Romário Oliveira de Sales

ESTUDO DE FATORES GENÉTICOS ASSOCIADOS À PATOGENICIDADE PRESENTES NO GENOMA ACESSÓRIO DE CLONES DE ALTO RISCO E ESPORÁDICOS DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* E *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

Tese apresentada à Faculdade Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

São Paulo
2025

Romário Oliveira de Sales

ESTUDO DE FATORES GENÉTICOS ASSOCIADOS À PATOGENICIDADE PRESENTES NO GENOMA ACESSÓRIO DE CLONES DE ALTO RISCO E ESPORÁDICOS DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* E *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

Tese apresentada à Faculdade Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Patricia Severino

São Paulo

2025

Sales, Romário Oliveira de

Estudo de fatores genéticos associados à patogenicidade presentes no genoma acessório de clones de alto risco e esporádicos de *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* / Romário Oliveira de Sales. -- São Paulo, 2025.

xv, 100 f.

Tese (Doutorado) – Faculdade Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein. Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Título em inglês: *Genetic determinants of pathogenicity in the accessory genome of high-risk and sporadic clones of Pseudomonas aeruginosa and Klebsiella pneumoniae.*

1. *Caenorhabditis elegans*. 2. Infecção hospitalar. 3. Fatores de virulência. 4. Genoma bacteriano. 5. Genes MDR.

Elaborada pelo Sistema Einstein Integrado de Bibliotecas

FACULDADE ISRAELITA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE ALBERT EINSTEIN

Coordenador do curso de pós-graduação: Dr. Luciano Cesar Pontes de Azevedo

Romário Oliveira de Sales

ESTUDO DE FATORES GENÉTICOS ASSOCIADOS À PATOGENICIDADE PRESENTES NO GENOMA ACESSÓRIO DE CLONES DE ALTO RISCO E ESPORÁDICOS DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* E *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

Presidente da banca: Profa. Dra. Patricia Severino

BANCA EXAMINADORA

Membros titulares:
Prof. Dr. Adriano José Pereira
Prof. Dr. Yesid Cuesta Astroz
Profa. Dra. Ana Cristina Gales

Membros suplentes:
Profa. Dra Patrícia Maria de Carvalho Aguiar
Prof. Dr. José Luiz Caldas Wolff

Aprovada em: 27/08/2025.

Dedicatória

Dedico esta tese de doutorado aos meus pais e minhas irmãs que sempre me incentivaram e apoiaram em todos os momentos.

Agradecimentos

A minha família: mãe, pai e minhas irmãs pelo apoio e incentivo.

A minha namorada Fernanda Saturnino pelo apoio e incentivo.

A minha orientadora, Profa. Dra. Patricia Severino, pela oportunidade, confiança, paciência e por todos os ensinamentos, que foram fundamentais para meu crescimento profissional e pessoal.

A todos os outros professores que contribuíram com o meu aprendizado durante toda esta jornada.

A todos os meus colegas e amigos que me acompanharam durante a realização deste trabalho, em especial Elisangela de Paula Silva e Letícia Busato Migliorini, pelas conversas filosóficas, risadas e apoio diário, sem vocês tudo teria sido mais difícil, levarei nossa amizade para toda a vida.

Ao Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein pela disponibilidade de estrutura física e apoio e a todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brasil, processo nº 2022/03596-0, e pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) nº 88887.612483/2021-00.

“Todos os homens tendem, por natureza, ao conhecimento”

(Aristóteles)

Sumário

Dedicatória v
Agradecimentos vi
Lista de figuras xi
Lista de abreviaturas xii
Resumo xv
1 INTRODUÇÃO 1
1.1 *Pseudomonas aeruginosa* 3
1.2 Resistência antimicrobiana em *P. aeruginosa* 4
1.3 Fatores de virulência em *P. aeruginosa* 7
1.3.1 Estruturas de superfície bacteriana 9
1.3.2 Fatores de secreção 10
1.3.3 Interação entre bactérias 12
1.4 Clones de alto risco de *P. aeruginosa* 13
1.5 Estratégias de tratamento com foco no controle da virulência de *P. aeruginosa* 14
1.6 *Klebsiella pneumoniae* 15
1.7 Resistência a antimicrobianos em *K. pneumoniae* 16
1.8 Fatores de virulência em *K. pneumoniae* 17
1.9 Clones de alto risco de *K. pneumoniae* 18
1.10 *Caenorhabditis elegans* como modelo *in vivo* 18
1.11 Objetivos 19
2 MÉTODOS 21
2.1 Identificação de isolados clínicos, perfil de sensibilidade a antimicrobianos e seleção de isolados para análises experimentais 21
2.2 Eletroforese de campo pulsado 22
2.3 Classificação dos isolados como endêmicos e esporádicos 24
2.4 Seleção de genomas depositados em bancos de dados públicos para análises *in silico* 24
2.5 *Multilocus sequence typing* 25
2.6 Seleção de genomas esporádicos 26
2.7 Anotação dos genomas obtidos em banco de dados públicos 26

2.8 Análise do pangenoma para a determinação do genoma acessório dos genomas obtidos em banco de dados públicos 27
2.9 Avaliação da viabilidade e estoque dos isolados de *P. aeruginosa*.....28
2.10 Extração de DNA genômico dos isolados bacterianos 28
2.11 Sequenciamento de genomas 29
2.12 Montagem dos genomas, anotação e análise do pangenoma das cepas de *P. aeruginosa* sequenciadas.....31
2.13 Análise filogenética.....32
2.14 Predição do genoma central e acessório por meio da genômica comparativa.....32
2.15 Identificação de genes de virulência em *P. aeruginosa* e análise de sorotipo.....33
2.16 Manutenção e sincronização de fase de desenvolvimento de *C. elegans*.....34
2.17 Ensaio de morte *slow-killing* de *C. elegans* 35
2.18 Extração de RNA total de *C. elegans* durante a infecção por *P. aeruginosa*.....36
2.19 Ensaio de qPCR para a avaliação da expressão de genes de *P. aeruginosa* durante a infecção do *C. elegans* 37
2.20 Ensaio de formação de biofilme 37
2.21 Ensaio de quantificação de piocianina 39
2.22 Avaliação da virulência de *P. aeruginosa* a partir da escolha de fontes alimentares bacterianas preferidas pelo *C. elegans* 39
2.23 Teste estatístico para associação de elementos genéticos (genes codificadores/não codificadores) com virulência 40
2.24 Teste de permutação para controlar múltiplos testes de hipóteses.....40
2.25 Definição dos casos de colonização e infecção de *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos 41
2.26 *Score* de virulência para *K. pneumoniae* 41
2.27 Anotação dos genomas *K. pneumoniae* e determinação do pangenoma 41
2.28 Determinação do *whole-genome* e *core-genome* MLST dos isolados de *K. pneumoniae*.....42
2.29 Aspectos éticos 43
3 RESULTADOS 44
3.1 Prevalência de *P. aeruginosa*.....44
3.2 Caracterização da população de *P. aeruginosa* endêmica e esporádica por PFGE46
3.3 Sequenciamento de *P. aeruginosa*.....49
3.4 Resistoma das cepas *P. aeruginosa* sequenciadas 51

3.5 Viruloma e análise *in silico* da contribuição destes genes para a virulência de *P. aeruginosa* em *C. elegans*.....53
3.6 A virulência em relação ao nematóide *C. elegans* varia fortemente entre as cepas de *P. aeruginosa* 58
3.7 Fontes alimentares preferidas para *C. elegans* 60
3.8 Habilidade de *P. aeruginosa* para formação de biofilme e piocianina 62
3.9 A virulência de *P. aeruginosa* se correlaciona com a presença de elementos acessórios do genoma 64
3.10 Genes associados à alta e baixa virulência em *P. aeruginosa*: funções e distribuição 67
3.11 Investigando genes associados a HVA e genes associados a LVA em clones esporádicos e de alto risco de bancos de dados públicos.....68
3.12 Expressão de genes de *P. aeruginosa* durante a infecção *in vivo* no *C. elegans* .69
3.13 Caracterização da população de *K. pneumoniae* por PFGE e sequenciamento de genoma completo 73
3.14 Análise do genoma acessório das 124 cepas de *K. pneumoniae* e sua relação com infecção e colonização, e comparação com resultados obtidos a partir de bancos de dados públicos.....73
3.15 Caracterização do conjunto de isolados de *K. pneumoniae* por cgMLST e wgMLST 77
4 DISCUSSÃO 79
5 CONCLUSÕES 86
6 REFERÊNCIAS 88
Abstract 1
Apêndice.....1

