

Título: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E PERFIL DE RESISTÊNCIA À ANTIBIÓTICOS DE BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS ISOLADAS DE SEDIMENTOS DO RIO ANIL- MARANHÃO
Autor: JOVELIANE DE MELO MONTEIRO

Orientador: ANDREA DE SOUZA MONTEIRO

Data da Defesa:

10/05/2021

Resumo:

O ecossistema manguezal sofre impactos com as ações antrópicas do homem, isso pode provocar transformações no genoma de microrganismos presentes naquele ambiente. Esse ecossistema é importante para manter o nível do mar, proteção da costa e constitui cerca de 60 a 70% do litoral em regiões com climas tropicais e subtropicais da Terra. O objetivo foi caracterizar os mecanismos moleculares envolvidos na disseminação dos genes de resistência de bactérias Gram-negativas isoladas de sedimentos do Rio Anil - MA, bem como avaliar a presença de integrons e plasmídeos associados como disseminação dos genes de resistência. Os microrganismos isolados foram inoculados em meio Ágar Macconkey suplementado com os fármacos antibióticos ceftadizima e meropenem em concentrações crescentes (2-32 µg/mL). As espécies de bactérias portadoras de genes de resistência foram identificadas pelo MALDI-QTOF-Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz com analisador por tempo de voo. Os isolados bacterianos foram submetidos ao método de Kirby-Bauer para avaliação do perfil de suscetibilidade à antibióticos beta-lactamicos. Em seguida, realizou-se a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para alguns isolados que apresentaram um perfil de suscetibilidade satisfatório, além da determinação pelo sistema automatizado VITEK 2 e análise do Time Kill Curve para o isolado de *Klebsiella pneumoniae* KPCEU1. Os determinantes genéticos foram detectados por técnica da Reação em Cadeia da Polimerase em multiplex (mPCR). O esboço do genoma foi determinado por Illumina e anotado usando o software Prokka. A Rapid Annotation Subsystem Technology (RAST) foi usado para verificar as funções dos genes nos subsistemas encontrados no genoma. Além disso, a tipagem de sequência multilocus (MLST) foi usada para classificar o grupo de sequência tipo (ST). Para as análises in silico do genoma foram usados softwares, entre os quais o Comprehensive Antibiotic Resistance Database, Phaster, Orthoven2, Mauve4 e Virulence Factor Database (VFDB). Um total de trinta e duas bactérias foram identificadas, dentre estas 20 *Ochrobactrum intermedium*, 09 *Ochrobactrum tritici*, 02 *Stenotrophomonas maltophilia* e 01 *Klebsiella pneumoniae*. Um dos isolados apresentou um perfil multi-droga resistente e foi posteriormente sequenciado e identificado como *K. pneumoniae*, e então renomeado *K. pneumoniae*-KPCEU1. Todos isolados demonstraram resistência a cefepima e *K. pneumoniae* KPCEU1 apresentou susceptibilidade apenas a gentamicina. O RAST indicou a presença de 7 proteínas de adesão, 125 proteínas relacionadas a resistência a antibióticos e compostos tóxicos. A análise por MLST indicou que *K. pneumoniae* KPCEU1 pertence ao grupo ST11. Os genes para fatores de virulência que foram encontrados referem-se a enzimas de aderência, bomba de efluxo, proteínas captadoras de ferro associadas principalmente aos sideróforos, genes reguladores e sistemas de secreção. A detecção de isolados com o perfil acima descrito é de extrema importância, uma vez que evidencia a disseminação de bactérias virulentas e com perfil MDR, comumente multilocus (MLST) foi usada para classificar o grupo de sequência tipo (ST). Para as análises in silico do genoma foram usados softwares, entre os quais o Comprehensive Antibiotic Resistance Database, Phaster, Orthoven2, Mauve4 e Virulence Factor Database (VFDB). Um total de trinta e duas bactérias foram identificadas, dentre estas 20 *Ochrobactrum intermedium*, 09 *Ochrobactrum tritici*, 02 *Stenotrophomonas maltophilia* e 01 *Klebsiella pneumoniae*. Um dos isolados apresentou um perfil multi-droga resistente e foi posteriormente sequenciado e identificado como *K. pneumoniae*, e então renomeado *K. pneumoniae*-KPCEU1. Todos isolados demonstraram resistência a cefepima e *K. pneumoniae* KPCEU1 apresentou susceptibilidade apenas a gentamicina. O RAST indicou a presença de 7 proteínas de adesão, 125 proteínas relacionadas a resistência a antibióticos e compostos tóxicos. A análise por MLST indicou que *K. pneumoniae* KPCEU1 pertence ao grupo ST11. Os genes para fatores de virulência que foram encontrados referem-se a enzimas de aderência, bomba de efluxo, proteínas captadoras de ferro associadas principalmente aos sideróforos, genes reguladores e sistemas de secreção. A detecção de isolados com o perfil acima descrito é de extrema importância, uma vez que evidencia a disseminação de bactérias virulentas e

