*	P	1
		FIA, FIB, F	1
		F, FIB	1
		Não tipável	1
	E. coli[1] *n=27*	FIA, FIB, P, F, B	1
		FIA, FIB	1
		Y	1
		FIB, F	3
		I1, F	1
		FIA, FIB, F	3
	E. coli[1] *n=27*	FIIs	1
		FIB, P, F	2
		F	4
		I1	1
		F, K	3
		FIB	1
		N	1
		FIA, FIB, FIC, F, B	1
		Não tipável	3
Isolados clínicos	*K. pneumoniae*[2] *n=22*	H12, FIB, Y	1
		A/C	20
		Não tipável	1
	E. coli[2] *n=26*	H12, N, FIB, Y, P, F	1
		I1, FIB, P, F	1
		A/C, FIA, FIB	1
		H11	1
		H11, P	1
		I1, FIB, F	1
		B	1
		F, H	1
		N, F	1
		FIA, FIB, F	2
		FIB, H, F	1
		FIB, P, F	1
		K, F	1
		F	2
		Y, F	1
		FIB, F	7
		Não tipável	2

[1]isolados de esgoto e lodo, [1a]isolados de água superficial, [2]isolados clínicos.

Na Figura 26 observa-se a distribuição dos grupos Inc de acordo com o tipo de amostra e baseando-se nos 106 isolados não-sensíveis à tetraciclina. Destacando para a ocorrência de grupos Inc, como IncF, IncFIA e IncFIB em ambas as amostras clínicas e ambientais e para a ocorrência de apenas 3 (3%) isolados clínicos não tipáveis através da técnica de PBRT, enquanto um total de 30 (28%) isolados ambientais não foram tipáveis através da técnica utilizada.

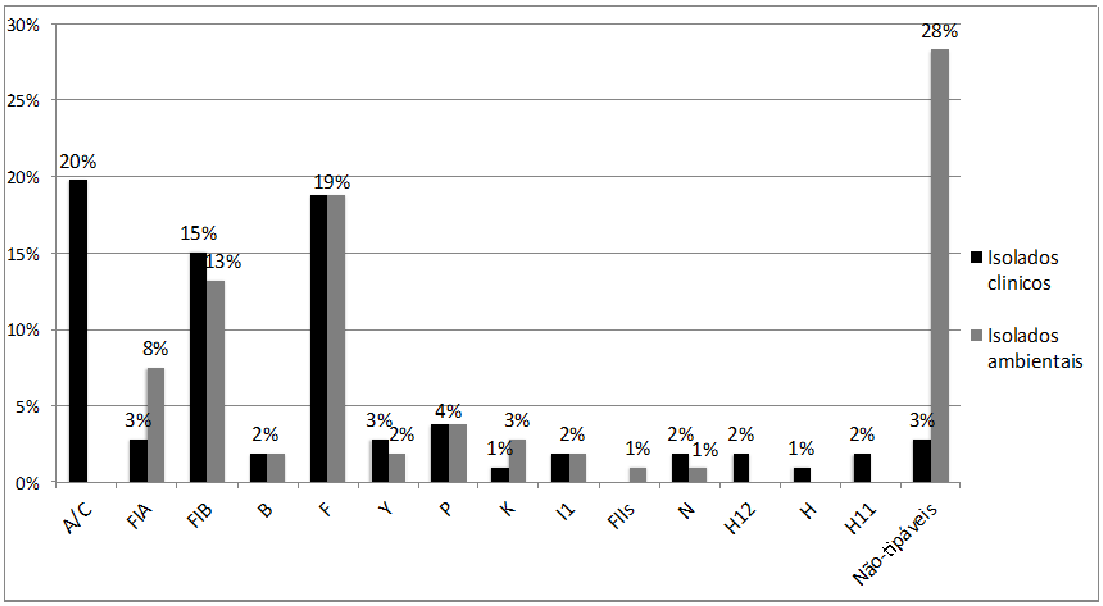

Figura 26. Distribuição dos grupos Inc de acordo com a origem clínica ou ambiental da amostra.

5.6. Genotipagem

A partir das análises de géis de agarose obtidos através da metodologia ERIC-PCR, isolados com perfis genotípicos iguais ou com diferença de apenas um fragmento foram submetidos à técnica de Pulsed Field.

Após submeter os isolados com perfis genéticos semelhantes ou iguais à digestão com a enzima *XbaI* e a eletroforese em campo pulsado foi observado que dentre os isolados de *Aeromonas* todos apresentaram perfis genéticos distintos. Nos

isolados de *E. coli* provenientes de um hospital universitário, lodo e esgoto, e fezes diarreicas também não foram encontradas cepas clonais.

No entanto, dentre as cepas de *K. pneumoniae* isoladas de um hospital universitário e que totalizavam 22 isolados, em três isolados foram observados perfis distintos, enquanto que os 19 isolados restantes se agruparam em dois perfis genéticos, Perfil A e Perfil B, 17 destes isolados carreavam o gene *tet*(D) e 2 carreavam *tet*(C)/(D), e dentre os isolados com perfis distintos estavam presentes os genes *tet*(B) em dois isolados, e os genes *tet*(C)/(D) em um isolado. Os perfis genéticos observados nas cepas hospitalares de *K. pneumoniae* foram comparados com os perfis genéticos dos isolados de *K. pneumoniae* de lodo e esgoto, e todos os isolados apresentaram perfis genéticos distintos.

Apesar de possuírem perfis genéticos iguais através da técnica de PFGE, as cepas pertencentes aos perfis A e B apresentavam diferenças nos valores de Concentração Inibitória Minima, nos grupos de incompatibilidade de plasmídios detectados e na presença de genes codificadores de ESBL (resultados não apresentados).

5.7. Seleção das cepas para localização dos genes *tet*

Trinta e três cepas com perfis genéticos distintos foram selecionadas de acordo com os critérios descritos na seção Material e Métodos para linearização de plasmídios e para os experimentos de transformação.

Enzima S1 e Plasmídios

Determinando o tamanho dos plasmídios pela digestão e linearização dos mesmos com o uso da enzima S1-nuclease e corrida eletroforética em PFGE, foi

possível identificar plasmídios de alto peso molecular presentes nas cepas selecionadas para localização do gene *tet.* No Quadro 13 pode-se observar as informações das cepas selecionadas para os experimentos de transformação.

Quadro 13. Cepas não-clonais de *K. pneumonie, E. coli* e *Aeromonas* spp. selecionadas para a metodologia de transformação.

ID	Microrganismo	Origem	Concentração Inibitória Mínima[1]				*tet*	Elemento móvel	PRBT	Plamídios (Kb)
			TET*	DOX*	MIN*	TGC*				
1	*Aeromonas*	EL	128	12	4	1	*tet*(C)/(E)	-	-	194, 23
3	*Aeromonas*	EL	16	6	3	0.5	*tet*(E)	-	-	23
4	*Aeromonas*	EL	8	2	1	0.19	*tet*(C)/(E)	IS*26*	-	23
6	*Aeromonas*	EL	6	2	0.38	0.19	*tet*(A)/(E)	Tn*1721*	P	-
19	*Aeromonas*	EL	6	3	1.5	0.125	*tet*(A)	Tn*1721*	-	23, 145, 242
35	*K. pneumoniae*	HU	256	48	16	1	*tet*(B)	Tn*10*	H12; FIB; Y	339
36	*K. pneumoniae*	HU	256	64	48	0.75	*tet*(D)	IS*26*	A/C	145, 194, 242
38	*K. pneumoniae*	HU	256	64	32	0.38	*tet*(C)/(D)	IS*26*	A/C	194, 242
39	*K. pneumoniae*	HU	64	16	6	1	*tet*(B)	-	A/C	200
40	*K. pneumoniae*	HU	256	64	32	0.5	*tet*(C)/(D)	IS*26*	A/C	209, 242
42	*K. pneumoniae*	HU	256	48	24	0.25	*tet*(D)	IS*26*	A/C	48, 82, 145, 179
45	*K. pneumoniae*	HU	256	64	24	0.5	*tet*(D)	IS*26*	A/C	48, 82, 179, 194, 260
57	*K. pneumoniae*	HU	256	256	256	1	*tet*(D)	IS*26*	A/C	70, 242
93	*K. pneumoniae*	EL	64	32	6	0.38	*tet*(B)	Tn*10*	FIA, FIB, F	97, 300
313	*K. pneumoniae*	EL	256	64	8	0.75	*tet*(A)	Tn*1721*	-	97
59	*E. coli*	FD	128	96	2	0.19	*tet*(A)	Tn*1721*	I1, FIB, P, F	>48, 160
61	*E. coli*	HU	256	48	12	0.094	*tet*(B)	Tn*10*	H11	100, 150
62	*E. coli*	HU	256	64	16	0.125	*tet*(A)/(B)	Tn*1721*	H11, P	125, 242
64	*E. coli*	FD	256	96	24	0.19	*tet*(B)	Tn*10*	FIB, F	100, 240
65	*E. coli*	FD	64	64	1	0.125	*tet*(A)	Tn*1721*	I1, FIB, F	70, 97
68	*E. coli*	FD	64	8	0.75	0.125	*tet*(A)	Tn*1721*	B	>48, 97

HU: Hospital Universitário, EL: Esgoto e Lodo, FD: fezes diarreicas. * TET: tetraciclina, DOX: doxiciclina, MIN: minociclina, TGC: tigeciclina. [1]µg/mL

Quadro 13 (continuação). Cepas não-clonais de *K. pneumonie, E. coli* e *Aeromonas* spp. selecionadas para a metodologia de transformação.

ID	Microrganismo	Origem	Concentração Inibitória Mínima[1]				*tet*	Elemento móvel	PRBT	Plamídios (Kb)
			TET*	DOX*	MIN*	TGC*				
70	*E. coli*	FD	256	128	8	0.125	*tet*(B)	Tn*10*	F, B	97
71	*E. coli*	FD	32	8	0.75	0.125	*tet*(A)	Tn1721	-	97, 194
79	*E. coli*	EL	256	128	256	0.75	*tet*(B)	Tn*10*	FIA, FIB	97, 120
83	*E. coli*	EL	96	24	3	0.125	*tet*(A)	Tn*1721*	I1, F	112
97	*E. coli*	EL	256	64	12	0.064	*tet*(B)	Tn*10*	F	112, 145
121	*E. coli*	FD	32	16	1	0.19	*tet*(A)	Tn*1721*	F	48, 60, 145
148	*E. coli*	FD	256	256	12	0.125	*tet*(B)	Tn*10*	FIB, F	80
156	*E. coli*	FD	128	48	8	0.064	*tet*(B)	Tn*10*	FIB, F	60
172	*E. coli*	FD	128	96	12	0.094	*tet*(B)	Tn*10*	FIB, H, F	97
315	*E. coli*	EL	32	16	2	0.19	*tet*(A)	Tn*1721*	FIB, F	145
317	*E. coli*	EL	256	128	12	0.094	*tet*(B)	Tn*10*	F	50, 100
320	*E. coli*	EL	256	48	6	0,064	*tet*(B)	Tn*10*	F, K	>48, 60, 97

HU: Hospital Universitário, EL: Esgoto e Lodo, FD: fezes diarreicas. * TET: tetraciclina, DOX: doxiciclina, MIN: minociclina, TGC: tigeciclina. [1]μg/mL

Um total de 33 cepas foram submetidas aos experimentos de transformação, das quais em apenas 9 foi observada a transferência de plasmídio para a célula receptora. Em todas as células transformadas foi possível verificar por meio de PCR a presença do respectivo gene *tet* detectado nas células selvagens. Também foram realizados PCRs para detecção de grupos Inc com a finalidade de determinar à qual grupo Inc pertenciam os plasmídios carreando os genes *tet*. A cepa 4 pertencente ao gênero *Aeromonas* carreava dois genes *tet,* no entanto após a realização do PCR para ambos os genes na cepa transformada foi verificado que o gene *tet*(C) foi transferido junto com o plasmídio e era o responsável pelo perfil não-sensível da cepa à tetraciclina. No quadro 14 observa-se os resultados para as cepas transformadas.

Quadro 14. Características das cepas de *Aeromonas, E. coli* e *K. pneumoniae* isoladas de amostras clínicas e ambientais positivas para o experimento de transformação.

ID	Microrganismo	Origem	CIM[1]				*tet*	Elemento móvel	Inc
			TET*	DOX*	MIN*	TGC*			
4	*Aeromonas*	EL	8	2	0,25	0.064	*tet*(C)	IS*26*	-
42	*K. pneumoniae*	HU	96	16	3	0.064	*tet*(D)	IS*26*	A/C
65	*E. coli*	FD	32	6	0,5	0.125	*tet*(A)	Tn*1721*	FIB
71	*E. coli*	FD	256	32	4	0.75	*tet*(A)	Tn1721	-
83	*E. coli*	EL	48	12	1,5	0.125	*tet*(A)	Tn*1721*	F
97	*E. coli*	EL	128	32	6	0.064	*tet*(B)	Tn*10*	F
156	*E. coli*	FD	128	32	6	0.064	*tet*(B)	Tn*10*	FIB
315	*E. coli*	EL	32	16	2	0.19	*tet*(A)	Tn*1721*	FIB
320	*E. coli*	EL	96	24	4	0,064	*tet*(B)	Tn*10*	F

HU: Hospital Universitário, EL: Esgoto e Lodo, FD: fezes diarreicas.
* TET: tetraciclina, DOX: doxiciclina, MIN: minociclina, TGC: tigeciclina.
[1] Concentração inibitória mínima em µg/mL

6. DISCUSSÃO

Antibióticos são provavelmente a categoria de drogas mais bem-sucedidas na melhoria da saúde humana. Além de tratar inúmeras infecções, os antibióticos também têm sido utilizados na prevenção dessas infecções, como nos casos de transplante de órgãos e outras cirurgias, que não seriam possíveis sem o uso destas drogas. A introdução dos antibióticos na terapia humana permitiu um aumento significativo na expectativa de vida. No entanto, as doenças infecciosas ainda estão entre as maiores causas de morbidade e mortalidade, e uma das razões para esta situação é a capacidade das bactérias em se adaptarem rapidamente aos antibióticos (MARTINEZ e BAQUERO, 2014).