Lista de figuras

Figura 1. Fatores de virulência de *P. aeruginosa* 8
Figura 2. Prevalência de *P. aeruginosa* ao longo do tempo 45
Figura 3. Características dos 92 isolados de hemocultura de *P. aeruginosa* 46
Figura 4. Dendrograma mostrando a relação dos 86 isolados de *P. aeruginosa* selecionados em períodos de maior incidência 48
Figura 5. Distribuição de *sequence type* por ano de isolamento 50
Figura 6. Árvore de máxima verossimilhança gerada a partir do alinhamento cgSNPs das 84 cepas de *P. aeruginosa* 51
Figura 7. Distribuição da presença e ausência dos genes/variantes identificados nas 84 cepas de *P. aeruginosa* sequenciadas neste estudo 53
Figura 8. Distribuição do número de genes de virulência por cepa 54
Figura 9. Distribuição dos genes do sistema de secreção tipo 3 e sorotipo de *P. aeruginosa*.....55
Figura 10. Mapa de calor demonstrando a porcentagem das classes de virulência encontradas nas 84 cepas de *P. aeruginosa*.....57
Figura 11. Virulência de *P. aeruginosa* em relação a *C. elegans* 59
Figura 12. Matriz de presença e ausência dos 60 genes de virulência associados à infecção de *P. aeruginosa* em *C. elegans* 60
Figura 13. Comportamento alimentar preferido do *C. elegans* 61
Figura 14. Formação de biofilme e produção de piocianina para as 39 cepas de *P. aeruginosa*.....63
Figura 15. Matriz de presença e ausência de subelementos HVA e LVA.....66
Figura 16. Expressão gênica de 22 genes de *P. aeruginosa* avaliados durante a infecção em *C. elegans* por *P. aeruginosa* 70
Figura 17. Expressão gênica de 22 genes de *P. aeruginosa* avaliada durante a infecção de *C. elegans* por *P. aeruginosa* por 72 horas 72
Figura 18. Características do pangenoma das 124 cepas de *K. pneumoniae*.....74
Figura 19. Comparação dos *scores*, genes de virulência e resistência das 124 cepas de *K. pneumoniae* (70 cepas de colonização e 54 de infecção).....75
Figura 20. Comparação entre cgMLST e wgMLST para 124 isolados de Kp-KPC.....78

Lista de abreviaturas

AGEs	Elementos do genoma acessório (*Accessory genomic elements*)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CDI	Inibição dependente de contato (*Contact-dependent growth inhibition*)
CdiA-CT	Exoproteína CdiA com uma toxina C-terminal CT
CDS	*Coding sequences*
cgMLST	*Core-genome multilocus sequence typing*
cgSNPs	*Core genome single nucleotide polymorphisms*
clb	*Colibactin*
CLSI	*Clinical and Laboratory Standards Institute*
CRISPR	*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic*
DAMPs	Padrões moleculares associados ao dano
DO	Densidade óptica
EDTA	*Ethylenediaminetetraacetic acid*
ERC	Enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos
GC	Grupos clonais
gDNA	DNA genômico (*Genomic DNA*)
GES	*Guiana extended-spectrum beta-lactamase*
GFF3	*Generic feature format version 3*
GWAS	Associação genômica ampla (*Genome-wide association*)
HCL	Ácido clorídrico (*Hydrochloric acid*)
HIAE	Hospital Israelita Albert Einstein
HVA	Subelementos associados à alta virulência (*High virulence-associated*)
IG	Ilhas genômicas
IMO	Metallo-beta-lactamase
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
Iuc	*Aerobactin*
kDa	Kilodalton
KPC	*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase
Kphv	*Klebsiella pneumoniae* hipervirulenta

Kp-KPC	*Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapanemase
Kp-MDR	*Klebsiella pneumoniae* multirresistente
KpRC	*Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolissacarídeo
LR	Regressão linear
LVA	Subelementos associados à baixa virulência (*Low virulence-associated subelements*)
MALDI-TOF MS	*Matrix-assisted laser desorption/ionization*
MBP	Produção moderada de biofilme (*Moderate biofilm production*)
MDR	Multirresistente (*Multidrug-resistant*)
MFS	*Major facilitator super family*
MGEs	Elementos genéticos móveis (*Mobile genetic elements*)
MLST	*Multilocus sequence typing*
Mpb	Milhões de pares de bases
MW	Mann-Whitney
NBP	Não produtoras de biofilme (*No biofilm production)*
NCBI	*National Center for Biotechnology Information*
NDM	*New Delhi metallo beta lactamase*
NGM	Meio de crescimento de nematóide (*Nematode growth media*)
Non-MDR	Não multirresistente
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORFs	*Open reading frames*
OXA	Oxacillinase
Pan-GWAS	*Pan-genome wide association studies*
PARC	*P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos
PCR	Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase chain reaction*)
PDR	Pan-resistente (*Pandrug-resistant*)
PFGE	Eletroforese em gel de campo pulsado (*Pulsed-field gel electrophoresis)*
PQS	Sinal de quinolona de Pseudomonas (*Pseudomonas quinolone signal*)
QRDRs	Regiões determinantes de resistência a quinolonas (*Quinolone resistance determining regions*)

QS	*Quorum sensing*
RC	Resistentes aos carbapenêmicos
RND	*Resistance-nodulation-division*
SBP	Produção forte de biofilme (*Strong biofilm production*)
SI	Sequências de inserção
SNP	Polimorfismos de nucleotídeo único (*Single nucleotide polymorphism*)
SPM	São Paulo Metalo Beta Lactamase
ST	*Sequence type*
T1SS	Sistema de secreção tipo 1
UFC	Unidades formadoras de colônias
UTI-A	Unidades de Terapia Intensiva Adulta
VFDB	*Virulence factor database*
VIM	*Verona imipenemase*
WBP	Produção fraca de biofilme (*Weak biofilm production*)
wgMLST	*Whole-genome multilocus sequence typing*
XDR	Extensivamente resistente (*Extensively drug-resistant)*
Ybt	*Yersiniabactin*

Resumo

Introdução: *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* são os principais patógenos responsáveis por infecções associadas à assistência à saúde. A estrutura populacional destes patógenos inclui clones que exibem fenótipos de multirresistência e estão frequentemente associados a surtos em diferentes regiões geográficas, os chamados de clones de alto risco. **Objetivos:** Avaliar o genoma central e acessório de clones de alto risco de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* visando identificar características possivelmente relacionadas com a virulência e a persistência destes clones em ambientes hospitalares, bem como facilitadoras da transição colonização/infecção. **Métodos:** Analisamos 84 cepas de *P. aeruginosa*, incluindo isolados clínicos e genomas disponíveis em bancos de dados públicos, por meio de sequenciamento completo do genoma, análise filogenética e análises de resistoma e viruloma. A virulência foi investigada por meio de ensaios de *slow killing* usando o *C. elegans* CF1903, e os elementos genômicos associados à virulência foram identificados por meio de um *pan-Genome Wide Association Studies*. Cepas de *K. pneumoniae* provenientes de fontes de colonização e infecção foram usadas para a realização de uma análise de associação visando identificar genes que poderiam estar associados com a característica de infecção. **Resultados:** As interações de *P. aeruginosa* com *C. elegans* foram avaliadas para um conjunto de 39 cepas de *P. aeruginosa*, representando 46,42% das cepas sequenciadas e estas cepas apresentaram uma virulência variada com um *score* de virulência entre 4 e indeterminado, sendo 4 a maior virulência. A análise de associação do genoma acessório identificou genes conhecidos que influenciaram no resultado das cepas de *P. aeruginosa* em direção ao *C. elegans* (*pvdE*, *fpvA*, *pvdD*, *pvdI* e *pvdJ*) e novos genes foram associados a virulência como *cdsA*, *clpP*, *wecA* e *gnu*. Em *K. pneumoniae*, análises de *pan-Genome Wide Association Studies* identificaram entre 6 e 25 genes potencialmente ligados à capacidade de infecção, dependendo do método utilizado. **Conclusões:** Os resultados destacam a importância de combinar a vigilância genômica com ensaios funcionais para compreender as interações entre resistência e virulência, potencialmente orientando novas estratégias terapêuticas e de controle de infecções.

Descritores: *Caenorhabditis elegans*; Infecção hospitalar; Fatores de virulência; Genoma bacteriano; Genes MDR

1 INTRODUÇÃO

A disseminação de bactérias gram-negativas resistentes aos carbapenêmicos tornou-se uma grave ameaça à saúde pública. Em 2017 a Organização Mundial da Saúde (OMS) classificou bactérias deste grupo como prioridade crítica para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos.[1] Estes patógenos fazem parte do grupo "ESKAPE", que inclui 6 microrganismos: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp.[2,3]

Estas bactérias frequentemente apresentam fenótipo de multirresistência e estão associadas com infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS).[2,3] A patogenicidade bacteriana é uma característica complexa dependente de vários atributos, cada um dos quais contribuindo de maneira cumulativa para o potencial patogênico.[4] Para que um microrganismo alcance altos níveis de virulência, esta fórmula depende ainda do *background* genético do microrganismo, sendo este influenciado por genes do genoma central, como aqueles envolvidos no metabolismo central e do genoma acessório.[5]

O genoma acessório é enriquecido por genes de virulência carreados por elementos genéticos móveis (MGEs - *mobile genetic elements*).[6] Por exemplo, em *P. aeruginosa* os genes *exoT*, exoY, *exoS* e *exoU* pertencem ao sistema de secreção do tipo 3, considerado como o principal mecanismo responsável pelo processo de invasão e citotoxicidade.[7] Os genes *exoT* e *exoY* ocorrem em 89 a 100% dos isolados, *exoS* é reportado em 58 a 72% das cepas e o *exoU* em 23 a 42% das cepas.[7] Mais recentemente foi descrito que isolados altamente virulentos carregam um sistema de inibição dependente de contato (CDI - *contact-dependent growth inhibition*).[8] Este sistema contém uma exoproteína denominada CdiA com uma toxina C-terminal CT (CdiA-CT) e podem variar entre isolados da mesma espécie.[8] Além da sua função primária do CDI, foi identificado que este sistema CdiA-CT promove a citotoxicidade de células *HeLa* em cultura celular e contribui para a letalidade de infecções sanguíneas em camundongos.[8] Já clones hipervirulentos de *K. pneumoniae* são descritos carregando os genes *rmpA* e/ou *rmpA2* que conferem um fenótipo de hipermucoviscosidade, pois aumentam a síntese de polissacarídeo capsular.[9]

A literatura recente tem reportado a ocorrência de isolados hipervirulentos e multirresistentes, uma situação alarmante pois limita as opções terapêuticas, trazendo graves complicações para o tratamento de infecções por este tipo de patógenos.[9,10]