com perfil MDR, comumente encontradas na clínica, em ambientes aquáticos extra-hospitalares.

Palavras-chave:

beta-lactâmicos; bactérias gram-negativas; resistência; mangue.

Abstract:

The mangrove ecosystem is impacted by human anthropogenic actions, which can cause transformations in the genome of microorganisms present in that environment. This ecosystem is important for maintaining sea level, protecting the coast, and constitutes about 60 to 70% of the coastline in regions with tropical and subtropical climates on Earth. The objective was to characterize the molecular mechanisms involved in the dissemination of resistance genes in Gram-negative bacteria isolated from sediments of the Anil River - MA, as well as to evaluate the presence of integrons and plasmids associated with the dissemination of resistance genes. The isolated microorganisms were inoculated in Macconkey Agar medium supplemented with the antibiotic drugs ceftazidime and meropenem in increasing concentrations (2-32 µg/mL). The bacterial species carrying resistance genes were identified by MALDI-QTOF-Matrix Assisted Laser Desorption Ionization with time of flight analyzer. The bacterial isolates were submitted to the Kirby-Bauer method to assess the susceptibility profile to beta-lactam antibiotics. Next, the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined for some isolates that presented a satisfactory susceptibility profile, in addition to the determination by the automated VITEK 2 system and Time Kill Curve analysis for the *Klebsiella pneumoniae* KPCEU1 isolate. Genetic determinants were detected by multiplex Polymerase Chain Reaction (mPCR) technique. The genome outline was determined by Illumina and annotated using Prokka software. The Rapid Annotation Subsystem Technology (RAST) was used to verify the functions of genes in the subsystems found in the genome. In addition, multilocus sequence typing (MLST) was used to classify the group of sequence type (ST). For the in silico analysis of the genome, software was used, including the Comprehensive Antibiotic Resistance Database, Phaster, Orthoven2, Mauve4 and Virulence Factor Database (VFDB). A total of thirty-two bacteria were identified, among these 20 *Ochrobactrum intermedium*, 09 *Ochrobactrum tritici*, 02 *Stenotrophomonas maltophilia* and 01 *Klebsiella pneumoniae*. One of the isolates showed a multi-drug resistant profile and was later sequenced and identified as *K. pneumoniae*, and then renamed *K. pneumoniae*-KPCEU1. All isolates showed resistance to cefepime and *K. pneumoniae* KPCEU1 was only susceptible to gentamicin. RAST indicated the presence of 7 adhesion proteins, 125 proteins related to antibiotic resistance and toxic compounds. MLST analysis indicated that *K. pneumoniae* KPCEU1 belongs to the ST11 group. The genes for virulence factors that were found refer to adhesion enzymes, efflux pump, iron-capturing proteins mainly associated with siderophores, regulatory genes and secretion systems. The detection of isolates with the profile described above is extremely important, as it evidences the spread of virulent bacteria and with MDR profile, commonly found in the clinic, in extra-hospital aquatic environments.

Keywords:

mangrove; beta-lactams; gram-negative bacteria; resistance

Autorização de divulgação:

O trabalho não possui divulgação autorizada

Banca Examinadora

ANDREA DE SOUZA MONTEIRO	Docente
CRISTINA DE ANDRADE MONTEIRO	Participante Externo
WELLYSON DA CUNHA ARAUJO FIRMO	Docente
AFONSO GOMES ABREU JUNIOR	Docente