O uso de antibióticos e a resistência estão claramente relacionados. Porém o papel determinante das atividades humanas em reservatórios ambientais contribuiu significativamente para o aumento da resistência, uma vez que após sua descoberta e fabricação, os antibióticos foram muito utilizados na prática humana e animal, e diariamente vêm sendo lançados no ambiente, promovendo uma constante seleção e mantendo a pressão seletiva (ROBERTS, 2005; DAVIES e DAVIES, 2010; CANTÓN e MOROSINI, 2011).

Bactérias patogênicas são constantemente liberadas juntamente com águas residuais no ambiente e muitos destes organismos carregam genes de resistência a antibióticos, estes por sua vez eventualmente serão inseridos em plataformas genéticas móveis, como plasmídios, integrons e transposons, e serão capazes de se disseminar em comunidades bacterianas da água e do solo (BAQUERO et al., 2008).

Outros motivos também estão relacionados com a ocorrência da resistência a antibióticos. Mecanismos fisiológicos, bioquímicos e a própria evolução bacteriana podem ser responsáveis pela resistência e a complexidade destes processos que contribuem para o surgimento e disseminação da resistência (DAVIES e DAVIES, 2010).

A resistência bacteriana abrange bactérias que causam infecções nosocomiais e comunitárias graves e comuns, para as quais o tratamento se tornou difícil ou em alguns casos impossível. Apesar da importância destas infecções, existem diversas lacunas nas informações sobre a extensão, disseminação, evolução e impacto dessa resistência. E esta urgência envolve também a falta de novas opções terapêuticas para substituir as drogas que perderam sua eficácia (WHO, 2014).

Os resultados obtidos neste estudo mostram a ocorrência da resistência a tetraciclinas em isolados clínicos e ambientais. O objetivo inicial deste estudo foi verificar a distribuição da resistência à 3 gerações das tetraciclinas, tetraciclina, doxiciclina, minoclina e com o foco principal no último composto desta classe desenvolvido, a tigeciclina. Em seguida, a análise da ocorrência de determinantes genéticos no ambiente e em amostras clínicas e seu potencial para disseminação através de plasmídios e elementos móveis. E por fim, sabe-se que os antibióticos desta classe são frequentemente evitados como opção terapêutica, pelo seu histórico de ineficácia no tratamento de infecções bacterianas devido à resistência a tetraciclinas, sendo assim, este estudo foi desenvolvido a fim de agrupar mais informações a respeito destas drogas, sua atividade contra as espécies selecionadas e a disseminação dos genes relacionados.

6.1. Resistência fenotípica a tetraciclinas

A tetraciclina é um antibiótico de amplo-espectro, pertencente à primeira geração desta classe e que após rápido e extenso uso na agricultura, na prática clínica humana e animal passou a ser evitado para uso em tratamentos de infecções bacterianas, uma vez que as bactérias tornaram-se resistentes. Desde então a síntese de novos compostos dentro deste grupo de antibióticos foi desenvolvida com o objetivo de superar os mecanismos de resistência bacteriana que surgiram para esta classe de antibióticos. Três dos principais compostos semi-sintéticos usados clinicamente são a doxiciclina e a minociclina, pertencentes à segunda geração; e a tigeciclina, que compõe a terceira geração das tetraciclinas (CHOPRA, 2001; ROBERTS, 2003; HAWKEY e FINCH, 2007; THAKER et al., 2010).

A resistência à primeira e segunda geração das tetraciclinas está disseminada tanto em amostras clínicas quando ambientais e a ocorrência desta resistência é causada pelos genes *tet* (CHOPRA et al., 1992; ACAR, 1997; BIGGS e FRATAMICO, 1999; LANCASTER et al., 2003; JACOBS e CHENIA, 2007; BAHRAMI et al., 2012; RATHER et al., 2012; RYSZ et al., 2013; SULLIVAN et al., 2013).

No presente estudo, a resistência foi primeiramente verificada à tetraciclina, à qual 106 (18,5%) das cepas deste estudo apresentaram-se não-sensíveis. De acordo com o CLSI, 2014, organismos sensíveis a tetraciclina são considerados sensíveis a doxiciclina e minociclina. Sendo assim, ao extrapolarmos os resultados a partir dos 572 isolados, observamos que 77 (13,5%) dos isolados foram resistentes à doxiciclina e 46 (8%) à minociclina. E considerando que cepas sensíveis a

tetraciclina são também sensíveis à tigeciclina, nenhum isolado apresentou-se resistente à tigeciclina. Demonstrando que a tigeciclina possuiu melhor ação frente aos organismos testados, seguida da minociclina e doxiciclina. Dados também observados através da interpretação dos valores de CIM_{50} e CIM_{90} (Concentração Inibitória Mínima para inibir o crescimento de 50% e 90% das células bacterianas) apresentados na Tabela 3. Na qual os valores de CIM para tigeciclina são os menores dentre os antibióticos testados, seguidos da minociclina, doxiciclina e por fim a tetraciclina; como também observado por SADER et al. em 2007 e ZHANG et al. em 2012.

A suscetibilidade de todos os isolados à tigeciclina, corrobora estudos nos quais os organismos apresentaram-se sensíveis a este antibiótico (GALES et al., 2005; ROSSI e ANDREAZZI, 2006; DENYS et al., 2011). No entanto, a resistência à tigeciclina vêm sendo reportada com mais frequência em isolados clínicos, como em um estudo realizado por VAN DUIN et al. (2014), o qual demonstrou a diminuição da suscetibilidade à tigeciclina em isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de KPC, após o início do tratamento com esta droga. DENG et al. (2014) encontraram cepas de *A. baumannii* resistentes à tigeciclina, nas quais foi detectada a presença *tet*X1, porém a resistência à tigeciclina foi atribuída à bomba de efluxo AdeABC. No Brasil, PEREIRA et al. (2014) verificaram a resistência à tigeciclina em 113 isolados de *K. pneumoniae* produtoras de KPC, das quais 43 (38,1%) apresentaram-se resistentes à tigeciclina.

No presente estudo nenhuma cepa clínica ou ambiental apresentou-se não-sensível à tigeciclina. Tais resultados podem ser consequência da falta de isolados

recentes neste estudo. Os isolados clínicos hospitalares datam de 2004 a 2005, e os isolados clínicos provenientes de fezes diarreicas datam de 2007. Enquanto que os isolados ambientais foram obtidos entre 1995 a 1996, e entre 2008 a 2009. Em um estudo realizado por BAHADOR et al. (2014) a resistência à tigeciclina foi verificada por um período de 5 anos em cepas de *A. baumannii*. Os autores observaram que enquanto todos os isolados apresentaram-se sensíveis à tigeciclina em 2006, cinco anos depois 6% dos isolados apresentaram-se resistentes.

Assim, podemos considerar que a resistência à tigeciclina é um evento relativamente recente quando comparada a outros antibióticos, e isto pode explicar a falta de cepas resistentes a esta droga nos isolados analisados neste estudo. Por isso, faz-se necessários mais investigações com relação à resistência à tigeciclina, especialmente sua detecção em cepas isoladas mais recentemente.

A partir dos resultados apresentados neste estudo foi possível observar que 48 (22,1%) dos 217 isolados clínicos; incluindo fezes diarreicas e amostras de pacientes de um hospital universitário; apresentaram-se resistentes à tetraciclina. Dos quais 22 (46%) incluíam *K. pneumoniae* e 26 (54%) incluíam *Escherichia coli*.

Ao separar as cepas por origem de isolamento e espécies foi observado que a espécie mais resistente à tetraciclina foi *E. coli,* seguida de *K. pneumoniae* e o gênero *Aeromonas*. Em isolados de *E. coli* de um hospital universitário, a resistência à tetraciclina foi de 100%. No entanto, foram analisados somente 5 isolados deste tipo de amostra para esta espécie e portanto, estudos adicionais com cepas hospitalares de *E. coli* são necessários para esclarecer o papel deste microrganismo na disseminação da resistência à tetraciclina. Nas amostras de fezes diarreicas a espécie *E. coli* foi a

única pesquisada e portanto não existem dados de outras espécies desta mesma amostra para comparação. No entanto, nas amostras de lodo e esgoto, dentre as espécies e o gênero estudados, *E. coli* foi a espécie com mais isolados resistentes à tetraciclina quando comparada aos outros dois microrganismos analisados neste estudo.

Em estudo realizado por LANCASTER et al. (2003), os autores detectaram 97,9% de cepas resistentes, em outro estudo desenvolvido por BOJESEN et al. (2011) 92% dos isolados eram resistentes à tetraciclina. GHADIRI et al. em 2012 reportaram porcentagens de 63,2% e 64,3% de cepas de *E. coli* e *K. pneumoniae* resistentes à tetraciclina, respectivamente. E ADEYANKINNU et al. (2014) constataram que 100% dos isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* apresentaram resistência à tetraciclina. Estes altos índices de resistência à tetraciclina diferem dos resultados observados no presente estudo, no qual 22,1% dos isolados clínicos foram resistentes à tetraciclina.

No entanto, SIKARWAR e BATRA em 2011 encontraram 60% dos isolados resistentes à tetraciclina, e através de uma análise estatística os autores consideraram a resistência de *Klebsiella pneumoniae* como moderada diante da tetraciclina. Em um outro estudo, realizado SANCHEZ et al. em 2013, os autores concluíram a partir de uma análise de resultados de sensibilidade datando de 1998 a 2010 que isolados de *K. pneumoniae* apresentaram um aumento relativamente menor na resistência à tetraciclina quando comparados aos outros antibióticos do estudo, indo de 14,2% a 16,7% em 2 anos. Enquanto a resistência a antibióticos como o aztreonam (7,7% a

22,2%), a ceftazidima (5,5% a 17,2%) e a ciprofloxacina (5,5% a 16,8%) aumentaram significantemente.

Sabe-se que o uso de antibióticos pode acelerar o desenvolvimento da resistência e da disseminação de genes associados a ela em microrganismos que representam um risco para a saúde humana e animal. Bactérias resistentes a inúmeros antibióticos foram encontradas em esgoto, estações de tratamento de esgoto, águas superficiais e até mesmo em água potável (ZHANG et al., 2009).

Com relação aos 355 isolados ambientais, incluindo águas superficiais e, esgoto e lodo, neste estudo foi verificado que 16,3% dos isolados foram não-sensíveis à tetraciclina, compreendendo 7,3% isolados de *Aeromonas* spp., 1,1% de *K. pneumoniae* e 7,6% de *E. coli*, índices considerados baixos quando comparados com a literatura. BRYAN et al. (2004) estudaram isolados não clínicos e encontraram 31% resistentes à tetraciclinas. Em um estudo realizado por TAO et al. (2010) com isolados de *E. coli* provenientes de rios, 16% foram resistentes à tetraciclinas. Estudos com isolados provenientes de amostras coletadas de estações de tratamento de água demonstram que os índices para resistência à tetraciclina tendem a ser mais elevados nestes tipos de amostras (REINTHALER et al., 2003; ZHANG et al., 2009). FERREIRA DA SILVA et al. (2007) encontraram em amostras de esgoto tratado 36,8% e 13% das cepas de *E. coli* e *K. pneumoniae* resistentes à tetraciclina, respectivamente. Enquanto LUCZKIEWICZ et al. (2010) observaram 23% dos isolados de *E. coli* provenientes de uma estação de tratamento de esgoto, resistentes à tetraciclinas.

As discrepâncias encontradas neste estudo em comparação a outras pesquisas realizadas podem ser explicadas pelo fato de que os índices de resistência bacteriana à tetraciclinas variam amplamente, podendo ser influenciados pela localização geográfica e ano de isolamento (CHOPRA e ROBERTS, 2001) ou mesmo porque a resistência à tetraciclinas no Brasil vem diminuindo gradativamente, assim como relatado em estudos que avaliaram dados de resistência à tetraciclinas em outros países (SIKARWAR e BATRA, 2011; SANCHEZ et al., 2013). No entanto estudos adicionais precisam ser realizados a nível nacional para corroborar com esta teoria.

A diminuição da resistência à tetraciclinas também pode estar diretamente ligada com a diminuição no uso de antibióticos desta classe. Uma vez que a resistência à tetraciclinas tornou-se alta após seu uso indiscriminado, estas drogas deixaram de ser opções terapêuticas confiáveis no tratamento de infecções, e é possível que gradativamente e no decorrer dos anos a resistência à tetraciclinas consequentemente também tenha diminuído.