Linhagens de bactérias reportadas em diferentes regiões geográficas são denominadas como linhagens epidêmicas e seu sucesso é determinado por um conjunto de fatores relacionados à patogenicidade e resistência a antibióticos, incluindo redes regulatórias que conectam resistência e virulência.[11,12] Os isolados com estas características são popularmente conhecidos como clones de alto risco. Para *P. aeruginosa*, são reconhecidos 11 clones de alto risco, pertencentes aos tipos de sequência", do inglês “Sequence type” (STs): ST235, ST111, ST233, ST244, ST357, ST308, ST175, ST277, ST654, ST298 e ST395.[13,14] O ST235 é atualmente o mais relevante em clínica por apresentar elevada virulência associada à presença do gene ExoU presente em praticamente todos os isolados.[14]

Para *K. pneumoniae,* clones de alto risco pertencem a 6 principais grupos clonais (GC): GC258, GC147, GC101, GC23, GC65 e GC86.[9] Estes 6 grupos clonais abrangem 19 STs, sendo 11 STs associados aos clones de *Klebsiella pneumoniae* multirresistente (Kp-MDR): ST11, ST101, ST147, ST258, ST273, ST392, ST512, ST1685, ST2016, ST2017 e ST2502, enquanto 8 STs associados a Klebsiella pneumoniae hipervirulenta (Kphv): ST23, ST25, ST26, ST57, ST65, ST86, ST163 e ST3994. Estes clones contribuem de forma desproporcional para a carga global de infecções, sendo chamamos de "*clones problemáticos globais*", do inglês “*global problem clones*”.[9] Dentro do cenário hospitalar, *K. pneumoniae* é um microrganismo de grande importância devido à dificuldade de tratamento de infecções provocadas por isolados que carregam genes codificando a enzima *K. pneumoniae* carbapenemases (KPC), endêmica no Brasil, que confere resistência aos antibióticos β-lactâmicos.[15] Estes genes são frequentemente mobilizados pelos transposons Tn*4401-like* carreados por plasmídeos como o pKpQIL-like e o KPC_FCF3SP-like, recentemente identificados pelo nosso grupo de pesquisa em um conjunto de isolados clínicos de nosso ambiente hospitalar.[16]

Compreender as características por trás do sucesso dos clones de alto risco é crucial para que sejam projetados tratamentos específicos e para auxiliar no desenvolvimento de estratégias que poderão ser aplicadas pelo serviço de controle

de infecção hospitalar visando minimizar a disseminação de clones de alto risco e cepas multirresistentes.

Sendo assim, objetivo central deste estudo foi avaliar fatores associados ao sucesso dos clones de alto risco de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* por meio da análise detalhada do genoma completo de microrganismos selecionados em nosso ambiente clínico, comparações de genomas depositados em bancos de dados públicos, e por meio do estudo em modelo de infecção experimental com o nematódeo *Caenorhabditis elegans* para validação de hipóteses geradas *in silico*. Em razão da elevada diversidade do genoma acessório de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*, abordagens que envolvam análises comparativas de genomas são ferramentas poderosas para identificar novos genes associados com a patogenicidade destes isolados. A escolha do modelo de infecção em *C. elegans* foi baseada em atuais restrições éticas que envolvem o uso dos modelos murinos quando existem alternativas viáveis, ao lado da simplicidade experimental e do amplo conhecimento acerca do desenvolvimento de *C. elegans* e sua resposta à virulência de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*.[17-19] Com este modelo seremos capazes de combinar características genotípicas e fenotípicas para identificar regiões do genoma com papel central na patogenicidade de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*.

1.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria gram-negativa amplamente distribuída no ambiente, geralmente habitando solo, água, plantas e humanos. Esta bactéria é um microrganismo resiliente no ambiente que pode crescer em condições de deficiência de nutrientes e pode suportar uma variação de temperatura entre 4 - 42°C, bem como em ambientes secos e abióticos como superfícies em ambiente hospitalar.[20] A resiliência de *P. aeruginosa* está diretamente associada com aspectos do seu genoma central e acessório.

O genoma de *P. aeruginosa* contém entre 5-7 milhões de pares de bases (Mpb), sendo o genoma central constituído por genes presentes em quase todos os isolados da espécie e varia entre 4.934 e 5.021 genes.[21] O genoma acessório compõe até 20% do seu conteúdo genômico e é composto principalmente por elementos genéticos transferíveis que inclui: fagos, transposons, sequências de

inserção (SI), ilhas genômicas (IG) e plasmídeos.[22,23] O genoma acessório é o principal responsável pela resistência adquirida e a virulência.[23]

Como um patógeno oportunista, *P. aeruginosa* é responsável por 10-20% das IRAS ao redor do mundo.[24] Este patógeno pode causar uma ampla gama de infecções, incluindo pneumonia associada a ventilação mecânica, infecções de corrente sanguínea, infecções do trato urinário, infecções de tecidos moles e infecções sistemáticas, e é considerado dos principais patógenos associados a infecções crônicas em pacientes com fibrose cística e infecções em indivíduos com feridas decorrentes de graves queimaduras.[25-27]

No Brasil, o último relatório disponibilizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) demonstra que *P. aeruginosa* foi o terceiro microrganismo mais reportado em Unidades de Terapia Intensiva Adulta (UTI-A) no ano de 2023 associadas a infecções sanguíneas de cateter venoso central. Dos 1.703 isolados avaliados, 40,5% (n=680) foram resistentes aos carbapenêmicos.[28]

1.2 Resistência antimicrobiana em *P. aeruginosa*

A resistência antimicrobiana de *P. aeruginosa* é complexa e pode ser dividida em três principais categorias: intrínseca, adquirida e adaptativa. A resistência intrínseca é aquela codificada pelo genoma central dos microrganismos, a adaptativa é induzida por estímulos ambientais e a adquirida, que é um dos mecanismos chave para o escape de *P. aeruginosa* aos antibióticos, surge do ganho de genes de resistência por meio da transferência horizontal de genes ou como consequência da seleção de mutações vantajosas.[29,30]

P. aeruginosa apresenta elevado nível de resistência intrínseca para uma ampla gama de antibióticos e esta característica é conferida pela baixa permeabilidade da membrana externa, sistemas de efluxo que expulsam o antibiótico para fora da célula bacteriana e produção de enzimas que podem inativar os antibióticos, como por exemplo as β-lactamases.[31,32] A permeabilidade da membrana externa de *P. aeruginosa* pode chegar a ser entre 12 e 100 vezes menor do que permeabilidade da membrana de *E. coli*.[31,33] A resistência intrínseca associada com as porinas (OprF, OprD e OprB) se deve ao fato de que estas formam canais muito

pequenos e seletivos para diferentes moléculas, limitando a passagem de antibióticos, atuando como uma peneira molecular.[31]

As bombas de efluxo exibem um papel importante, pois são responsáveis por expelir componentes tóxicos e podem ser classificadas em 5 famílias: *resistance-nodulation-division* (RND); *major facilitator super family* (MFS), ATP-*binding cassette* (ABC) *superfamily, small multidrug resistance* (SMR) *family [a member of the much larger drug/metabolite transporter* (DMT) *superfamily]* e *multidrug e toxic compound extrusion* (MATE) *family.*[32,34] A família RND exibe um papel chave na resistência a antibióticos em *P. aeruginosa* pois é constituída de transportadores de membrana citoplasmáticos, proteína ligante periplasmática e porinas de membrana externa. *P. aeruginosa* expressa 12 bombas de efluxo da família RND, no entanto, quatro são conhecidas por contribuir com maiores níveis de resistência: MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN e MexXY-OprM. Estas quatro bombas de efluxo contribuem para expelir os antibióticos das classes: β-lactâmicos, aminoglicosídeos e quinolonas.[32,34]

A produção de enzimas que podem hidrolizar ou modificar antibióticos são um dos principais mecanismos de resistência intrínseca em bactérias. *P. aeruginosa* produz β-lactamases como AmpC e OXA-50 de forma constitutiva.[32,35] No entanto, mutações podem aumentar a expressão de AmpC, que acarreta um aumento da resistência para as cefalosporinas, bem como cefamicina, monobactâmicos e carbapenêmicos.[36]

A resistência adquirida envolve a transferência horizontal de genes entre microrganismos da mesma espécie ou espécies próximas, e a mutações adquiridas.[31] A transferência horizontal de genes envolve um conjunto de elementos genéticos móveis, como, plasmídeos, transposons, integrons, sequência de inserção, prófagos, IG e elementos conjugativos integrativos.[37] Em *P. aeruginosa* a transferência horizontal afeta principalmente duas classes de antibióticos que são os aminoglicosídeos e os β-lactâmicos, mas também tem sido descrita para outras classes de agentes antimicrobianos.[31] A resistência a aminoglicosídeos ocorre devido a modificações na estrutura do agente antimicrobiano que consequentemente levam a sua inativação, esta inativação pode ser por fosforilação, realizada por enzimas denominadas aminoglicosídeo fosforiltransferases (APHs - *aminoglycoside phosphoryltransferases*), por acetilação, realizadas por enzimas aminoglicosídeo acetiltransferases (AACs - *aminoglycoside acetyltransferases*), ou por adenilação

realizada por enzimas denominadas aminoglicosídeo nucleotidiltransferase (ANTs - *aminoglycoside nucleotidyltransferases*) e aminoglisosídeo adeniltransferase, (AAD - *aminoglycoside adenylyltransferase*). Outro mecanismo de resistência aos aminoglicosídeos envolve a metilação do 16S rRNA do sítio A da subunidade ribossômica do 30S, este mecanismo contribui para elevado nível de resistência em isolados clínicos de *P. aeruginosa* frente aos agentes antimicrobianos amicacina, gentamicina e tobramicina.[38] Várias enzimas envolvidas com este mecanismo já foram descritas, sendo elas: RmtA, RmtB, RmtD e ArmA.[38]

P. aeruginosa resistentes aos carbapenêmicos (PARC) emergiram desde a introdução deste grupo de antimicrobianos, por volta da década de 80.[39] Decorridos aproximadamente 43 anos, deste a introdução dos carbapenêmicos, PARC se tornou um dos principais patógenos responsáveis por IRAS em todo o mundo.[40] Nos Estados Unidos, a taxa de PARC varia entre 10-30%, enquanto o último relatório disponibilizado pela ANVISA com os dados do Brasil para 2022 indica que a taxa de PARC no país é de 46,3%.[28,40] Isolados de PARC tem sido reportado mundialmente carregando uma ampla gama carbapenemases. Na América Latina, são observados frequentemente *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), *Guiana extended-spectrum beta-lactamase* (GES), Subclass B1 metallo-beta-lactamase (IMP), *Verona imipenemase* (VIM), *New Delhi metallo beta lactamase* (NDM) e São Paulo Metalo Beta Lactamase (SPM), este último sendo quase que exclusivo em território brasileiro.[41] Na Península Arábica as carbapenemases em *P. aeruginosa* incluim VIM, IMP e NDM.[42] Nos Estados Unidos, os dados do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) demonstram que as principais carbapenemases encontradas no país são: VIM, KPC, IMP e NDM.[43]

Embora as carbapenemases adquiridas exibam um papel importante para isolados de PARC, a resistência aos carbapenêmicos também pode ser mediada por mutações cromossômicas relacionadas a três principais mecanismos: diminuição da permeabilidade da membrana externa, desencadeada por mutações alteram estrutura ou levam a perda da porina OprD, superexpressão da bomba de efluxo MexAB-OprM e por último a superexpressão do gene que confere resistência intrínseca aos β-lactâmicos AmpC.[44] Além destas duas classes citadas acima, a resistência a classe das fluroquinolonas é frequentemente desencadeada por mutações nos genes da DNA girase (*gyrA* e/ou *gyrB*) e topoisomerase IV (*parC* e/ou *parE*). Mutações nestes

genes são denominadas de regiões determinantes de resistência a quinolonas (*QRDRs - quinolone resistance determining regions*).[45]

Com a crescente necessidade de utilização de colistina/polimixina devido a ocorrência de casos de *P. aeruginosa* que são resistentes a praticamente todos os antibióticos, mutações que levam a resistência a este antibiótico têm sido descritas envolvendo a alteração no lipopolissacarídeo (LPS) causada pela adição do 4-amino-4-deoxy-L-arabinose moiety. Esta alteração ocorre devido mutações que frequentemente ocorrem nos genes *pmrAB* e/ou *phoPQ*.[45,46]

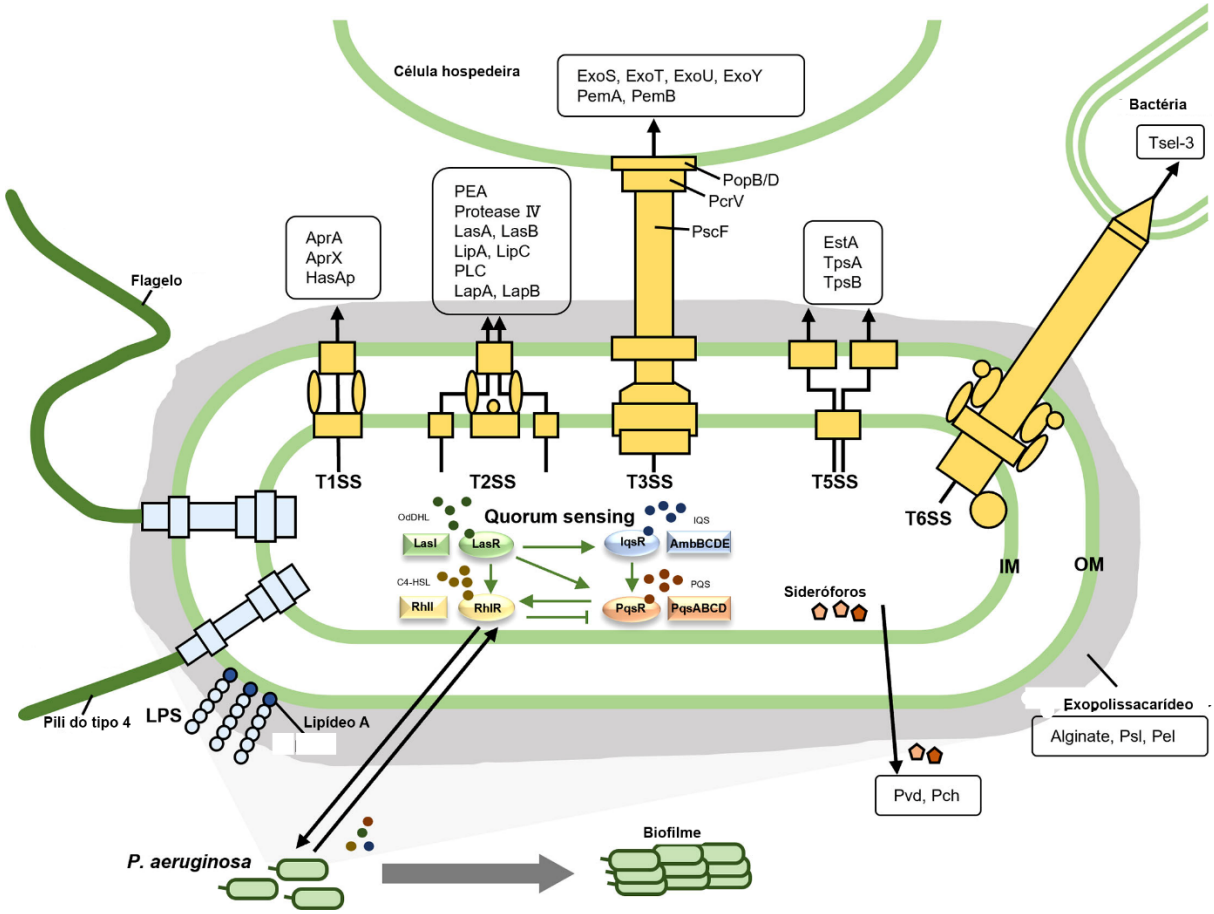
A resistência adaptativa em *P. aeruginosa* se refere a uma alteração transiente na expressão dos genes e/ou proteínas em resposta a algum estímulo ambiental, de forma que após o fim do estímulo esta mudança de expressão e proteína é removida.[32] O primeiro relato de resistência adaptativa em *P. aeruginosa* foi reportado em amostras de escarro de pacientes com fibrose cística em 1996.[47] Vários fatores induzem esta resposta adaptativa, incluindo antibióticos, biocidas, poliaminas, alteração de pH, anaerobiose, cátions, fontes carbono, desenvolvimento de biofilme, motilidade associada ao *swarming* e aumento da expressão da bomba de efluxo MexXY-OprM.[31,48] Estes fatores modulam a expressão de vários genes no genoma de *P. aeruginosa*, que estão relacionados ao envelope da célula bacteriana, regulação de bombas de efluxo e enzimas. Por abranger várias vias, esta resposta adaptativa está relacionada com aproximadamente 10% dos genes de *P. aeruginosa*.[31,49]

1.3 Fatores de virulência em *P. aeruginosa*

A virulência de um patógeno está associada à sua habilidade para infectar o hospedeiro e causar manifestações clínicas por meio dos fatores que contribuem para a colonização e posterior infecção, levando à ruptura da integridade do tecido do hospedeiro, escape da resposta imunológica e sequestro dos nutrientes do hospedeiro.[20,50,51] A virulência bacteriana é multifatorial e depende de uma rede regulatória complexa que contribui de maneira cumulativa para o potencial patogênico de um dado patógeno.[8] Os fatores que contribuem um elevado potencial de virulência estão presentes tanto no genoma central quanto no acessório.[8]

A virulência de *P. aeruginosa* tem sido tem sido extensivamente estudada e é classificada de formas diferentes na literatura. Neste estudo utilizamos a

revisão de Liao et al., 2022.[20] Os fatores de virulência foram divididos em três principais categorias denominadas: estruturas de superfícies bacterianas (Pili do tipo IV, flagelos, lipopolissacarídeo e sistema de secreção T1SS, T2SS, T3SS, T5SS e T6SS), fatores de secreção (exopolisacarídeos, sideróferos, proteases e toxinas) e interação célula-célula bacteriana (*quorum-sensing* e biofilme) (Figura 1).