6.2. Genes *tet* e determinação de seu ambiente genético

Sessenta por cento de todos os genes *tet* codificam proteínas relacionadas a bomba de efluxo, sendo este mecanismo de resistência o mais observado entre as bactérias Gram-negativas (PROJAN, 2000; ROBERTS, 2005), como pôde ser observado no presente estudo, no qual 5 genes de bomba de efluxo, *tet*(A), *tet*(B), *tet*(C), *tet*(D) e *tet*(E) foram detectados e nenhum gene para proteção ribossomal ou inativação enzimática foi observado nos isolados.

No presente estudo 8 (7,5%) isolados foram positivos para mais de um gene *tet*. Esta característica não é frequente, segundo CHOPRA e ROBERT, 2001, a

maioria dos isolados Gram-negativos resistentes a tetraciclinas carreiam apenas um tipo de gene *tet*, no entanto se o isolado estiver carregando mais de um plasmídio é possível encontrar genes *tet* diferentes em cada plasmídio. A pesquisa para a ocorrência de dois genes *tet* no mesmo elemento móvel foi conduzida e pôde-se verificar que os genes não estavam associados uns aos outros e não se encontravam na mesma estrutura móvel, permitindo inferir que os genes encontravam-se em diferentes plasmídios, ou um dos genes encontrava-se no cromossomo.

Na maioria das bactérias a resistência a tetraciclinas se dá devido à aquisição de novos genes, frequentemente associados com elementos genéticos móveis. Estes genes estão normalmente associados com plasmídios, integrons ou transposons (SCHNABEL e JONES, 1999; CHOPRA e ROBERTS, 2001; ROBERTS, 2005; PARTRIDGE, 2011). No presente estudo 4 diferentes elementos móveis e suas respectivas associações com o genes *tet* foram pesquisados. Os elementos genéticos móveis Tn*1721* e Tn*10* foram mais observados nos isolados ambientais, enquanto IS*26* aparenta estar mais associado à isolados clínicos. O elemento ISAS5 pesquisado em *Aeromonas* spp. não foi detectado.

Tn*1721* e IS*26* foram detectados nos três microrganismos pesquisados e Tn*10* não foi dectado em cepas de *Aeromonas* spp. A IS*26* foi o elemento genético móvel mais observado, ocorrendo em 84,6% dos isolados, uma explicação para esta alta disseminação é o fato da existência de muitas cópias deste elemento no genoma bacteriano, aumentando suas chances de transferência e consequentemente de disseminação entre as bactérias. Tn*1721* foi detectado em 51,6% dos isolados, e assim como a IS*26,* a transposição deste elemento se dá por cointegração, enquanto

que a transposição de Tn*10* se dá pelo mecanismo "corta e cola" e necessita de um especificidade no alvo de integração. É possível inferir que o mecanismo de integração também esteja relacionado à disseminação de elementos genéticos móveis, uma vez que que Tn*10* foi o elemento menos observado, estando presente em 29,7% dos isolados.

O "resistoma" dos antibióticos é a coleção de todos os genes que direta ou indiretamente contribuem para a resistência, tanto no ambiente quanto na clínica (PERRY e WRIGHT, 2013). Esta coleção de genes vem crescendo e sendo disseminada devido à capacidade de mobilização destes genes através de elementos móveis. A presença dos mesmos genes de resistência e elementos móveis em ambas as amostras clínicas e ambientais destaca uma das hipóteses mais discutidas no âmbito científico, a mobilização destes genes e elementos foi proveniente de cepas clínicas para o ambiente ou vice-versa? Estudos mostram que os genes de resistência já estavam presentes no ambiente muito antes do uso de antibióticos na prática clínica (DAVIES e DAVIES, 2010; D'COSTA et al., 2011). No entanto, estudos epidemiológicos adicionais são necessários com o objetivo de elucidar importantes lacunas presentes neste tópico específico de discussão.

Os genes de resistência a tetraciclinas são frequentemente associados a plasmídios conjugativos. Estudos demonstraram que os determinantes genéticos *tet* estão normalmente localizados em um elemento móvel ou potencialmente móvel, por exemplo *tet*(A) pode estar associado a Tn*1721* (ALLMEIER et al., 1992), *tet*(B) a Tn*10* (COLEMAN et al., 1983) e *tet*(D) pode estar flanqueado por cópias de IS*26* (KIM e AOKI, 1994; SCHNABEL e JONES, 1999).

***tet* (A)**

O gene *tet*(A) foi o segundo gene mais observado neste estudo, estando presente em 25,5% (27) dos isolados. As cepas carreadoras de *tet*(A) apresentaram-se, em sua maioria, não-sensíveis à doxiciclina, com exceção de 3 cepas de *Aeromonas* spp. e uma cepa de *E. coli* isoladas de amostras ambientais, as quais apresentaram-se sensíveis. Uma única cepa clínica de *E. coli* carreando *tet*(A) e *tet*(B) se apresentou resistente à minociclina, as demais cepas clínicas de *K. pneumoniae* e *E. coli* carreando *tet*(A) foram resistentes à doxiciclina. Somente dois isolados carreando *tet*(A) foram não-sensíveis à minociclina.

No presente estudo *tet*(A) foi mais detectado nos isolados ambientais, como observado na Figura 18, e sua ocorrência esteve mais associada aos isolados de *E. coli,* no entanto *tet*(A) foi também detectado nos outros microrganismos pesquisados.

Na literatura diversos trabalhos relatam a distribuição dos genes *tet*, não sendo encontrada nenhuma relação entre o tipo de amostra ou isolado bacteriano e a ocorrência de *tet*(A). TUCKMAN et al. (2007) demonstraram a ocorrência de *tet*(A) em cepas clínicas de *E. coli,* em que o gene foi o segundo mais observado, sendo observado em 26% dos isolados. OLOWE et al. (2013) observou que o gene *tet*(A) foi o mais detectado em cepas clínicas de *E. coli*, o mesmo foi observado por ZHANG et al. (2009), no entanto os isolados de enterobactérias eram provenientes de estações de tratamento de esgoto e SANDALLI e OZGUMUS (2010) relataram *tet*(A) como o gene de maior ocorrência em enterobactérias isoladas de um rio na Turquia. SULLIVAN et al. (2013) obtiveram o mesmo resultado, no entanto as amostras foram isoladas de uma bacia hidrográfica.

A análise dos resultados de estudos previamente publicados e o presente trabalho permite estabelecer que o gene *tet*(A) está disseminado em diversos tipos de amostras, tanto clínicas quanto ambientais, pode ser detectado em ambientes suscetíveis a diferentes influências tanto antrópicas quanto do próprio ambiente e está distribuído dentre diferentes espécies e gêneros bacterianos.

A disseminação deste gene é explicada pela sua frequente associação a plasmídios e elementos genéticos móveis como transposons. Corroborando com a literatura o gene *tet*(A) foi detectado associado com o transposon Tn*1721* (SCHNABEL e JONES, 1999; VIZVÁRYOVÁ e VALKOVÁ, 2004; PARTRIDGE, 2011; FYFE et al., 2013). Foi possível realizar com sucesso a transformação de 4 cepas carreadoras de *tet*(A), e de acordo com os grupos Inc, em 2 cepas o gene *tet*(A) estava presente no plasmídio FIB, em outra em plasmídio do grupo IncF e em uma das cepas não foi possível classificar o plasmídio através da técnica utilizada.

Em uma cepa de *E. coli* (n°71 - Quadro 14) isolada de fezes diarreicas após transformação através da eletroporação em uma *E. coli* DH10B^{TM}, apresentou resultados de CIM mais elevados quando comparados com a cepa selvagem. Estes resultados diferem daqueles detectados nas outras cepas transformadas neste estudo, as quais apresentaram valores de CIM menores do que nas cepas selvagens. Valores menores de CIM são frequentemente observados em cepas transformadas, devido à diminuição do número de cópias do plasmídio transferido para célula transformante. Aumento nos valores de CIM da célula transformada pode indicar a presença de um plasmídio de rápida replicação ou pode indicar que a expressão do gene ou a replicação do plasmídio na célula selvagem eram inibididos por algum sistema

regulador. No entanto, na literatura específica pesquisada não foram encontradas informações que corroborem com estas teorias.

***tet*(B)**

O gene *tet*(B) é o gene *tet* mais observado em diferentes espécies e gêneros Gram-negativos e já foi identificado em 25 gêneros diferentes (CHOPRA, 2001; ROBERTS, 2003; ROBERTS, 2005). No presente estudo ele foi identificado em 33% dos isolados. Cem porcento das cepas carreadoras deste gene foram resistentes à tetraciclina e à doxiciclina e 78,8% apresentaram-se não-sensíveis à minociclina. E de acordo com a literatura, uma das características do gene *tet*(B) é, além de conferir resistência à tetraciclina, também pode tornar a cepa resistente à doxiciclina e à minociclina (CHOPRA e ROBERTS, 2001; ROBERTS, 2003; VILACOBA et al., 2013).

No presente estudo *tet*(B) foi o gene mais observado em *E. coli* e quando analisado separadamente por tipos de amostras, *tet*(B) foi o gene mais detectado em amostras clinicas, juntamente com o gene *tet*(D), e foi o segundo gene mais observado nos isolados ambientais. Assim como *tet*(A), o gene *tet*(B) está amplamente distribuído em isolados clínicos e ambientais, no entanto não foi observado nas cepas de *Aeromonas* spp. estudadas (ROBERTS, 2005; TUCKMAN et al., 2007; NAWAZ et al., 2006; OLOWE et al., 2013).

A associação do gene *tet*(B) com o transposon Tn*10* certamente facilitou sua disseminação e perpetuação em isolados bacterianos. Como descrito na literatura, o presente trabalho também encontrou o gene *tet*(B) associado ao elemento Tn*10* (SCHNABEL e JONES, 1999; CHOPRA e ROBERTS, 2001; VIZVÁRYOVÁ e

VALKOVÁ, 2004; PARTRIDGE, 2011). Foi possível transformar com sucesso 3 cepas carreadoras de *tet*(B), duas delas apresentavam o gene localizado em um plasmídio do tipo F, enquanto na outra cepa o gene era carreado pelo plasmídio do tipo FIB (Quadro 14).

***tet*(C) e *tet*(D)**

De acordo com a literatura consultada, os genes *tet*(C) e *tet*(D) são incluídos com os demais genes *tet* na descrição de suas características e ocorrência. Ambos podem ser amplamente observados tanto em amostras clínicas como ambientais. No entanto, no presente trabalho foram detectados em menores porcentagens do que os demais genes pesquisados (CHOPRA e ROBERTS, 2001; BRYAN et al., 2004; TUCKMAN et al., 2007; MIRUKA et al., 2011; NAWAZ et al., 2012).

Apesar de estar disseminado tanto em amostras clínicas quanto ambientais, o gene *tet*(C) é detectado em menor frequência quando comparado à outros genes *tet*, no entanto os estudos que relatam a sua ocorrência reportam perfis de sensibilidade resistentes à tetraciclina (SCHMIDT et al., 2001; BRYAN et al., 2004; NAWAZ et al., 2006; TUCKMAN et al., 2007).

Corroborando os estudos que relatam menor frequência na detecção de genes *tet*(C) o presente estudo revelou a presença do gene *tet*(C) em 7 isolados, sendo observado em sua maioria concomitantemente a outro gene *tet*. No entanto, neste estudo os perfis de sensibilidade observados em cepas carreando *tet*(C) diferem dos demais estudos.

Em dois isolados de *Aeromonas* spp. o gene *tet*(C) foi detectado sozinho e ambos os isolados apresentaram perfis de sensibilidade intermediário, em outros dois

isolados carreando *tet*(C), o gene estava associado a *tet*(E), e em um destes isolados foi observada não-sensibilidade à tetraciclina. Em isolados clínicos de *K. pneumoniae* o gene *tet*(C) foi detectado em três cepas e em todas o gene *tet*(D) também foi detectado. As cepas carreando *tet*(C)/(D) apresentaram-se resistentes à tetraciclina, doxiciclina e monociclina.

Uma única cepa carreando *tet*(C) foi transformada com sucesso. Esta cepa carreava *tet*(C) e *tet*(E), e pertencia ao gênero *Aeromonas.* Após a transformação foi possível verificar que o transformante carreava apenas *tet*(C), permitindo associar este gene à resistência intermediária à tetraciclina detectada na cepa. Não foi possível classificar o plasmídio desta cepa através da técnica PBRT. Na literatura pesquisada o gene *tet*(C) foi detectado no gênero *Aeromonas* por NAWAZ et al. (2006), e L'ABEE-LUND e SORUM (2002) que encontraram o gene *tet*(C) presente em um plasmídio não conjugativo.

A partir dos resultados apresentados anteriormente é também possível inferir que o gene *tet*(C) não foi o responsável pelos perfis de sensibilidade de resistência nas cepas carreando ambos os genes *tet*(C) e *tet*(D).

No presente estudo o gene *tet*(D) foi observado somente em cepas clínicas de *K. pneumoniae* isoladas de um hospital universitário. Todas as cepas carreando este gene foram resistentes à tetraciclina, doxiciclina e minociclina, no entanto não foram detectados estudos prévios relatando elevado índice de resistência a estes antibióticos em cepas carreando *tet*(D). Pelo fato destas cepas serem hospitalares e ESBL positivas, a diminuição da sensibilidade a estes antibióticos pode ter sido causada por estes fatores (dados não apresentados). É também possível que o perfil de

sensibilidade resistente que o gene *tet*(D) conferiu às cepas de *K. pneumoniae* esteja associado à espécie carreadora deste gene, uma vez que uma cepa de *Morganella* spp. isolada de esgoto tratado e positiva para a presença de *tet*(D) apresentou resistência somente à tetraciclina (dados não apresentados).