Os fatores de virulência de *P. aeruginosa* são divididos em 3 principais categorias, denominadas: estruturas de superfícies bacterianas (Pili do tipo IV, flagelos, lipopolissacarídeo e sistema de secreção [T1SS, T T2SS, T3SS, T5SS e T6SS]), fatores de secreção (exopolisacarídeos, sideróforos, proteases e toxinas) e interação célula-célula bacteriana (*quorum-sensing* e biofilme).
Fonte: Traduzido de Liao C, Huang X, Wang Q, Yao D, Lu W. Virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* and antivirulence strategies to combat its drug resistance. Front Cell Infect Microbiol. 2022;12:926758. Figure 1 The virulence factors of *P. aeruginosa*. The virulence factors of *P. aeruginosa* are divided into three main categories, namely bacterial surface structures, secreted factors, and bacterial cell-to-cell interaction. The bacterial surface structures include surface appendages like type IV pili and flagella, outer membrane components such as lipopolysaccharide, and five secretion systems (T1SS, T2SS, T3SS, T5SS, and T6SS). The secreted factors are illustrated in the black boxes. As for the bacterial cell-to-cell interaction, quorum sensing and biofilm are listed here; p. 2.[20]
Figura 1. Fatores de virulência de *P. aeruginosa*

1.3.1 Estruturas de superfície bacteriana

Pili do tipo IV (*Type IV pili*) são apêndices filamentosos retráteis, similares ao cabelo, composta por cópias repetidas de uma proteína de 15 kDa denominada pilin, e apresentando 3 subtipos tipo IVa, tipo IVb e tipo IVb-Tad.[20,52,53] São estruturas essenciais para o estabelecimento da infecção por mediar adesão e a motilidade bacteriana.[54] Os flagelos bacterianos são estruturas protuberantes na estrutura bacteriana que são formados principalmente por subunidades da proteína denominada flagelina que pode ser classificada em dois subtipos, A e B. Os flagelos permitem a adesão da bactéria a célula do hospedeiro e motilidade.[20,54,55] Os flagelos, por serem altamente imunogênicos, podem ativar a resposta inflamatória do hospedeiro por meio dos receptores do *toll-like* 5.[20,54,55]

O LPS é o principal componente da membrana externa de bactérias gram-negativas.[20,56] A membrana externa de *P. aeruginosa* tem uma bicamada assimétrica que atua como uma barreira para evitar componentes possivelmente tóxicos, com uma face interna fosfolipídica e outra externa composta pelo LPS, a membrana externa é composta por mais de 300 proteínas, e o papel de muitas delas ainda é desconhecido.[54,57,58] Devido à localização do LPS, este é uma molécula chave na parede bacteriana e é reconhecida pelo sistema imune do hospedeiro, iniciando assim o processo de eliminação do patógeno. O LPS é composto de três domínios: O lipídeo A, uma região central e o antígeno O ou polissacarídeo O.[54,59]

P. aeruginosa possui 6 sistemas de secreção (T1SS até T6SS). Os sistemas de secreção possuem um papel central na virulência, pois estes sistemas podem modular a resposta imune do hospedeiro através da secreção destes sistemas para a secreção de fatores de virulência dentro da célula do hospedeiro, e estes fatores de virulência liberados podem modular a resposta imune permitindo o escape e a colonização do patógeno.[60] Estes 6 sistemas de secreção podem ser divididos em duas principais categorias dependendo da rota de transporte das proteínas. O sistema de secreção denominado *one-step* agrupa os sistemas (T1SS, T3SS, T4SS e T6SS) e os demais sistemas de secreção são agrupados no sistema de secreção *step-two (*T2SS e T5SS). A diferença destes dois sistemas é que o primeiro *step-one* secreta diretamente as proteínas do citosol bacteriano para a superfície, enquanto o segundo

grupo *step-two* requer uma breve permanência periplasmática das proteínas secretadas para então estas serem liberadas para o ambiente externo.[60]

1.3.2 Fatores de secreção

Os exopolisacarídeos são moléculas baseadas em açucares que são secretadas por *P. aeruginosa*, para auxiliar na sobrevivência deste patógeno em ambientes desfavoráveis como: agentes oxidantes e sistema imunológico do hospedeiro.[54] Além disso, os exopolisacarídeos possuem um papel fundamental na formação do biofilme que exibe um papel vital na sobrevivência de *P. aeruginosa* e contribui para a persistência nos pacientes colonizados ou infectados por *P. aeruginosa* por atuar como adesinas.[54] Três exopolissacarídeos foram descobertos em *P. aeruginosa* (alginato, Psl e Pel) e a expressão destes exopolissacarídeos são associadas com o ambiente que se encontram, sendo o alginato, secretado por cepas presentes em pacientes com fibrose cística, enquanto o Psl e Pel são expressos principalmente em cepas ambientais.[61,62]

Os sideróforos são moléculas capazes de se ligar ao ferro e são secretados pelas bactérias para auxiliar na captação deste elemento no hospedeiro. O ferro (Fe^{3+}) é um nutriente essencial para o crescimento e virulência bacteriana. Quando *P. aeruginosa* está colonizando ou infectando um hospedeiro, o ferro presente no hospedeiro não está facilmente disponível devido a sua baixa solubilidade e devido a atividade de proteínas que se ligam ao ferro, como a transferrina e lactoferrina.[54,63] Para contornar esta desvantagem *P. aeruginosa* usa diferentes mecanismos de virulência: (i) produção de moléculas de baixo peso molecular que são componentes orgânicos denominados sideróferos (pioverdina e pioquelina); (ii) captação de xenosideróferos; (iii) captação da molécula heme das hemoproteínas do hospedeiro por meio de dois sistemas (Has e Phu); e (iv) redução de ferro através do sistema Feo.[54,64]

As proteases alcalinas são fatores de virulência secretados pelo sistema de secreção tipo I e controlados pela rede do *quorum-sensing*.[20,65] As proteases alcalinas possuem a habilidade de degradar componentes relacionados ao sistema complemento, bem como os interferons alfa e gama contribuindo para o sucesso da infecção.[20,66] A elastase A e B (LasA e LasB) são produzidas por *P. aeruginosa* para degradar a elastina, um dos componentes dos tecidos do pulmão e

vasos sanguíneos.[20,67] A análise do secretoma de *P. aeruginosa* demonstrou que o LasB é a proteína mais abundante.[68] Além disso, o lasB parece ser fundamental para desencadear a infecção e a resposta inflamatória no hospedeiro.[68] Em pacientes com fibrose cística este gene é altamente expresso na fase inicial da infecção.[68] Algumas proteases, como a protease IV estão significativamente associadas com casos de infecção de *P. aeruginosa* em córnea, devido a degradação de vários componentes do sistema imunológico provocado por esta protease.[20]

Os quatro efetores secretados pelo T3SS, conhecidos como: ExoS, ExoT, ExoY e ExoU são comumente referenciados como exotoxinas de *P. aeruginosa*.[20] Este sistema é expresso a nível basal, estando em estado quiescente até que vários sinais indutores como baixa concentração extracelular de Ca^{2+}, albumina/caseína sérica e contato com a célula hospedeira via flagelo ou pili, sejam detectados e induzam a expressão deste sistema T3SS, controlado pelo regulador ExoA.[54] Este mecanismo de virulência possui um papel fundamental na citotoxicidade e no processo de invasão, com impacto no desfecho de infecções por *P. aeruginosa*.[7] Através do T3SS *P. aeruginosa* pode injetar proteínas efetoras diretamente dentro do citoplasma da célula do hospedeiro.[7] A proteína codificada por ExoS tem como alvo vários fatores e vias celulares, favorecendo a evasão da fagocitose e levando à morte da célula do hospedeiro.[60] A presença de ExoS foi recentemente associada com infecções crônicas e contribui para o desfecho desfavorável em pacientes com fibrose cística.[54] Por outro lado, o ExoT é o gene mais prevalente do TTS3 presente em *P. aeruginosa* sendo encontrado em ≥ 92% dos isolados.[54] Possui como função inibir a internalização por células epiteliais e macrófagos.[60] A proteína produzida pelo o ExoT inativa três GTPases na célula do hospedeiro e como consequência desta inativação há ruptura reversível do citoesqueleto que inibe a migração celular e induz a deformação da célula.[54] O ExoY é o segundo gene mais abundante em *P. aeruginosa* dentre as exotoxinas, presente em >89% dos isolados. Esta exotoxina contribui para o aumento da patogenicidade aguda da infecção e na célula do hospedeiro esta proteína prejudica a proliferação de células endoteliais e o reparo vascular.[54,60] O ExoU é o principal membro do SST3 por sua elevada patogenicidade no hospedeiro, contribuindo para graves lesões agudas no pulmão e sepse. Isso ocorre porque o ExoU possui atividade de fosfolipase que destrói de maneira irreversível a membrana da célula, causando uma rápida morte celular por necrose.[54,60] Este gene ocorre com baixa frequência nos isolados de *P. aeruginosa* variando entre 24-42% dos isolados, no

entanto, quase 100% dos clones ST235 possuem este gene. O ExoU atua reprimindo a caspase 1, ativando o inflamassoma NLRC4, e inibindo a liberação das interleucinas IL-1β, IL-18 e padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) pro-inflamatórios, forma a suprimir a resposta imune do hospedeiro.[60]

1.3.3 Interação entre bactérias

O *quorum sensing* (QS) é um sistema que permite a comunicação entre células bacterianas. O QS funciona através da liberação de pequenas moléculas, conhecidas como auto indutores, que coordenam a expressão de múltiplos genes envolvidos no comportamento da comunidade bacteriana, virulência e formação de biofilme.[20] *P. aeruginosa* possui quatro sistemas de QS (Las, Rhl, Pqs e Iqs) que são interconectados por hierarquia. E nesta hierarquia, a principal sinalização é função do sistema Las, que atua regulando positivamente a expressão de três outros sistemas. De maneira similar, o sistema Iqs potencializa o sistema Pqs, e este o sistema Rhl, enquanto o Rhl regula o Pqs negativamente.[54,69,70] Esta rede de comunicação envolve vários sistemas regulatórios que diretamente ou indiretamente controlam a expressão de mais de 10% do genoma de *P. aeruginosa* e aproximadamente 20% do seu proteoma.[71-73] O QS possui um papel central na virulência de P*. aeruginosa*, por regular a liberação de múltiplos fatores de virulência (elastase, protease alcalina, exotoxina A, ramnolipídeos, piocianina e lipases) e promover a maturação do biofilme.[20,74,75]

O biofilme é uma forma específica de organização de bactérias, agregadas e encapsuladas em substâncias poliméricas extracelulares que podem auxiliar bactérias patogênicas a superar condições desfavoráveis, como flutuação de temperatura, déficit de nutrientes e ação de antibióticos, em superfícies bióticas e abióticas.[20,76,77] *P. aeruginosa* apresenta alta capacidade de formação de biofilme, o que torna esta bactéria altamente resistente a antibióticos, desinfetantes e resposta imune do hospedeiro.[20,54]

1.4 Clones de alto risco de *P. aeruginosa*

A estrutura populacional de *P. aeruginosa* é classificada como epidêmica não clonal, composta por um pequeno número de clones dispersos que são selecionados a partir de um contexto que envolve muitos genótipos não relacionados. Embora seja não clonal, um pequeno grupo de clones englobando 11 STs (ST - *sequence type*) (ST111, ST175, ST233, ST235, ST244, ST277, ST298 ST308, ST357, ST395 e ST654) são classificados como STs de alto risco ou clones globais.[13,14] Clones globais ou clones de alto risco possuem fatores biológicos que contribuem para um aumento no seu "*fitness*", fornecendo sobrevivência daquela linhagem e eliminando outros isolados da mesma espécie. Estas habilidades fazem com que estas bactérias consigam superar outras bactérias e assim se tornando a principal parte da população de bactéria daquele hospital, por exemplo, inicialmente atuando como um colonizador e subsequentemente levando a infecção.[78] Clones de alto risco que possuem genes de resistência antimicrobiana superam outros clones que não o possuem em um ambiente em que este gene é requerido. Em razão de muitos dos genes de resistência antimicrobiana estarem presentes em MGEs, como a sequência de inserção, plasmídeos e transposons, estes MGEs exibem um papel chave na disseminação dos genes de resistência antimicrobiana. Os clones de alto risco podem transferir os genes de resistência antimicrobiana por transferência vertical e transferência horizontal.[78]

Estes clones de alto risco representam linhagens distintas dentro da estrutura populacional de *P. aeruginosa* por apresentarem maior capacidade de adquirir e manter genes de resistência, ou elementos genéticos móveis que carregam os genes de resistência, quando comparado com a população geral de *P. aeruginosa*.[79,80] O ST mais prevalente é o ST235. Isto se deve à extensão de sua disseminação em diferentes partes do mundo e por estar associado com quase 100 diferentes elementos de resistência adquirida, característica que demonstra o quão difícil é o tratamento das infecções decorrentes deste clone e sua elevada plasticidade genômica.[14] Está elevada plasticidade genômica foi recentemente associada com o gene DprA que contribui para que este clone tenha maior facilidade em adquirir e manter elementos genéticos móveis quando comparado a outros clones.[13,14] O gene *dprA* é necessário para a proteção do DNA de fita simples recebido e interage com a recombinase RecA para integrar o DNA adquirido ao cromossomo hospedeiro de espécies bacterianas,

como *Streptococcus pneumoniae*. A RecQ é uma helicase de DNA que afeta a transformação do DNA em bactérias gram-negativas e gram-positivas.[14] Além da dificuldade do tratamento das infecções ocasionadas por isolados do ST235, pois frequentemente exibem fenótipos multirresistente (MDR – *multidrug-resistant*) ou extensivamente resistente (XDR - *extensively drug-resistant*). De acordo com a classificação de Magiorakos e colaboradores, a definição de MDR é atribuída quando os isolados exibem fenótipo de resistência a 1 agente antimicrobiano em ≥3 classes, por outro lado, o fenótipo XDR é atribuído quando os isolados exibem o fenótipo de resistência a pelo menos 1 agente em todas as categorias antimicrobianas, exceto duas ou menos.[81] A linhagem ST235 é caracterizada pela elevada virulência e parte desta virulência é atribuída ao T3SS, associada ao gene ExoU que é encontrado em praticamente todos os isolados desta linhagem.[13,14]

A linhagem ST111 é a segunda mais dispersa após o ST235, sendo reportada em 20 países da Europa, Ásia e América. Isolados pertencentes ao ST111 geralmente estão associados com a metallo-β-lactamase VIM-2 e são fortemente associados com o fenótipo MDR/XDR. Embora não possuam o gene *exoU*, estes isolados possuem o exoS e apresentam um perfil de virulência moderado.[13] Estes dois clones representam ~6,88% dos clones reportados mundialmente de acordo com os dados do pubMLST. Os demais clones de alto risco apresentam características específicas e são encontrados em regiões mais especificas do mundo.

1.5 Estratégias de tratamento com foco no controle da virulência de *P. aeruginosa*

Embora *P. aeruginosa* possua inúmeros tipos de fatores de virulência, a busca por um alvo candidato para o desenvolvimento de terapias antivirulência é desafiadora, pois é necessário entender seu envolvimento no processo de patogênese.[20,60] O desenvolvimento de terapias com a virulência como alvo tem focado em 3 principais mecanismos: T3SS, *quorum sensing* e formação de biofilme. Entretanto, outros fatores de virulência que são únicos em *P. aeruginosa* estão sendo estudados também, como: sideróforos, proteases específicas e exopolissacarídeos. As terapias antivirulência tem como objetivo interromper as vias críticas da patogênese, mas não essencialmente o crescimento da bactéria, adotando as seguintes estratégias: interferência na expressão de fatores de virulência, neutralização de toxinas, inibição

do *quorum sensing* e biofilme, contribuindo para prevenir a colonização e infecção. Dentre os principais alvos candidatos, a interrupção da função do T3SS se destaca, pois este sistema de secreção é muito relevante para a patogênese em humanos. Um exemplo é o anticorpo monoclonal bivalente de imunoglobulina humana IgG1k (MEDI3902 [BiS4aPa]) que tem como alvo bi-específico PcrV e Psl de *P. aeruginosa*.[20,82] Uma segunda estratégia é a inibição do *quorum sensing* e formação do biofilme. A inibição destes mecanismos pode atenuar significativamente a virulência bacteriana. As drogas candidatas M34 e clofoctol atuam inibindo o sinal de quinolona de *Pseudomonas* (PQS - *Pseudomonas quinolone signal*) do inglês “Pseudomonas Quinolone Signal (PQS)” dependente de *quorum sensing*, que regula a virulência e o desenvolvimento de biofilme.[20]. A terceira estratégia tem como objetivo neutralizar fatores de virulência secretados, como por exemplo sideróforos, proteases e toxinas. Um alvo estudado é a pioverdina que é um importante fator de virulência de *P. aeruginosa*, pois atua sequestrando ferro do hospedeiro. Para este fator de virulência em específico três pequenas moléculas foram descobertas como inibidores de pioverdina, sendo elas LK11, LK31 e LK31a.[20,83]

1.6 *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae pertence à família das Enterobacteriaceae.[9] *K. pneumoniae* é uma bactéria fermentadora, gram-negativa, encontrada em diversos ambientes, como solo, água e em diferentes espécies de plantas, insetos, aves, répteis e mamíferos. São colonizadoras naturais da microbiota intestinal de indivíduos saudáveis, sendo assim um patógeno oportunista.[84] Desde a primeira descrição de *K. pneumoniae* associada a pneumonia (Carl Friedländer em 1882), este patógeno permanece como um dos principais microrganismos associados a IRAS no mundo.[9]

Em *K. pneumoniae* novos genes de resistência a antimicrobianos foram identificados pela primeira vez, como os genes que conferem resistência a carbapenemases KPC, OXA-48 e NDM-1.[85] Esta característica está associada à elevada plasticidade genômica deste patógeno. O genoma de *K. pneumoniae* possui entre 5-6 Mbp e codifica entre 5.000 e 6.000 genes, dos quais aproximadamente 1.500 genes são compartilhados por todos os membros desta espécie (genoma central).[9] Os genes remanescentes são associados com o genoma acessório.

1.7 Resistência a antimicrobianos em *K. pneumoniae*

O aumento drástico na prevalência de infecções do tipo IRAS causadas por patógenos multirresistentes MDR e XDR pertencentes a patógenos do grupo das *Enterobacteriaceae* se tornou uma preocupação mundial.[86] A Organização Mundial da Saúde (OMS) classificou as enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos (ERC) como prioridade para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos.[87] Um dos principais patógenos do grupo das *Enterobacteriaceae,* é espécie *K. pneumoniae*, para a qual a taxa global de resistência alcançou 70%, com taxas de mortalidade também altas, variando entre 40-70%.[88,89] Ao longo dos anos, o fenótipo MDR tem sido comum na espécie de *K. pneumoniae*, no entanto, o grave problema emergiu com as cepas de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos (KpRC) ao lado de resistência para aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, colistina e cefalosporinas.[90]

A resistência é um processo complexo e multifatorial, compreendendo a resistência intrínseca e resistência adquirida.[86] A resistência intrínseca para os carbapenêmicos pode envolver diferentes conjuntos de genes, sendo que dentre as principais mutações estão aquelas que ocorrem nas porinas ompK35 e ompK3. Já a resistência à colistina envolve mutações nos genes associados ao lipídeo A (*phoPQ*, *pmrAB*, *mgrB* e *ccrAB*), a resistência às fluroquinolonas envolve mutações nos genes da topoisomerase (*gyrA*, *gyrB*, *parC* e *parE*), e a resistência a aminoglicosídeos pode ser decorrente de alterações nos genes *acrAB-TolC*, *kpnEF*, *kpnO*.