Uma cepa carreando o gene *tet*(D) foi transformada e após análise verificou-se que o plasmídio carreando o gene foi tipado como pertencente ao grupo Inc A/C. Todas as cepas de *K. pneumoniae* isoladas do hospital universitário carreavam o mesmo tipo de plasmídio e todas foram positivas para *tet*(D), por isso é possível inferir que o gene estava sendo disseminado por este plasmídio dentro do ambiente hospitalar na época de coleta das amostras.

Ambos os genes *tet*(C) e *tet*(D) foram observados associados ao elementos IS*26*. Porém nas cepas em que foram detectados concomitantemente não houve associação dos genes e ambos foram detectados em arranjos de sequências de DNA diferentes associados a IS*26* e específicos para cada um, estes dados podem ser explicados pelo fato de que a IS*26* se apresenta em um alto número de cópias em um mesmo genoma e pelo fato de ser um elemento que flanqueia diversos transposons compostos. A associação de *tet*(D) a IS*26* é relatada com mais frequência do que a associação de *tet*(C) a IS*26* (ALLARD et al., 1993; SCHNABEL e JONES, 1999)

***tet*(E)**

Os genes *tet*(A) a *tet*(E), *tet*(G) a *tet*(J), *tet*(Y), tet(30) e *tet*(31) são observados exclusivamente em bactérias Gram-negativas e embora tivessem sido descritos primeiramente em enterobactérias, atualmente são observados em diversos

gêneros e espécies fora deste grupo (CHOPRA, 2001), como é o caso do gênero *Aeromonas*.

Segundo NAWAZ et al. (2006) e BALASSIANO et al. (2007) os genes mais comumente detectados no gênero *Aeromonas* spp. são *tet*(A) e *tet*(E), corroborando o presente estudo, no qual os genes observados em *Aeromonas* spp. foram *tet*(A), *tet*(C), *tet*(C)/(E), *tet*(A)/(E) e *tet*(E). JACOBS e CHENIA (2007) e HAN et al. (2012) detectaram que os genes *tet*(A) e (E) foram prevalentes em cepas de *Aeromonas* spp., enquanto RHODES et al. (2000) e KIM et al. (2011) observaram que *tet*(A) foi mais detectado em isolados de *Aeromonas.* Em outro estudo SCHMIDT et al. (2001) observaram que *tet*(E) foi o gene *tet* predominante entre as cepas de *Aeromonas* spp.

O gene *tet*(E) não foi associado a nenhum dos elementos genéticos móveis pesquisados neste estudo e também foi somente observado em amostras ambientais. A literatura aponta para o fato de que *tet*(E) difere de *tet*(A), (B), (C) e (D) pois está provavelmente associado a plasmídios não conjugativos e também há relatos da sua ocorrência no cromossomo (LEE et al., 1993; CHOPRA e ROBERTS, 2001). Isto pode explicar a distribuição e predominância limitada de *tet*(E) (ANDERSEN e SANDAA, 1994), e o fato deste gene ter sido observado apenas em uma cepa de *E. coli* além do gênero *Aeromonas*.

A maioria das cepas de *Aeromonas* apresentaram resistência intermediária à tetraciclina independente dos genes *tet* detectados. Na literatura pesquisada nenhum dos estudos sugeriu a ocorrência de perfil de sensibilidade intermediário em cepas carreando *tet*(E), *tet*(C) ou *tet*(A). No entanto, se *tet*(E) pode estar localizado no

cromossomo é possível inferir que a expressão destes genes se comporte como a expressão dos genes *cepH*, *cphA* e *ampH* também detectados no cromossomo de bactérias do gênero *Aeromonas* e cuja expressão acontece de maneira induzida, já que também foi observado um perfil de sensibiblidade intermediário na cepa de *E. coli* carreando *tet*(E).

6.3. Integrons

No presente estudo não foram encontradas associações entre os genes *tet* ou os elementos genéticos móveis (sequências de inserção e transposons) com os integrons pesquisados. Na literatura a maioria dos estudos faz uma inferência a respeito da relação dos genes *tet* aos integrons, porém sem a apresentação de resultados associando os genes aos integrons (SCHMIDT et al., 2001; RANDALL et al., 2004; AGERSO e SANDVAND, 2005; REZAEE et al., 2012). No entanto, em um estudo conduzido por SCHNABEL e JONES (1999), observou-se a ocorrência do integron de classe 1 associado a Tn*1404* no qual *tet*(C) estava inserido flanqueado por duas sequências de IS*26.*

As classes 1 e 2 de integrons essão normalmente associadas à cassetes genéticos de resistência antimicrobiana e apesar da associação dos genes *tet* e integrons não ter sido encontrada neste estudo, 63 isolados foram positivos para integrases, divididos em 55 positivos para Int1 e 8 positivos para Int2. Ambas as integrases foram encontradas em isolados clínicos e ambientais, destacando para sua disseminação em diferentes tipos de amostras.

Os integrons de classe 1 são considerados a classe de integrons mais comum e mais disseminada, especialmente em isolados clínicos, como demonstrado neste

estudo onde sua presença foi observada em 28 isolados provenientes de amostras hospitalares e de fezes diarreicas. São também considerados um dos principais veículos de disseminação da resistência à antibióticos (DOMINGUES et al., 2012).

Integrons de classe 2 estão também mais comumente associados a isolados clínicos, assim como foi detectado no presente estudo, tendo sua ocorrência em 6 isolados clínicos e 2 ambientais, no entanto informações sobre a epidemiologia desta classe não está claramente estabelecida e ainda é escassa quando comparadas à estudos sobre integrons de classe 1. No Brasil, PEIRANO et al. (2006) relataram a presença de integron de classe 2 em um isolado de *Salmonella enterica* e SÁ et al. (2010) encontraram uma cepa ambiental de *Vibrio cholerae* carreando o integron de classe 2.

Apesar dos elementos genéticos móveis, denominados integrons, serem de extrema importância para a mobilidade e disseminação dos genes e resistência, no presente estudo os genes de resistência *tet* provaram estar associados a transposons e sequências de inserção, sendo portanto, estes os mecanismos responsáveis pela disseminação dos genes *tet* nas cepas e amostras estudadas.

6.4. Grupos Inc

Diversos estudos indicam que à resistência a tetraciclina é codificada pelos genes *tet* que por sua vez estão localizados em plasmídios (CHOPRA e ROBERTS, 2001; NAWAZ, 2006; THAKER, 2010). De acordo com as informações levantadas com relação à localização dos genes *tet*, estudos relatam que genes *tet* codificadores de proteínas relacionadas a bomba de efluxo são detectados em transposons inseridos

em plasmídios de uma variedade de grupos de incompatibilidade (CHOPRA e ROBERTS, 2001).

Com base nos resultados dos perfis genéticos dos isolados obtidos através das técnicas ERIC-PCR e PFGE, é possível sugerir que os genes *tet* observados em isolados com perfis genéticos distintos foram provavelmente disseminados através da transferência horizontal.

Não foram observados na literatura pesquisada relatos de grupos Inc de plasmídios específicos associados a genes *tet*, no entanto neste estudo a detecção dos grupos Inc associados aos genes *tet* pode contribuir para maiores informações a respeito da mobilidade genética destes genes.

O grupo IncF possui diversos subgrupos como IncFIB e IncFIA, são plasmidios comumente detectados na microbiota fecal de animais e humanos, e se apresentam em baixas cópias. Os plasmídios deste grupo podem variar em tamanho, sendo de aproximadamente 50 a 200kb. IncF foi também relacionado a transposons do tipo Tn*3*, família de transposon à qual Tn*1721* pertence. Neste estudo a associação deste transposon carreando *tet*(A) foi encontrada em um plasmídio do grupo IncF. A ocorrência de Tn*3* é conhecida por conferir imunidade de transposição, ou seja, um plasmídio contendo uma cópia deste transposon não terá outro Tn*3* inserido em sua sequência. Alguns autores sugerem que as diferenças na distribuição de genes de resistência é causada pela imunidade de transposição conferida por Tn*3* (CARATOLLI, 2009).

IncA/C é um dos grupos de maior ocorrência em enterobactérias, sendo detectados em diversos países e em bactérias de diferentes origens (CARATOLLI,

2009). Porém, isso difere dos resultados observados no presente trabalho, no qual plasmídios do grupo A/C foram recuperados somente de amostras clínicas e, exceto por uma cepa de *E. coli,* estes plasmídios foram observados apenas em *K. pneumoniae.* Baseando-se em informações de estudos prévios realizados no laboratório, é possível inferir que esta alta porcentagem de plasmidios do grupo IncA/C em isolados de *K. pneumoniae* provenientes de amostras de um hospital universitário está provavelmente relacionada ao fato de que o hospital abrigava um surto de bactérias ESBL positivas que em sua maioria carreavam plasmídios do grupo IncA/C.

A elevada quantidade (96,3%) de isolados de *Aeromonas* spp. negativos para o PBRT pode ser explicada pelo fato desta técnica ter sido desenvolvida para tipagem de plasmídios de enterobactérias e neste estudo esta técnica foi utilizada na tentativa de tipar plasmídios do gênero *Aeromonas*, encontrando 26 isolados negativos e 1 positivo para o grupo IncP. A ocorrência do grupo IncP em *Aeromonas* spp. é aparentemente o primeiro relato da presença deste grupo de incompatilibildade neste gênero bacteriano. Estudos realizados na França, na Suíça e na Alemanha recuperaram plasmídios dos grupos IncU e IncQ associados à resistência a quinolonas em cepas de *Aeromonas* (BONEMANN et al., 2006; CATTOIR et al., 2008; PICÃO et al., 2008).

Estudos mostram que os plasmídios do grupo IncP podem ser detectados em uma variedade de espécies e gêneros bacterianos e podem estar associados aos genes de resistência bla_{IMP} que conferem resistência a carbapenens, aos quais bactérias do gênero *Aeromonas* demonstraram resistência que é frequentemente atribuída ao gene intrínseco *cphA* (TALAVERA et al., 2006; BALSALOBRE et al., 2009; CHEN et

al., 2012). Devido ao aumento crescente de informações destacando sobre a importância do gênero *Aeromonas,* mais estudos se fazem necessários a fim de contribuir para o melhor conhecimento do papel deste gênero no panorama da resistência bacteriana.

6.5. Limitações do estudo

O presente estudo não teve como objetivo realizar uma análise epidemiológica da distribuição de isolados resistentes ou de determinantes genéticos, pois o número de isolados para cada tipo de amostra foi muito variável, além de não terem sido coletados de forma que pudessem ser relacionados temporalmente.

Os mecanismos de resistência à tigeciclina são normalmente diferentes dos mecanismos existentes para a resistência à tetraciclinas de outras gerações. No entanto, a resistência à tigeciclina ainda representa um cenário novo para médicos e microbiologistas, por isso os mesmos mecanismos de resistência foram pesquisados para todas as gerações das tetraciclinas, na tentativa de contribuir com mais informações sobre o papel destes determinantes na resistência à tigeciclina.

A técnica de transformação utilizada para verificar a localização dos genes *tet* somente nos permitiu verificar se o gene estava presente nos plasmídios transformados. Na transformação mais de um plasmídio pode ser transferido para a célula transformante, o que impede afirmar qual o tamanho do plasmídio carreando o gene pesquisado, por isso também a técnica de digestão com a enzima S1 e a corrida de eletroforese em campo pulsado necessita de aperfeiçoamento, pois plasmídios pouco concentrados ou abaixo de 48kb podem não ser visualizados no gel e o resultado torna-se pouco confiável.

6.6. Considerações Finais

Microbiologistas, especialistas em doenças infecciosas, epidemiologistas e profissionais de Saúde Pública muitas vezes estão passos atrás da resistência bacteriana. Outras vezes, somos alarmados pelo surgimento de eventos da resistência bacteriana que não evoluem após o primeiro alarme. E é este panorama que temos enfrentado frequentemente.

Paralela à ideia de pesquisar a resistência à tigeciclina em diferentes amostras de variados microrganismos isolados, também surgiu a ideia de verificar se realmente os antibióticos da classe das tetraciclinas, como a doxiciclina e a minociclina; há tanto tempo evitados no tratamentos de doenças infecciosas em humanos, ainda mostrariam uma alta porcentagem de resistência em microrganismos ambientais e clínicos.

Trabalhando com o total de 572 isolados e obtendo 106 isolados resistentes, acredito ser importante direcionar novamente a atenção aos antibióticos da classe das tetraciclinas. Uma vez que outros antibióticos afastados do uso clínico e veterinário, com a polimixina B e a colistina estão sendo considerados como opções terapêuticas nos casos em que isolados multirresistentes tornaram obsoletos a maioria dos antibióticos. No entanto, ao considerar um antibiótico para tratamento é também importante avaliar a forma de apresentação da droga, uma vez que no Brasil a minociclina, por exemplo, existe somente na forma de apresentação oral, e portanto o tratamento de infecções graves não seria possível com esta forma de apresentação da droga.

O presente estudo também confirmou que a dispersão dos genes que conferem resistência à tetraciclina é feita através de elementos genéticos móveis previamente citados pela literatura específica. Estes elementos associados a diversos plasmídios, com características diferentes, são provavelmente responsáveis pela movimentação dos genes *tet* e consequentemente pela ocorrência dos mesmos em diferentes amostras e espécies bacterianas.