A resistência adquirida é o principal mecanismo que confere resistência à *K. pneumoniae*.[9] Os genes adquiridos são carreados por um conjunto de elementos genéticos móveis, como plasmídeos, transposons, integrons, sequências de inserção, prófagos, IG e elementos conjugativos integrativos, e podem ser facilmente disseminados inter e intra espécies.[37] E neste cenário os plasmídeos são os elementos centrais responsáveis por esta resistência, embora determinados genes carreados por elementos genéticos móveis também possam se integrar no cromossomo bacteriano.[9]

Como mencionado anteriormente, a KpRC é o principal problema em IRAS. As três principais carbapenemases por trás do sucesso das KpRC são: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs), *New Delhi metallo-beta-lactamase* (NDM) e

oxacillinase-48 (OXA-48).[91] O gene *bla*$_{KPC}$ é o gene mais disseminado, sendo as variantes mais comuns o *bla*$_{KPC-2}$ e *bla*$_{KPC-3}$.[86] Os principais países que sofrem com a disseminação do gene *bla*$_{KPC}$ são: Brasil, Itália, Israel Grécia e Bélgica.[9,92] O sucesso por trás da disseminação do gene *bla*$_{KPC}$ está associado diretamente aos transposons Tn*4401* que flanqueiam este gene e aos plasmídeos pKpQIL, frequentemente responsáveis pela disseminação deste gene.[86,93] Por outro lado, OXA-48 é mais disseminada nas regiões da Europa, Norte da África e Oriente Médio[91] e NDM-1 foi reportada inicialmente na Índia em 2009, e rapidamente se espalhou ao redor do mundo, sendo endêmica na Índia, Paquistão e Bangladesh.[94]

1.8 Fatores de virulência em *K. pneumoniae*

A patogenicidade de *K. pneumoniae* está relacionada a fatores de virulência específicos que permitem que a bactéria escape do sistema imune inato do hospedeiro.[95,96] Os fatores de virulência em *K. pneumoniae* incluem cápsulas, lipopolissacarídeo (LPS), fimbrias e sideróforos.[96] Estes fatores associados à patogenicidade de *K. pneumoniae* podem ser encontrados tanto no genoma central (genes compartilhados por todas ou quase todas as cepas) e genoma acessório (genes carregados por poucas cepas).[9,97]

A cápsula está envolvida com a proteção da bactéria contra a fagocitose, e correspondem a polissacarídeos, denominados antígenos-K, atualmente classificados em 138 tipos sorológicos. Dentre os vários tipos de antígenos-K, os antígenos K1 e K2 estão associados com graves infecções por estarem muito relacionados a clones hipervirulentos.[9,97] O LPS protege a bactéria da ruptura mediada pelo sistema complemento. A produção do LPS é regulada pelo gene uridine diphosphate galacturonate 4-epimerase (*uge*), que quando inativado reduz a capacidade de *K. pneumoniae* causar infeções do trato urinário, pulmões e sepse.[97] As fímbrias são mediadores de adesão, ligadas à membrana externa da parede bacteriana e possuem papel na formação do biofilme.[98] A principal fímbria expressa em *K. pneumoniae* é a fímbria do tipo 1, sendo encontrada em 90% das cepas de *K. pneumoniae* e associada à aderência em vários tipos de células epiteliais, especialmente no epitélio de bexiga.[97,99]

Em *K. pneumoniae*, sistemas sideróforos compreendem moléculas quelantes de ferro que podem capturar ferro competitivamente de proteínas do hospedeiro ou de outras fontes e receptores de superfície para internalização. Quatro sistemas foram descritos em *K. pneumoniae*: Ent (sideróforo central; codificado por *ent*) e yersiniabactina, aerobactina e almochelina (sideróforos acessórios ou adquiridos; codificados por *yersiniabactin* [*ybt*], *aerobactin* [*iuc*] e *salmochelin* [*iro*], respectivamente). Todos os três sistemas acessórios podem aumentar a virulência em modelos murinos.[9]

1.9 Clones de alto risco de *K. pneumoniae*

Infecções causadas por *K. pneumoniae* são decorrentes de múltiplos clones amplamente distribuídos ao redor do mundo. No entanto, um subconjunto de clones contribui de maneira desproporcional para a ocorrência de doenças, os chamados clones globais ou clones de alto risco.[9] O sucesso epidemiológico destes clones ocorre através de dois caminhos evolutivos diferentes: clones de *Klebsiella pneumoniae* multirresistente (Kp-MDR) e clones *Klebsiella pneumoniae* hipervirulenta (Kphv). Dentre os clones que apresentam características Kp-MDR podemos destacar os grupos clonais (GC) GC258, GC147 e GC101, enquanto para as características de Kphv podemos destacar GC23, CG65 e CG86.[84] Estes 6 GC abrangem 19 STs, sendo 11 STs associados aos clones Kp-MDR (ST11, ST101, ST147, ST258, ST273, ST392, ST512, ST1685, ST2016, ST2017 e ST2502), e 8 STs associados a Kphv (ST23, ST25, ST26, ST57, ST65, ST86, ST163 e ST3994). A relevância dos GC ou clones de alto risco pode ser observada no estudo realizado na Europa que demonstrou que quase 70% dos isolados que carregavam carbapenemases foram concentrados nas linhagens ST11, ST15, ST101, ST258 e ST512.[100]

1.10 *Caenorhabditis elegans* como modelo *in vivo*

Um dos modelos de invertebrados mais simples é o nematoide *C. elegans*. Este nematoide com reprodução hermafrodita, de até 1 milímetro de comprimento e normalmente encontrado no solo, é muito utilizado em diferentes áreas do conhecimento.[101] Seu sucesso como modelo anima está associado a condições de

crescimento simples, tempo de geração rápido e diversas ferramentas genéticas e moleculares para a sua manipulação.[101] Ao lado disso, os baixos custos de manutenção e as restrições éticas que envolvem os modelos murinos, tornam *C. elegans*, favorecem a utilização deste nemátodo como modelo para a análise da virulência em *P. aeruginosa*.[102-105] Na fase larval, o *C. elegans* consegue se desenvolver muito bem utilizando como fonte de alimento apenas cepas de *P. aeruginosa*, por outro lado, adultos podem sofrer redução no seu tempo de vida dependendo das características genéticas das cepas avaliadas.[106] Usando o modelo de infecção experimental *C. elegans* para avaliar a patogenicidade de cepas de *P. aeruginosa*, são três os principais mecanismos de morte avaliados e estes dependem de uma variedade de mecanismos genéticos e fatores ambientais.[107] Por exemplo, em meio de cultura de baixa osmolaridade (meio de crescimento de nemátodo, NGM) e com a cepa UCBPP-PA14, a cepa é acumulada no lúmen do intestino de *C. elegans*, levando os vermes a uma morte lenta em um período de 2-3 dias; este tipo de ensaio é denominado de *slow killing*.[108] Por outro lado, quando o ensaio é realizado usando um meio rico e de elevada osmolaridade, os vermes são rapidamente mortos pela UCBPP-PA14 devido a liberação de toxinas de baixo peso molecular, e este tipo de ensaio é denominado como *fast killing.* O terceiro mecanismo de morte, é bem descrito usando a cepa de referência PAO1, e neste o meio de cultura *brain-heart infusion* (meio altamente nutritivo), a cepa PAO1 mata o *C. elegans* por um mecanismo que envolve a geração de uma ou mais neurotoxinas, como o cianeto de hidrogênio.[109,110]

Diferentes trabalhos relatam genes envolvidos no processo de morte do *C. elegans* em decorrência da infecção por *P. aeruginosa*.[111,112] É consenso que os genes necessários para a patogenicidade podem variar de acordo com a cepa de *P. aeruginosa*, sendo considerado um processo multifatorial e combinatório, relacionado a um conjunto de genes que interagem em diferentes contextos genéticos.[107,108,113]

1.11 Objetivos

1. Comparar o genoma acessório dos clones de alto risco de *P. aeruginosa* (ST111, ST175, ST233, ST235, ST244, ST277, ST298 ST308, ST357, ST395 e ST654) com genomas de *sequence type* considerados esporádicos utilizando

genomas disponíveis em bancos de dados públicos para a identificação de possíveis marcadores de virulência;

2. Identificar isolados clínicos pertencentes a clones de alto risco e esporádicos e avaliar o papel de possíveis marcadores de virulência utilizando o modelo de infecção *Caenorhabditis elegans* e a análise de expressão gênica;

3. Comparar o genoma acessório de isolados de *K. pneumoniae* pertencentes aos complexos clonais GC258, GC147, GC101, GC23, CG65 e CG86 com clones considerados menos virulentos utilizando genomas disponíveis em bancos de dados públicos para a identificação de possíveis marcadores de virulência;

4. Avaliar a presença e a expressão de genes envolvidos na transição colonização/infecção por isolados de *K. pneumoniae* por meio da análise de isolados envolvidos ou não em episódios de infecção posteriores a sua identificação como colonizadores no intestino de pacientes.