As bactérias se utilizam de mecanismos de resistência próprios ou adquiridos. Os mecanismos adquiridos surgem normalmente de mutações, transferência genética ou transformação, transposons, integrons e bacteriófagos. Por todos estes fatores se faz necessário determinar as classes e fenótipos da resistência bacteriana e as mutações e elementos móveis associados a esta resistência, a fim de contribuir para um melhor entendimento dos mecanismos de resistência, disseminação, contexto genético, entre outras informações, assim nos permitindo desenvolver técnicas mais rápidas para triagem e detecção dessa resistência e estratégias de controle necessárias na tentativa de reduzir a disseminação de bactérias resistentes.

Com relação ao gênero *Aeromonas* alguns aspectos interessantes foram detectados neste trabalho, o gene *tet*(E) detectado somente neste gênero; exceto por uma ocorrência em um isolado de *E. coli;* demonstrou resistência intermediária aos antibióticos da classe. Nenhum dos elementos móveis pesquisados foi encontrado relacionado a este gene e quando detectado em *E. coli* expressou-se da mesma maneira. Os genes *tet*(A) e *tet*(C) também foram observados em cepas de *Aeromonas* neste trabalho, e mostraram perfis de sensibilidade intermediário, enquanto que quando detectados em outras espécies do estudo, os isolados eram em sua maioria

não-sensíveis às tetraciclinas. Estudos adicionais são necessários com o gênero *Aeromonas* e os genes *tet* observados nestes microrganismos, destacando para o papel que esta relação desempenha, em especial, com o meio ambiente.

O gene *tet*(D) foi observado neste estudo exclusivamente em cepas de *K. pneumoniae* isoladas de um hospital universitário e as cepas carreadoras deste gene demonstraram maior resistência à doxiciclina e minociclina. Os isolados utilizados neste estudo são provenientes de estudos prévios, datando de 2004 a 2005, no entanto estas cepas participaram de diversos estudos ao longo dos anos, estando bem caracterizadas. A decisão de incluir estas cepas no estudo foi com o intuito de possivelmente encontrar cepas resistentes à tigeciclina, no entanto ao contrário do esperado, a partir de 100 cepas estudas, 27 foram resistentes à tetraciclina e nenhuma resistente à tigeciclina, destacando então para a maior atenção que deve ser dada a esta classe de antibióticos.

A importante mudança na visão dos pesquisadores em expandir seus objetos de pesquisa para amostras ambientais mudou radicalmente a maneira como interpretamos a resistência bacteriana. A dispersão dos genes de resistência nas amostras hospitalares, nas fezes diarreicas coletadas no município de Itapevi, em uma amostra de água superficial e em amostras de lodo e esgoto destaca mais uma vez para a relação que existe, e que provavelmente sempre existiu, entre o ambiente e a clínica. Estudos epidemiológicos são de extrema importância e podem contribuir com informações importantes para inúmeras questões neste âmbito.

Durante o levantamento bibliográfico foi possível observar que inúmeros estudos confirmam a existência de um reservatório de genes de resistência no

ambiente e é também discutido o fato de existir uma maior diversidade de genes em bactérias autóctones e em bactérias patogênicas encontradas no ambiente do que em patógenos clínicos, reforçando a importância de estudos com amostras ambientais.

Sabe-se que o uso indiscriminado das tetraciclinas na agricultura, pecuária e na clínica desencadeou a resistência acelerada e agressiva a estes antibióticos. Portanto, o monitoramento do uso e consumo de antibióticos em animais deve ser reforçado e aderido por fazendeiros, produtores, veterinários e industrias farmacêuticas.

Por meio dos resultados observados neste estudo, espero destacar para a importância da obtenção de mais informações sobre o panorama da resistência bacteriana à antibióticos previamente evitados no uso clínico. Espero ter gerado questionamentos suficientes, capazes de dar início a novos projetos, e espero ter gerado informações úteis que se encaixem na visão da OMS, contribuindo para traçar um caminho mais preparado frente à resistência bacteriana e seus afeitos sobre a saúde humana.

7. CONCLUSÕES

- Nenhum dos isolados resistentes à tetraciclina apresentaram-se resistentes à tigeciclina. Sugerindo que os mecanismos comumente relacionados à resistência a tetraciclinas de primeira e segunda geração, não estão associados à resistência à tigeciclina;
- Dentre os 572 isolados estudados, 18,5% foram resistentes à tetraciclina. O que demonstra uma baixa porcentagem de resistência a este antibiótico, quando comparada a outros estudos;
- Verificou-se que a tigeciclina, seguida da minociclina foram as tetraciclinas mais ativas frente aos microrganismos testados;
- Os isolados clínicos apresentaram-se mais resistentes à tetraciclinas, quando comparados aos isolados ambientais;
- Os genes *tet*(A) e *tet*(B) foram os mais prevalentes nos isolados pesquisados;
- Todas as cepas carreando o gene *tet*(B) isolado foram resistentes à doxiciclina e não-sensíveis à minociclina;
- Todas as cepas carreando o gene *tet*(D), isolado ou em combinação, apresentaram resistência à doxiciclina e minociclina;
- A maioria das cepas carreando o gene *tet*(E) apresentaram perfil de sensibiblidade intermediário à tetraciclina;
- Os resultados de transformação associados às informações encontradas na literatura sugerem que o gene *tet*(E) estava localizado no cromossomo;

- A ausência da associação do gene *tet*(E) aos elementos genéticos móveis pesquisados, indicam que este gene não foi disseminado por nenhum destes elementos nos isolados estudados;
- A disseminação dos genes *tet*(A), (B), (C), (D) nos isolados estudados foi possivelmente facilitada pela associação destes genes aos elementos genéticos móveis Tn*1721,* Tn*10* e IS*26*;
- Plasmídios dos grupos de incompatibilidade IncF, IncFIB e IncA/C, os quais possuem características de disseminação de genes de resistência, foram os mais observados neste estudo;
- Os resultados da determinação dos perfis de similaridade genética sugerem a possibilidade de disseminação de genes *tet* através da transferência horizontal;
- A ausência de integrons carreando os genes *tet* investigados neste estudo, demonstra que a disseminação destes genes nos isolados estudados não estava relacionada a estes elementos genéticos;
- Presença do grupo de incompatibilidade, IncP, no gênero *Aeromonas*, demonstrando a característica deste gênero em adquirir plasmídios relacionados à resistência bacteriana;
- Estudos com isolados mais recentes e abrangendo outros gêneros e espécies bacterianos devem ser conduzidos para contribuírem na compreensão do perfil de sensibilidade bacteriano frente às tetraciclinas, adquirindo informações importantes sobre o uso destes antibióticos como opções terapêuticas na medicina clínica e veterinária.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Acar JF. Consequences of bacterial resistance to antibiotics in medical practice. Clin. Infect. Dis. 1997; 24:S17–S18.

2. Adeyankinnu FA, Motayo BO, Akinduti A, Akinbo J, Ogiogwa JI, Aboderin BW, Agunlejika RA. Multicenter Study of Beta-Lactamase Resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Reveals High Level Chromosome Mediated Extended Spectrum β Lactamase Resistance in Ogun State, Nigeria. Interdiscip Perspect Infect Dis. 2014; 2014:819896.

3. Agersø Y, Sandvang D. Class 1 integrons and tetracycline resistance genes in alcaligenes, arthrobacter, and *Pseudomonas* spp. isolated from pigsties and manured soil. Appl Environ Microbiol. 2005;71(12):7941-7.

4. Agersø Y, Bruun MS, Dalsgaard I, Larsen JL. The tetracycline resistance gene *tet*(E) is frequently occurring and present on large horizontally transferable plasmids in *Aeromonas* spp. from fish farms. Aquaculture. 2007; 266:47–52.

5. Akortha EE, Egbule OS. Transfer of tetracycline resistance gene (*tet*^{r}) between replicons in some enteric bacteria of diarrhoeal origin from some hospitals in South-South, Nigeria. African Journal of Biotechnology. 2008; 7(18): 3178–3181.

6. Allard JD, Gibson ML, Vu LH, Nguyen TT, Bertrand KP. Nucleotide sequence of class D tetracycline resistance genes from *Salmonella ordonez*. Mol Gen Genet. 1993; 237:301–305.

7. Allen HK, Donato J, Wang HH, Cloud-Hansen KA, Davies J, Handelsman J. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. Nat Rev Microbiol. 2010;8(4):251-9.

8. Allmeier H, Cresnar B, Greck M, Schmitt R. Complete nucleotide sequence of Tn*1721* - gene organization and a novel gene-product with features of a chemotaxis protein. Gene. 1992; 111:11–20.

9. Altenbuchner J, Schmid K, Schmitt R. Tn*1721*-encoded tetracycline resistance: mapping of structural and regulatory genes mediating resistance. J Bacteriol. 1983;153(1):116-23.

10. Aminov RI, Garrigues-Jeanjean N, Mackie RI. Molecular ecology of tetracycline resistance: development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins. Appl Environ Microbiol. 2001; 67(1):22-32.

11. Aminov RI, Chee-Sanford JC, Garrigues N, Teferedegne B, Krapac IJ, White BA, Mackie RI. Development, validation, and application of PCR primers for

detection of tetracycline efflux genes of gram-negative bacteria. Appl Environ Microbiol. 2002; 68(4):1786-93.

12. Ammor MS, Gueimonde M, Danielsen M, Zagorec M, van Hoek AH, de Los Reyes-Gavilán CG, Mayo B, Margolles A. Two different tetracycline resistance mechanisms, plasmid-carried *tet*(L) and chromosomally located transposon-associated *tet*(M), coexist in *Lactobacillus sakei* Rits 9. Appl Environ Microbiol. 2008; 74(5):1394-401.

13. Andam CP, Fournier GP, Gogarten JP. Multilevel populations and the evolution of antibiotic resistance through horizontal gene transfer. FEMS Microbiol Rev. 2011;35:756–67.

14. Andersen SR, Sandaa RA. Distribution of tetracycline resistance determinants among gram-negative bacteria isolated from polluted and unpolluted marine sediments. Appl Environ Microbiol. 1994;60(3):908-12.

15. Andersson DI, Hughes D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? Nat Rev Microbiol. 2010;8(4):260-71.

16. Ansari MI, Malik A. Genotoxicity of agricultural soils in the vicinity of industrial area. Mutat Res 2009; 673:124-132.

17. Auerbach EA, Seyfried EE, McMahon KD. Tetracycline resistance genes in activated sludge wastewater treatment plants. Water Res. 2007 Mar;41(5):1143-51. Epub 2007 Jan 19.

18. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. Short protocols in Molecular Biology 1995. John Wiley & Sons, USA.

19. Bahrami F, Morris DL, Pourgholami MH. Tetracyclines: drugs with huge therapeutic potential. Mini Rev Med Chem. 2012;12(1):44-52.

20. Balassiano IT, Bastos MD, Madureira DJ, Silva IG, Freitas-Almeida AC, Oliveira SS. The involvement of tetA and tetE tetracycline resistance genes in plasmid and chromosomal resistance of *Aeromonas* in Brazilian strains. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007; 102(7):861-6.

21. Balsalobre LC, Dropa M, Lincopan N, Mamizuka EM, Matté GR, Matté MH. Detection of metallo-beta-lactamases-encoding genes in environmental isolates of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas jandaei*. Lett Appl Microbiol. 2009; Jul;49(1):142-5.

22. Balsalobre LC, Dropa M, de Oliveira DE, Lincopan N, Mamizuka EM, Matté GR, Matté MH. Presence of *bla*tem-116 gene in environmental isolates of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas jandaei* from Brazil. Braz J Microbiol.; 2010; 41(3):718-719.

23. Balsalobre, LC, Dropa, M and Matté, MH An overview of antimicrobial resistance and its public health significance. Braz J Microbiol.; 2014, 45, (1): 1-6.

24. Bao W, Jurka MG, Kapitonov VV, Jurka J. New superfamilies of eukaryotic DNA transposons and their internal divisions. Mol Biol Evol. 2009; 26: 983-993.

25. Baquero F, Martínez JL, Cantón R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. Curr Opin Biotechnol 2008; 19:260-265.

26. Barton BM, Harding GP, Zuccarelli AJ. A general method for detecting and sizing large plasmids. Genimics 1995; 29(3):690-697.

27. Barbosa TM, Levy SB. The impact of antibiotic use on resistance development and persistence. Drug Resist Updat. 2000; 3(5):303-311.

28. Blázquez J, Couce A, Rodríguez-Beltrán J, Rodríguez-Rojas A. Antimicrobials as promoters of genetic variation. Curr Opin Microbiol. 2012;15(5):561-9.

29. Bennett JW, Chung KT. Alexander Fleming and the discovery of penicillin. Adv Appl Microbiol. 2001;49:163-84.

30. Biggs CE Fratamico PM. Molecular characterization of an antibiotic resistance gene cluster of *Salmonella typhimurium* DT104. Antimicrob. Agents Chemother. 1999; 43:846–849.

31. Bojesen AM, Vazquez ME, Bager RJ, Ifrah D, Gonzalez C, Aarestrup FM. Antimicrobial susceptibility and tetracycline resistance determinant genotyping of Gallibacterium anatis. Vet Microbiol. 2011; 148(1):105-10.

32. Bonelli RR, Moreira BM, Picão RC. Antimicrobial resistance among *Enterobacteriace* in South America: History, current dissemination status and associated socioeconomic factors. Drug Resist Updat. 2014 (In press).

33. Bonemann G, Stiens M, Puhler A, Schluter A. Mobilizable IncQ-related plasmid carrying a new quinolone resistance gene, qnrS2, isolated from the bacterial community of a wastewater treatment plant. Antimicrob Agents Chemother. 2006; 50:3075–3080.

34. Bryan A, Shapir N, Sadowsky MJ. Frequency and distribution of tetracycline resistance genes in genetically diverse, nonselected, and nonclinical *Escherichia coli* strains isolated from diverse human and animal sources. Appl Environ Microbiol. 2004;70(4):2503-7.

35. Burrus V, Pavlovic G, Decaris B, Guédon G. Conjugative transposon: the tip of the iceberg. Mol Microb. 2002; 46(3):601-610.

36. Bush K. Why it is important to continue antibacterial drug discovery. ASM News. 2004; 70: 282–287.

37. Cambray G, Guerout AM, Mazel D. Integrons. Annu Rev Genet. 2010; 44:141-66.

38. Cantón R, Morosini MI.Emergence and spread of antibiotic resistance following exposure to antibiotics. FEMS Microbiol Rev. 2011;35(5):977-91.

39. Carattoli A. Resistance Plasmid Families in *Enterobacteriaceae*. Antimicrob Agents Chemother 2009; 53(6):2227-2238.

40. Carattoli A, Bertini A, Villa L et al. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. J Microbiol Methods 2005; 63: 219-228.

41. Carattoli A. Plasmids and the spread of resistance. Int J Med Microbiol. 2013;303(6-7):298-304.

42. Cattoir V, Poirel L, Aubert C, Soussy CJ, Nordmann P. Unexpected occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in environmental *Aeromonas* spp. Emerg Infect. 2008; Dis. 14:231–237.

43. Chalmers R, Sewitz S, Lipkow K, Crellin P Complete nucleotide sequence of Tn*10*. J Bacteriol. 2000; 182(10):2970-2.

44. Chee-Sanford JC, Aminov RI, Krapac IJ, Garrigues-Jeanjean N, Mackie RI. Occurrence and diversity of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater underlying two swine production facilities. Appl Environ Microb. 2001;67:1494–02.

45. Chen PL, Ko WC, Wu CJ. Complexity of β-lactamases among clinical *Aeromonas* isolates and its clinical implications. J Microbiol Immunol Infect. 2012;45(6):398-403.

46. Cheng J, Guffanti AA, Krulwich TA. The chromosomal tetracycline resistance locus of *Bacillus subtilis* encodes a Na+/H+ antiporter that is physiologically important at elevated pH. J Biol Chem. 1994; 269(44):27365-71.

47. Chopra I. Glycylcyclines: third-generation tetracycline antibiotics. Curr Opin Pharmacol. 2001;1(5):464-9.

48. Chopra I. New developments in tetracycline antibiotics: glycylcyclines and tetracycline efflux pump inhibitors. Drug Resist Updat. 2002; 5(3-4):119-25.

49. Chopra I, Hawkey PM, Hinton M. Tetracyclines, molecular and clinical aspects. J Antimicrob Chemother. 1992;29(3):245-77.

50. Chopra AK, Houston CW. Enterotoxins in *Aeromonas*-associated gastroenteritis. Microbes Infect. 1999;1(13):1129-1137.

51. Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. Microbiol Mol Biol Rev. 2001; 65(2):232-60.

52. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria; Aproved Guideline – Second Edition. CLSI Publication M45-A2, Vol. 30, No. 18. Wayne, PA: CLSI; 2010.

53. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard. CLSI Publication M02-A11, Vol. 32, No. 1. Wayne, PA: CLSI; 2012.

54. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty Second Informational Supplement. CLSI Publication M100-S24, Vol. 34, No. 1. Wayne, PA: CLSI; 2014.

55. Coculescu BI. Antimicrobial resistance induced by genetic changes. J Med Life. 2009; 2(2):114-23. Review.

56. Coleman DC, Chopra I, Shales SW, Howe TG, Foster TJ. Analysis of tetracycline resistance encoded by transposon Tn10: deletion mapping of tetracycline-sensitive point mutations and identification of two structural genes. J. Bacteriol. 1983; 153:921–929.

57. Cunha BA. New uses for older antibiotics: nitrofurantoin, amikacin, colistin, polymyxin B, doxycycline, and minocycline revisited. Med Clin N Am. 2006; 90(6):1089-1107.

58. Davies J and Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. Microbiol Mol Biol Rev. 2010; 74(3):417.

59. D'Costa VM, King CE, Kalan L, Morar M, Sung WW, Schwarz C, Froese D, Zazula G, Calmels F, Debruyne R, Golding GB, Poinar HN, Wright GD. Antibiotic resistance is ancient. Nature. 2011;477(7365):457-61.

60. Deng M, Zhu MH, Li JJ, Bi S, Sheng ZK, Hu FS, Zhang JJ, Chen W, Xue XW, Sheng JF, Li LJ. Molecular epidemiology and mechanisms of tigecycline resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from a Chinese university hospital. Antimicrob Agents Chemother. 2014 Jan;58(1):297-303.

61. Denys GA, Callister SM, Dowzicky MJ. Antimicrobial susceptibility among gram-negative isolates collected in the USA between 2005 and 2011 as part of the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial (T.E.S.T.). Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2013; 5:12-24.

62. Dillon JA, Rubabaza JPA, Benzaken AS, et al. Reduced susceptibility to Azithromicyn and high percentages of Penicillin and Tetracycline Resistence

in Neisseria gonorrhoeae isolates from Manaus, Brazil, 1998. Sex Transm Dis. 2001; 28 (9):521-526.

63. Domingues S, Harms K, Fricke WF, Johnsen PJ, Da Silva G J, Nielsen KM. Natural transformation facilitates transfer of transposons, integrons and gene cassettes between bacterial species. PLoS Pathog. 2012; 8(8): e1002837.

64. Domingues S, da Silva GJ, Nielsen KM. Integrons: Vehicles and pathways for horizontal dissemination in bacteria. Mob Genet Elements. 2012 Sep 1;2(5):211-223.

65. Dong YH, Wang LY, Zhang LH. Quorum-quenching microbial infections: mechanisms and implications. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2007; Jul 29;362(1483):1201-11.

66. Doublet B, Praud K, Bertrand S, Collard JM, Weill FX, Cloeckaert A.Novel insertion sequence- and transposon-mediated genetic rearrangements in genomic island SGI1 of Salmonella enterica serovar Kentucky. Antimicrob Agents Chemother. 2008;52(10):3745-54.

67. Dropa M. Estudo de espécies da Família *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL causadoras de infecção hospitalar, através de métodos moleculares [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2006.

68. Dropa M. Disseminação da resistência a antimicrobianos em cepas clínicas e ambientais de *Enterobacteriaceae*: identificação e mapeamento do ambiente genético de genes codificadores de ESBL [tese de doutorado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2014.

69. Dropa M, Balsalobre LC, Lincopan N, Mamizuka EM, Cassettari VC, Matté GR, Matté MH. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carrying the novel extended-spectrum beta-lactamase gene variants *bla(*SHV-40), *bla*(TEM-116) and the class 1 integron-associated *bla*(GES-7) in Brazil. Clin Microbiol Infect. 2009 Aug 18. [Epub ahead of print].

70. Edgar T, Boyd SD, Palamé MJ. Sustainability for behaviour change in the fight against antibiotic resistance: a socialmarketing framework. J Antimicrob Chemother. 2009; 63(2):230-7.

71. Enviromental Protection Agency (EPA). *Aeromonas*: Human Health Criteria Document. Washington; 2006.

72. EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 1.3, Janeiro 2011. http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/ (15 Julho 2011).

73. Falagas ME, Kastoris AC, Kapaskelis AM, Karageorgopoulos DE. Fosfomycin for the treatment of multidrug-resistant, including extended-

spectrum beta-lactamase producing, *Enterobacteriaceae* infections: a systematic review.Lancet Infect Dis. 2010;10(1):43-50. Review.

74. Ferreira da Silva M, Vaz-Moreira I, Gonzalez-Pajuelo M, Nunes OC, Manaia CM. Antimicrobial resistance patterns in *Enterobacteriaceae* isolated from an urban wastewater treatment plant. FEMS Microbiol Ecol. 2007;60(1):166-76.

75. Fluit AC, Florijn A, Verhoef J, Milatovic D. Presence of tetracycline resistance determinants and susceptibility to tigecycline and minocycline. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49(4):1636-8.

76. Francia MV, Varsaki A, Garcillán-Barcia MP et al. A classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids. FEMS Microb Rev 2004; 28:79-100.

77. Frost L, Ippen-Ihler K, Skurray RA. Analysis of the sequence and gene products of the transfer region of the F sex factor. Microbiol Rev 1994; 58(2):162-210.

78. Fyfe C, Sutcliffe JA, Grossman TH. Susceptibility of tetracyclines to Tet(a) resistance is independent of interdomain loop sequence. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57(5):2430-1.

79. Gales AC, Jones RN, Andrade SS, Pereira AS, Sader HS. In vitro activity of tigecycline, a new glycylcycline, tested against 1,326 clinical bacterial strains isolated from Latin America. Braz J Infect Dis. 2005;9(5):348-56.

80. Garcillán-Barcia MP, Francia MV, de la Cruz F. The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. FEMS Microb Rev 2009; 33:657-687.

81. Ghadiri H, Vaez H, Khosravi S, Soleymani E. The antibiotic resistance profiles of bacterial strains isolated from patients with hospital-acquired bloodstream and urinary tract infections. Crit Care Res Pract. 2012; 2012: 890797.

82. Giamarellou H. Multidrug-resistant Gram-negative bacteria: how to treat and for how long. Int J Antimicrob Agents. 2010; 36 Suppl 2:S50-4.

83. Goldstein C, Lee MD, Sanchez S, Hudson C, Phillips B, Register B, Grady M, Liebert C, Summers AO, White DG, Maurer JJ. Incidence of class 1 and 2 integrases in clinical and commensal bacteria from livestock, companion animals, and exotics. Antimicrob Agents Chemother. 2001; 45(3):723-6.

84. Goñi-Urriza M, Capdepuy M, Arpin C, Raymond N, Caumette P, Quentin C. Impact of an urban effluent on antibiotic resistance of riverine *Enterobacteriaceae* and *Aeromonas* spp. Appl Environ Microbiol. 2005;66:125–32.

85. Gottlieb T, Nimmo GR. Antibiotic resistance is an emerging threat to public health: an urgent call to action at the Antimicrobial Resistance Summit 2011. Med J Aust. 2011; 194(6):281-3.

86. Griffin MO, Fricovsky E, Ceballos G, Villarreal F. Tetracyclines: a pleitropic family of compounds with promising therapeutic properties. Review of the literature. Am J Physiol Cell Physiol. 2010;299(3):C539-48.

87. Griffith, A., Wessler, S, Carroll, S; Doebley, J. Chapter 15. The Dynamic Genome: Transposable Elements. Introduction to Genetic Analysis, 10th Ed., WH Freeman publishers; 2011.

88. Grinsted J, de la Cruz F, Schmitt R. The Tn*21* subgroup of bacterial transposable elements. Plasmid. 1990;24(3):163-89.

89. Gwynn MN, Portnoy A, Rittenhouse SF, Payne DJ. Challenges of antibacterial discovery revisited. Ann N Y Acad Sci. 2010; 1213:5-19.

90. Han JE, Kim JH, Choresca CH Jr, Shin SP, Jun JW, Chai JY, Park SC Prevalence of tet gene and complete genome sequencing of tet gene-encoded plasmid (pAHH01) isolated from *Aeromonas* species in South Korea. J Appl Microbiol. 2012;112(4):631-8.

91. Hawkey P, Finch R. Tigecycline: in-vitro performance as a predictor of clinical efficacy. Clin Microbiol Infect. 2007;13(4):354-62. Review.

92. Henriques IS, Fonseca F, Alves A, Saavedra MJ, Correia A. Occurrence and diversity of integrons and β-lactamase genes among ampicilin-resistant isolates from estuarine waters. Res Microbiol. 2006;157:938-47.

93. Högberg LD, Heddini A, Cars O. The global need for effective antibiotics: challenges and recent advances. Trends Pharmacol Sci. 2010;31(11):509-15.

94. Hua-Van A, Rouzic AL, Boutin TS, Filee J Capy P. The struggle for life of the genome's selfish architects. Biol Direct. 2009; 6:19.

95. Huddleston JR, Zak JC, Jeter RM. Antimicrobial susceptibilities of *Aeromonas* spp. Isolated from environmental sources. Appl Environ Microbiol. 2006;72:7036-7042.

96. Huttner B, Goossens H, Verheij T, Harbarth S; CHAMP consortium. Characteristics and outcomes of public campaigns aimed at improving the use of antibiotics in outpatients in high-income countries. Lancet Infect Dis 2010;10(1):17-31.

97. Iyer A, Barbour E, Azhar E, Salabi A, Hassan H, Qadri I, Chaudhary A, Abuzenadah A, Kumosani T, Damanhouri G, Alawi M, Na'was T, Nour Harakeh S. Transposable elements in *Escherichia coli* antimicrobial resistance. Adv Bios Biotech. 2013; 4: 415-423.

98. Isturiz RE. Optimizing antimicrobial prescribing. Int J Antimicrob agents. 2010; 36 Suppl 3:S19-22.

99. Jacobs L, Chenia HY. Characterization of integrons and tetracycline resistance determinants in *Aeromonas* spp. isolated from South African aquaculture systems. Int J Food Microbiol. 2007; 114(3):295-306.

100. Jansen G, Barbosa C, Schulenburg H. Experimental evolution as an efficient tool to dissect adaptive paths to antibiotic resistance. Drug Resist Updat. 2013 Dec;16(6):96-107.

101. Johnson TJ, Nolan LK. Pathogenomics of the virulence plasmids of *Escherichia coli*. Microbiol Mol Biol Rev 2009; 73(4):750-774.

102. Jones, CS, Osborne DJ, Stanley J. Enterobacterial tetracycline resistance in relation to plasmid incompatibility. Mol Cell Probes. 1992; 6:313–317.

103. Juhas M. Horizontal gene transfer in human pathogens. Crit Rev Microbiol. 2013 Jul 18.

104. Kang HY, Kim KY, Kim J et al. Distribution of conjugative-plasmid-mediated 16S rRNA methylase genes among amikacin-resistant *Enterobacteriaceae* isolates collected in 1995 to 1998 and 2001 to 2006 at a university hospital in South Korea and identification of conjugative plasmids mediating dissemination of 16S rRNA methylase. J Clin Microbiol 2008; 46(2):700-706.

105. Kapitonov VV, Jurka J. A universal classification of eukaryotic transposable elements implemented in Repbase. Nat Rev Genet. 2008;9(5):411-2

106. Kazazian HH Jr. Mobile elements: drivers of genome evolution. Science. 2004; 303(5664):1626-32

107. Knapp CW, Engemann CA, Hanson ML, Keen PL, Hall KJ, Graham DW. Indirect evidence of transposon-mediated selection of antibiotic resistance genes in aquatic systems at low-level oxytetracycline exposures. Environ Sci Technol. 2008; 15;42(14):5348-53.

108. Kim EH, Aoki T. The transposon-like structure of IS26-tetracycline, and kanamycin resistance determinant derived from transferable R plasmid of fish pathogen, *Pasteurella piscicida*. Microbiol Immunol. 1994; 38:31–38.

109. Kim MJ, Hirono I, Kurokawa K, Maki T, Hawke J, Kondo H, Santos MD, Aoki T. Complete DNA sequence and analysis of the transferable multiple-drug resistance plasmids (R Plasmids) from *Photobacterium damselae* subsp. piscicida isolates collected in Japan and the United States. Antimicrob Agents Chemother. 2008;52(2):606-11.

110. Kim JH, Hwang SY, Son JS, Han JE, Jun JW, Shin SP, Choresca C Jr, Choi YJ, Park YH, Park SC. Molecular characterization of tetracycline- and quinolone-resistant *Aeromonas salmonicida* isolated in Korea. J Vet Sci. 2011;12(1):41-8.

111. Kleckner N. Transposable elements in prokaryotes. Annu Rev Genet. 1981;15:341-404.

112. Kouyos RD, Abel Zur Wiesch P, Bonhoeffer S. On being the right size: the impact of population size and stochastic effects on the evolution of drug resistance and the community. PLoS Pathog. 2011; Apr;7(4):e1001334.

113. Kruse H, Sørum H. Transfer of multiple drug resistance plasmids between bacteria of diverse origins in natural microenvironments. Appl Environ Microbiol. 1994;60:4015–21.

114. Kurek A, Grudniak AM, Kraczkiewicz-Dowjat A, Wolska KI. New antibacterial therapeutics and strategies.Pol J Microbiol. 2011; 60(1):3-12.

115. Lachmayr KL, Kerkhof LJ, DiRienzo G, Cavanaugh CM, Ford TE. Quantifying nonspecific TEM β-lactamase (bla_{TEM}) genes in a wastewater stream. Appl Environ Microbiol 2009; 75(1):203-211.

116. Lancaster H, Ready D, Mullany P, Spratt D, Bedi R, Wilson M. Prevalence and identification of tetracycline-resistant oral bacteria in children not receiving antibiotic therapy. FEMS Microbiol Lett. 2007;228(1):99-104.

117. Lawley TD, Burland V, Taylor DE. Analysis of the complete nucleotide sequence of the tetracycline-resistance transposon Tn10. Plasmid. 2000; 43: 235–239.

118. L.Abée-Lund TM, Sorum H 2002. A global non-conjugative Tet C plasmid, pRAS3, from *Aeromonas salmonicida*. Plasmid 47: 172-181.

119. Lee C, Langlois BE, Dawson KL. Detection of tetracycline resistance determinants in pig isolates from three herds with different histories of antimicrobial agent exposure. Appl Environ Microbiol. 1993; 59:1467–1472.

120. Lévesque C, Piché L, Larose C, Roy PH. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. Antimicrob Agents Chemother. 1995; 39(1): 185-191.

121. Lima AA, Lima NL, Pinho MC, Barros Juñior EA, Teixeira MJ, Martins MC, Guerrant RL. High frequency of strains multiply resistant to ampicilina, trimethoprim-sulfamethoxazole, streptomycin, chloramphenicol, and tetracycline isolated from patients with shigellosis in northeastern Brazil during the period 1988 to 1993. Antimicrob Agents Chemother. 1995; 39(1):256-9.

122. Linkevicius M, Sandegren L, Andersson DI. Mechanisms and fitness costs of tigecycline resistance in Escherichia coli. J Antimicrob Chemother. 2013;68(12):2809-19.

123. Liu B, Pop M. ARDB--Antibiotic Resistance Genes Database. Nucleic Acids Res. 2009; 37(Database issue):D443-7.

124. Livermore D. Can better prescribing turn the tide of resistance? Nat Rev Microbiol. 2004; 2(1):73-8.

125. Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Zipursky, S.L. E Darnell, J. Biologia Celular e Molecular. 4a ed. Porto Alegre: Editora ArtMed; 2002.

126. Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Zipursky, S.L. E Darnell, J. Molecular Cell Biology. 5a ed. New York: W.H.Freeman & Co Ltd; 2003.

127. Łuczkiewicz A, Jankowska K, Fudala-Książek S, Olańczuk-Neyman K. Antimicrobial resistance of fecal indicators in municipal wastewater treatment plant. Water Res. 2010;44(17):5089-97.

128. McAleese F, Petersen P, Ruzin A, Dunman PM, Murphy E, Projan SJ, Bradford PA. A novel MATE family efflux pump contributes to the reduced susceptibility of laboratory-derived *Staphylococcus aureus* mutants to tigecycline. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49(5):1865-71.

129. Mahillon J and Chandler M. Insertion sequences. Microbiol Mol Biol. 1998; R 62: 725–774.

130. Martin SL and Garfinkel DJ. Survival strategies for transposons and genomes. Gen Biol. 2003; 4:313.

131. Martínez JL, Baquero F. Emergence and spread of antibiotic resistance: setting a parameter space. Ups J Med Sci. 2014;119(2):68-77.

132. Martínez N, Mendoza MC, Rodríguez I, Soto S, Bances M, Rodicio MR. Detailed structure of integrons and transposons carried by large conjugative plasmids responsible for multidrug resistance in diverse genomic types of *Salmonella enterica* serovar Brandenburg. J Antimicrob Chemother 2007; 60(6):1227-1234.

133. Mazel D. Integrons: agents of bacterial evolution. Nat Rev Microbiol 2006; 4(8):608-620.

134. Miruka OD, Rose K, Nyandago WE. Tetracycline efflux pump in different *Salmonella enterica* isolated from diarrhea patients in two rural health centers in Western Kenya. Iranian J Clin Infec Dis. 2011;6(1):24-30.

135. Mollet B, Iida S, Shepherd J, Arber W.Nucleotide sequence of IS26, a new prokaryotic mobile genetic element. Nucleic Acids Res. 1983;11(18):6319-30.

136. Moore IF, Hughes DW, Wright GD. Tigecycline is modified by the flavin-dependent monooxygenase TetX. Biochemistry 2005;44:11829–11835.

137. Moura A, Henrique I, Ribeiro R, Correia A. Prevalence and characterization of integrons from bacteria isolated from a slaughterhouse wastewater treatment plant. J Antimicrob Chemother. 2007; 60(6):1243-50.

138. Mshana SE, Imirzalioglu C, Hossain H, Hain T, Domann E, Chakraborty T. Conjugative IncF1 plasmids carrying CTX-M-15 among *Escherichia coli* ESBL producing isolates at a University hospital in Germany. BMC Infect Dis 2009; 9:97.

139. Mullany P. Introduction to the multi-author review on conjugative transposons. Cell Mol Life Sci 2002; 59(12):2017-2022.

140. Mulligan ME. Biochemistry 3107 – Fall 2002 – Mobile Genetic Elements. Disponível em: http://www.mun.ca/biochem/courses/3107/Lectures/Topics/Mobile_elements.html; 2002.

141. Munir M, Xagoraraki I. Levels of antibiotic resistance in manure biosolids and fertilized soil. J Environ Qual. 2011; Jan-Feb;40(1):248-55.

142. Murray MG e Thompson WF. Rapid isolation of high molecular-weight plant DNA. Nucleic Acids Res 1980; 8: 4321-5.

143. Nawaz M, Sung K, Khan SA, Khan AA, Steele R. Biochemical and molecular characterization of tetracycline-resistant *Aeromonas veronii* isolates from catfish. Appl Environ Microbiol. 2006;72(10):6461-6.

144. Nawaz M, Khan SA, Tran Q, Sung K, Khan AA, Adamu I, Steele RS. Isolation and characterization of multidrug-resistant *Klebsiella* spp. isolated from shrimp imported from Thailand. Int J Food Microbiol. 2012;155(3):179-84.

145. Nigam A, Gupta D, Sharma A. Treatment of infectious disease: Beyond antibiotics. Microbiol Res. 2014; Mar 1.

146. Neu HC, Gootz TD. Antimicrobial Chemotherapy. In: Baron S. Medical Microbiology. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 11.

147. Ng LK, Martin I, Alfa M, Mulvey M. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. Mol Cell Probes. 2001; 15(4):209-15.

148. Nordstrom, K. Plasmid R1-replication and its control. Plasmid 2006; 55:1-26.

149. O'Brien TF, Stelling J. Integrated Multilevel Surveillance of the World's Infecting microbes and their resistance to antimicrobial agents. Clin Microbiol Rev. 2011; 24(2):281-95.

150. Olowe OA, Idris OJ, Taiwo SS. Prevalence of tet genes mediating tetracycline resistance in *Escherichia coli* clinical isolates in Osun State, Nigeria. Eur J Microbiol Immunol (Bp). 2013;3(2):135-40.

151. Palú AP, Gomes LM, Miguel MAL, Balassiano IT, Queiroz MLP, Freitas-Almeida AC, Oliveira SS. Antimicrobial resistance in food and clinical *Aeromonas* isolates. Food Microbiol. 2006;23: 504-9.

152. Pan JC, Ye R, Meng DM, Zhang W, Wang HQ, Liu KZ. Molecular characteristicis of class 1 and class 2 integrons and their relationships to antibiotic resistance in clinical isolates of *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. J Antimicrob Chemother 2006; 58:288-296.

153. Pankey GA. Tigecycline. J Antimicrob Chemother. 2005;56(3):470-80.

154. Partridge SR. Analysis of antibiotic resistance regions in Gram-negative bacteria. FEMS Microbiol Rev 2011;35(5):820–55.

155. Pereira PS, de Araujo CF, Seki LM, Zahner V, Carvalho-Assef AP, Asensi MD. Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: spread of clonal complex 11 (ST11, ST437 and ST340). J Antimicrob Chemother. 2013 Feb;68(2):312-6.

156. Peirano G, Agersø Y, Aarestrup FM, dos Reis EM, dos Prazeres Rodrigues D. Occurrence of integrons and antimicrobial resistance genes among *Salmonella enterica* from Brazil. J Antimicrob Chemother. 2006; 58(2):305-9.

157. Pellegrini C, Celenza G, Segatore B, Bellio P, Setacci D, Amicosante G, Perilli M. Occurrence of class 1 and 2 integrons in resistant *Enterobacteriaceae* collected from an urban wastewater treatment plant: first report from central Italy. Microb Drug Resist. 2011; 17(2):229-34.

158. Pembroke JT, MacMahon C, McGrath B. The role of conjugative transposons in the *Enterobacteriaceae*. Cell Mol Life Sci. 2002; 59(12):2055-2064.

159. Pereira-Maia EC, Silva PP, Almeida WB. Tetraciclinas e glicilciclinas: uma visão geral. Quim Nova. 2010; 33(3):700-706.

160. Perry JA, Wright GD. Te antibiotic resistance "mobilome": searching for the link between environment and clinica. Front Microbiol. 2013; 30(4): 138.

161. Picao RC, Poirel L, Demarta A, Silva CS, Corvaglia AR, Petrini O, Nordmann P. Plasmid-mediated quinolone resistance in *Aeromonas allosaccharophila* recovered from a Swiss lake. J Antimicrob Chemother. 2008; 62:948–950.

162. Poole TL, Edrington TS, Brichta-Harhay DM, Carattoli A, Anderson RC, Nisbet DJ. Conjugative Transferability of the A/C Plasmids from *Salmonella enteric* isolates that possess or lack bla_{CMY} in the A/C plasmid backbone. Foodborne Pathog Dis 2009; 6(10): 1185-1194.

163. Prado T, Pereira WC, Silva DM, Seki LM, Carvalho APDA, Asensi MD. Detection of extended-spectrum β-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in effluents and sludge of a hospital sewage treatment plant. Lett Appl Microbiol. 2008; 46:136-141.

164. Projan SJ. Preclinical pharmacology of GAR-936, a novel glycylcycline antibacterial agent. Pharmacotherapy. 2000;20:219S-223S.

165. Radhouani H, Igrejas G, Pinto L, Gonçalves A, Coelho C, Rodrigues J, Poeta P. Molecular characterization of antibiotic resistance in enterococci recovered from seagulls (*Larus cachinnans*) representing an environmental health problem. J Environ Monit. 2011; 13(8):2227-33.

166. Rahman M, Huys G, Kühn I, Rahman M, Möllby R. Prevalence and transmission of antimicrobial resistance among *Aeromonas* populations from a duckweed aquaculture based hospital sewage water recycling system in Bangladesh. Antonie Van Leeuwenhoek. 2009;96(3):313-21.

167. Randall LP, Cooles SW, Osborn MK, Piddock LJ, Woodward MJ. Antibiotic resistance genes, integrons and multiple antibiotic resistance in thirty-five serotypes of *Salmonella enterica* isolated from humans and animals in the UK. J Antimicrob Chemother. 2004;53(2):208-16.

168. Rather MA, Aulakh RS, Gill JP, Mir AQ, Hassan MN. Detection and sequencing of plasmid encoded tetracycline resistance determinants (*tet*A and *tet*B) from food-borne *Bacillus cereus* isolates. Asian Pac J Trop Med. 2012;5(9):709-12.

169. Reinthaler FF, Posch J, Feierl G, Wüst G, Haas D, Ruckenbauer G, Mascher F, Marth E. Antibiotic resistance of *E. coli* in sewage and sludge. Water Res. 2003; 37(8):1685-90.

170. Rezaee MA, Langarizadeh N, Aghazabeh M. First Report of class 1 and class 2 integron in multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from Northwest Iran. Jpn J Infect Dis. 2012; 65:256-259.

171. Rhodes G, Huys G, Swings J, Mcgann P, Hiney M, Smith P, Pickup RW 2000. Distribution of oxytetracicline resistance plasmids between Aeromonads in hospital and aquaculture environments: implication of Tn*1721* in dissemination of the tetracycline resistance determinant *tetA*. Appl Environ Microbiol 66: 3883-3890.

172. Rice LB. The clinical consequences of antimicrobial resistance. Curr Opin Microbiol. 2009; 12(5):476-81.

173. Rivera I.G., Chowdhury M.A.R., Huq A., Jacobs D., Martius M.T. & Colwell R.R. Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences and the PCR to generate fingerprints of genomic DNAs from *Vibrio cholerae* O1, O139 and non-O1 strains. Appl Environ Microbiol 1995;61:2898-2904.

174. Roberts MC. Tetracycline therapy: update. Clin Infect Dis. 2003; 36(4):462-7.

175. Roberts MC. Update on acquired tetracycline resistance genes. FEMS Microbiol Lett. 2005; 245(2):195-203. Review.

176. Rossi F, Andreazzi D. Overview of tigecycline and its role in the era of antibiotic resistance. Braz J Infect Dis. 2006; 10(3):203-16.

177. Rysz M, Mansfield WR, Fortner JD, Alvarez PJ. Tetracycline resistance gene maintenance under varying bacterial growth rate, substrate and oxygen availability, and tetracycline concentration. Environ Sci Technol. 2013; 47(13):6995-7001.

178. Salyers AA, Shoemaker NB, Stevens AM, Li LY. Conjugative transposons:an unusual and diverse set of integrated gene transfe r element. Microbiol Rev. 1995; 59(4):579-90.

179. Sanchez GV, Master RN, Clark RB, Fyyaz M, Duvvuri P, Ekta G, Bordon J. *Klebsiella pneumoniae* antimicrobial drug resistance, United States, 1998-2010. Emerg Infect Dis. 2013;19(1):133-6.

180. Sandalli C and Ozgumus OB. Characterization of tetracycline resistance genes in tetracycline-resistante *Enterobacteriaceae* obtained from a coliform collection. World J Microbiol Biotechnol. 2010; 26:2099-2103.

181. Santos RP, Mayo TW, Siegel JD. Healthcare epidemiology: active surveillance cultures and contact precautions for control ofmultidrug-resistant organisms: ethical considerations. Clin Infect Dis. 2008; Jul 1;47(1):110-6.

182. Scaletsky IC, Souza TB, Aranda KR, Okeke IN. Genetic elements associated with antimicrobial resistance in enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) from Brazil. BMC Microbiol. 2010; 10:25.

183. Schmidt AS, Bruun MS, Larsen JL, Dalsgaard I. Characterization of class 1 integrons associated with R-plasmids in clinical *Aeromonas salmonicida* isolates from various geographical areas. J Antimicrob Chemother. 2001; 47: 735-743.

184. Schlüter A, Szczepanowski R, Pühler A, Top EM. Genomics of IncP-1 antibiotic resistance plasmids isolated from wastewater treatment plants provides evidence for a widely accessible drug resistance gene pool. FEMS Microbiol Rev 2007; 31:449-477.

185. Schnabel EL, Jones AL. Distribution of tetracycline resistance genes and transposons among phylloplane bacteria in Michigan apple orchards. Appl Environ Microbiol. 1999; 65(11):4898-907.

186. Schwartz T, Kohnen W, Janses B, Obst U. Detection of antibiotic resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. FEMS Microbiol Ecol. 2003;43:325–35.

187. Sen K, Rodgers M. Distribution of six virulence factors in *Aeromonas* species isolated from US drinking water utilities: a PCR identification. J Appl Microbiol. 2004;97(5):1077-86.

188. Seyfried EE, Newton RJ, Rubert KF 4th, Pedersen JA, McMahon KD. Occurrence of Tetracycline Resistance Genes in Aquaculture Facilities with Varying Use of Oxytetracycline. Microb Ecol. 2010; 59(4):799-807.

189. Shapiro JA. Mobile DNA and evolution in the 21st century. Mobile DNA. 2010; 1:4.

190. Shrank WH, Choudhry NK, Fischer MA, Avorn J, Powell M, Schneeweiss S, Liberman JN, Dollear T, Brennan TA, Brookhart MA. The epidemiology of prescriptions abandoned at the pharmacy. Ann Intern Med. 2010;153(10):633-40.

191. Siegel RE. Emerging gram-negative antibiotic resistance: daunting challenges, declining sensitivities, and dire consequences. Respir Care. 2008; 53(4):471-9.

192. Siguier P, Gourbeyre E, Chandler M.Bacterial insertion sequences: their genomic impact and diversity. FEMS Microbiol Rev. 2014 (In press).

193. Sikarwar AS and Batra HV. Prevalence of antimicrobial drug resistance of *Klebsiella pneumoniae* in India. Int J Bios, Biochem and Bioinf. 2011; 1(3):211-215.

194. Snyder L, Champness W. Transposition and Nonhomologous Recombination. Molecular Genetics of Bacteria. ASM Press. Washingtoon, DC; 1997.

195. Souli M, Galani I, Giamarellou H. Emergence of extensively drug-resistant and pandrug-resistant Gram-negative bacilli in Europe. Euro Surveill. 2008; 13(47): pii: 19045.

196. Speer BS, Shoemaker NB, Salyers AA. Bacterial resistance to tetracycline mechanisms, transfer, and clinical significance. Clin Microbiol Rev. 1992; (4):387-99.

197. Stokes HW, Gillings MR. Gene flow, mobile genetic elements and the recruitment of antibiotic resistance genes into Gram-negative pathogens. FEMS Microbiol Rev. 2011;35(5):790-819.

198. Sullivan BA, Gentry T, Karthikeyan R. Characterization of tetracycline-resistant bacteria in an urbanizing subtropical watershed. J Appl Microbiol. 2013;115(3):774-85.

199. Svara F, Rankin DJ. The evolution of plasmid-carried antibiotic resistance. BMC Evol Biol. 2011;11(1):130.

200. Talavera BMM, Benassi FO, von Specht MH, Quiroga MI, García MA, Pucciarelli AB, Zubreski E, Laczeski ME, Gutkind G. Susceptibilities to carbapenems and presence of cphA gene on food-borne *Aeromonas.* Braz arch biol technol. 2006; 49(4): 677-82.

201. Tao R, Ying GG, Su HC, Zhou HW, Sidhu JP. Detection of antibiotic resistance and tetracycline resistance genes in *Enterobacteriaceae* isolated from the Pearl rivers in South China. Environ Pollut. 2010;158(6):2101-9.

202. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. Infect Control Hosp Epidemiol. 1997; 18(6):426-39.

203. Terawaki Y, Takayasu H, Akiba T. J. Bacteriol. 1967; 94:687-690.

204. Thaker M, Spanogiannopoulos P, Wright GD. The tetracycline resistome. Cell Mol Life Sci. 2010 Feb;67(3):419-31. Epub 2009 Oct 28. Review.

205. Thomas J. Antimicrobial Resistance: The “ignored” public health care threat. Board of pharmacy newsletter, 2009 [acesso em: 05 de agosto de 2011]. Disponível em: http://www.dhmh.state.md.us/pharmacyboard/whatsnew/antimicrobail%20resistance%20j%20thomas.pdf.

206. Thomas CM and KM. Nielsen. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. Nat. Rev. Microbiol. 2005; 3:711–721.

207. Toleman MA, Walsh TR. Combinatorial eventes of insertion sequences and ICE in Gram-negative bacteria. FEMS Microbiol Rev. 2011;35(5):912-35.

208. Trudel MV, Tanaka KH, Filion G, Daher RK, Frenette M, Charette SJ. Insertion sequence AS5 (IS AS5) is involved in the genomic plasticity of *Aeromonas salmonicida*. Mob Genet Elements. 2013;3(3):e25640.

209. Tuckman M, Petersen PJ, Howe AY, Orlowski M, Mullen S, Chan K, Bradford PA, Jones CH. Occurrence of tetracycline resistance genes among *Escherichia coli* isolates from the phase 3 clinical trials for tigecycline. Antimicrob Agents Chemother. 2007;51(9):3205-11.

210. van Duin D, Cober E, Richter SS, Perez F, Cline M, Kaye KS, Kalayjian RC, Salata RA, Evans S, Fowler VG, Bonomo RA. Tigecycline therapy for carbapenem-resistant klebsiella pnaeumoniae (CRKP) bacteriuria leads to tigecycline resistance. Clin Microbiol Infect. 2014Jun;14 [In press].

211. Vilacoba E, Almuzara M, Gulone L, Traglia GM, Figueroa SA, Sly G, Fernández A, Centrón D, Ramírez MS. Emergence and spread of plasmid-borne tet(B)::ISCR2 in minocycline-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57(1):651-4.

212. Villa L, Feudi C, Fortini D, García-Fernández A, Carattoli A. Genomics of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* sequence type 512 clone highlights the role of RamR and ribosomal S10 protein mutations in conferring tigecycline resistance. Antimicrob Agents Chemother. 2014 Mar;58(3):1707-12.

213. Vizváryová M and Valková D. Transposon – the useful genetic tools. Biol, Bratislava. 2004; 59(3):309-318.

214. Xu H, Su Z, Wang S, Dai X, Chen J, Kong F, Li Y, Peng S, Shao Q, Lu L, Ezaki T. Four novel resistance integrin gene-cassete occurrence in bacterial isolates from Zhenjiang, China. Curr Microbiol. 2009; 59(2):113-7.

215. Wicker T, Sabot F, Hua-Van A, Bennetzen JL, Ca- py P, Chalhoub B, Flavell A, Leroy P, Morgante M, Panaud O, Paux E, SanMiguel P, Schulman AH. A unified classification system for eukaryotic transposable elements. Nature Rev Genet. 2007; 8: 973-982.

216. Wilke MH. Multiresistant bacteria and current therapy – the economical side of the story. Eur J Med Res. 2010; 15(12):571-6.

217. Wiesch PA, Kouyos R, Engelstädter J, Regoes RR, Bonhoeffer S. Population biological principles of drug-resistance evolution in infectious diseases. Lancet Infect Dis. 2011; 11(3):236-47.

218. Witte, W. Medical consequences of antibiotic use in agriculture. Science 1998; 279 (5353), 996–997.

219. World Health Organization (WHO). Antimicrobial resistance – Global report on surveillance. Geneve. World Health Organization (WHO) 2014. [acesso em 05 Jun 2014]. Disponível em: http://www.who.int.

220. Wright GD. Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic? Curr Opin Microbiol. 2010; 13(5):589-94.

221. Zahrl D, Wagner A, Tscherner M, Koraimann G. GroEL plays a central role in stress-induced negative regulation of bacterial conjugation by promoting proteolytic degradation of the activator protein TraJ. J Bacteriol 2007; 189(16):5885-5894.

222. Zechini B, Versace I. Inhibitors of multidrug resistant efflux systems in bacteria. Recent Pat Antiinfect Drug Discov. 2009; 4(1):37-50.

223. Zhang T, Zhang M, Zhang X, Fang HH. Tetracycline resistance genes and tetracycline resistant lactose-fermenting *Enterobacteriaceae* in activated sludge of sewage treatment plants. Environ Sci Technol. 2009; 43(10):3455-60.

224. Zhang T, Wang CG, Lv JC, Wang RS, Zhong XH. Survey on tetracycline resistance and antibiotic-resistant genotype of avian Escherichia coli in North China. Poult Sci. 2012 Nov;91(11):2774-7.