2 MÉTODOS

2.1 Identificação de isolados clínicos, perfil de sensibilidade a antimicrobianos e seleção de isolados para análises experimentais

Os isolados de *P. aeruginosa* considerados neste estudo foram identificados no setor de Microbiologia do Laboratório Clínico do Hospital Israelita Albert Einstein (HIAE) entre 2007 e 2021. Estes isolados são provenientes de sangue, lavado brônquico e secreção traqueal. A identificação da espécie como *P. aeruginosa* foi realizada por *matrix-assisted laser desorption/ionization* (MALDI-TOF MS) (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA). A avaliação do perfil antimicrobiano foi realizada pelo método de disco-difusão para imipenem e meropenem e método automatizado Vitek 2 XL System (bioMérieux, France) para os seguintes antimicrobianos: ceftazidima, cefepima, amicacina, gentamicina e ciprofloxacina. A interpretação dos resultados de antibiograma foi realizada de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) vigente de cada ano e após a implementação do BrCAST/EUCAST a interpretação foi realizada seguindo este protocolo. Todos os dados microbiológicos (identificação, antibiograma e testes moleculares) dos isolados estão armazenados em dois sistemas distintos: LabTrak (até 2017) e Cerner Millennium® (a partir de 2018). A partir desses bancos de dados a equipe do setor de microbiologia do laboratório clínico selecionou os isolados de *P. aeruginosa* disponíveis para este estudo. Os dados contidos nas listas disponibilizadas são: data e sítio de isolamento, perfil de sensibilidade aos antimicrobianos ceftazidima, cefepima, amicacina, gentamicina, ciprofloxacina, meropenem e imipenem e ala hospitalar dos pacientes com culturas positivas para *P. aeruginosa* internados no HIAE entre janeiro de 2007 e dezembro de 2021.

Como critério de inclusão, todas as culturas onde houve crescimento positivo para *P. aeruginosa* entre janeiro de 2007 a dezembro de 2021 no HIAE foram consideradas. Foram excluídos os isolados de *P. aeruginosa* provenientes do mesmo paciente isolados no mesmo dia, do mesmo sítio e com mesmo perfil de sensibilidade. Com estes dados foram estimados: 1) Total de isolados de *P. aeruginosa* no HIAE no período estudado; 2) Número de isolados provenientes de diferentes tipos de amostras clínicas; e 3) Número de isolados resistentes e sensíveis aos carbapenêmicos.

Para os ensaios experimentais, os isolados bacterianos foram selecionados de acordo com a sua disponibilidade no banco de cepas do laboratório clínico e viabilidade da bactéria.

2.2 Eletroforese de campo pulsado

O eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE - *pulsed-field gel electrophoresis*) foi realizado como descrito previamente.[114] Os inóculos bacterianos foram feitos em tubos contendo 5mL meio de cultivo Luria-Bertani (LB) deixamos em estufa 37°C por 18 horas a 180rpm. No dia seguinte, foi quantificado a densidade óptica (DO) de cada cepa. Inicialmente uma cubeta com 1mL de meio LB estéril que foi usado para o inóculo no dia anterior, foi usado como branco no espectrofotômetro (Pharmacia Biotech). Após calibrar o espectrofotômetro com o branco, uma alíquota de 0,1mL foi retirada de cada inóculo bacteriano para quantificar DO. Este volume de inóculo foi adicionado na cubeta que continha 0,9mL de caldo LB estéril, foi realizado *up-down* e posteriormente foi quantificado a DO para cada cepa seguindo este procedimento. Após quantificado o valor da DO era corrigido para 10x uma vez que o inóculo bacteriano foi diluído 10x.

Após a quantificação, os inóculos foram centrifugados por 15 minutos a 3.000rpm. O sobrenadante foi retirado e o precipitado contendo as células bacterianas foram ressuspendidas em 1mL de solução salina (NaCl 0,9%) e centrifugado por 5 minutos a 3.000rpm para a retirada de resquícios de meio de cultura. O sobrenadante foi retirado e 250µL de salina foi adicionado em cada precipitado. Em um outro microtubo, foi adicionado 300uL de tampão TEM (EDTA 0,5M pH 7, EDTA 0,5M pH 8, Tris base 1M pH 7, Tris base 1M pH 8, NaCl 4,0 M, água destilada), 340µL de agarose *low melt* 2% e 3,5µL da amostra. Rapidamente, uma alíquota dessa solução foi adicionada nos moldes de acrílico para PFGE (*Bio-Rad Laboratories*) para a formação dos *plugs*. Os moldes contendo as amostras foram incubadas 40 minutos a 4°C. Em seguida, os *plugs* foram cuidadosamente removidos dos moldes e colocados em placas de microdiluição de 12 poços contendo tampão EC (EDTA 0,5M pH 7,0, EDTA 0,5M pH 8,0, Tris base 1M pH 7,0, Tris base 1M pH 8,0, NaCl, N-lauril sarcosil, Brij 58, deoxicolato de sódio, água destilada) e incubados por 5 horas à 37°C. Os *plugs* foram lavados 3 duas vezes com tampão CHEF TE 1X (EDTA 0,5M pH 7, EDTA 0,5M

pH 8, Tris base 1M pH 7,0, Tris base 1M pH 8,0, água destilada), com 30 minutos de intervalo entre as lavagens e após isso os *plugs* foram cortados 1/3 do tamanho e colocados em uma placa de microdiluição de 96 poços contendo 180uL de tampão ES (EDTA 625 mM pH 9,3, N-lauril sarcosil 5%) e 20uL da enzima proteinase K (Uniscience Corporation, Miami, Flórida, USA). Esta placa contendo os *plugs* foi incubada por 18 horas a 50°C.

No dia seguinte, o tampão ES e a proteinase K foram removidos e adicionado 200uL de tampão CHEF TE 1X para a lavagem dos *plugs*. Esta lavagem foi repetida 4 vezes com 1 hora de intervalo entre as lavagens. Foram adicionados aos *plugs* 200µL de tampão CHEF TE 1X e armazenados a 4°C até o momento da digestão.

A próxima etapa consistiu na preparação dos *plugs* para a digestão enzimática com enzima de restrição. O tampão CHEF TE 1X foi retirado e os *plugs* foram lavados 4 vezes com 200µL do tampão DNS (Tris base 1M pH 8, cloreto de magnésio 1M, H2O destilada) com 1 hora de intervalo entre as lavagens. Após isso, o tampão DNS foi substituído por uma solução contendo 10µL de tampão da enzima de restrição e 40µL de água ultrapura e os *plugs* foram incubados por 1 hora a 4°C. Em seguida, esta solução contendo o tampão da enzima foi substituída por outra preparada da mesma maneira, porém contendo 5U da enzima de restrição *SpeI* (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). A placa foi incubada por 1 hora à 4°C e logo após, incubada à 37°C por 18 horas.

No dia seguinte, os *plugs* foram retirados dos poços da placa e foram fixados no pente de corrida para PFGE com agarose a 1%. Em cada gel foi incluído ainda um padrão de peso molecular Lambda PFG *Ladder* (Ladder sigma; New England Biolabs, Inc.). O gel na concentração de 1% foi preparado com agarose ultrapura e solução TBE 0,5X (TBE 10X e água destilada – EDTA, Tris base, ácido bórico, água destilada). A corrida foi realizada no aparelho Bio-Rad CHEF DR III com 2100mL de tampão TBE 0,5X (TBE 10X e H2O destilada – EDTA, Tris base, ácido bórico, água destilada) nas seguintes condições: 6 V/cm, com tempos de pulso variando de 5 segundos a 90 segundos por 24 horas. Ao término da corrida, o gel de agarose foi retirado do aparelho CHEF DR III e ficou imerso em brometo de etídeo por 30 minutos. Em seguida, foi emergido em água por 30 minutos e posteriormente o gel foi visualizado no fotodocumentador (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA).

A análise foi realizada através da comparação do padrão de bandas obtidas para cada isolado. Os perfis foram analisados manualmente e por meio do

software Bionumerics versão 7.1 (Applied Maths, Kortrig, Bélgica). O agrupamento foi criado utilizando o grupo de pares não ponderados com médias aritméticas (UPGMA) com tolerância customizada de 1% e otimização de 1%. A relação do DNA foi calculada baseada no coeficiente de similaridade (DICE), e os isolados foram considerados geneticamente relacionados se o coeficiente de similaridade (DICE) foi ≥80% baseados no critério de Tenover et al.[115,116]

2.3 Classificação dos isolados como endêmicos e esporádicos

Os isolados clínicos tipados por PFGE foram classificados em duas categorias dependendo do perfil de bandas obtido pelo PFGE: (I) endêmicos, para isolados que apresentaram ≥80% de similaridade no padrão de bandas obtido por PFGE, e foram reportados em diferentes pacientes em mais de uma ocasião ao longo do tempo (anos diferentes), (II) esporádicos, quando o perfil de bandas obtido por PFGE não foi identificado em anos diferentes.

2.4 Seleção de genomas depositados em bancos de dados públicos para análises *in silico*

Para a seleção dos genomas de *P. aeruginosa* para as análises *in silico*, foi realizado o *download* de todos os genomas deste patógeno que estavam disponíveis no banco de dados *Reference Sequence* (RefSeq) da *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) em novembro de 2022. Nesta data, foram baixados 482 genomas completos, 99 genomas a nível de cromossomo, 4.715 *contigs* e 1.953 *scaffolds*, totalizando 7.249 genomas de *P. aeruginosa*. Os metadados associados a estes genomas (data de isolamento, hospedeiro e localização geográfica) foram coletados do NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/isolates/) quando disponíveis. O mesmo procedimento foi realizado para obter os genomas de *K. pneumoniae*. Foram obtidos 15.044 genomas de *K. pneumoniae*, sendo: 1.380 são genomas completos, 151 genomas a nível de cromossomo, 9.202 *contigs* e 4.311 *scaffolds*.

Para evitar genomas de baixa qualidade ou genomas com contaminação, os genomas obtidos do RefSeq de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* foram submetidos a uma etapa de avaliação de qualidade. Para isto foi utilizado o *pipeline* CheckM disponível em (https://github.com/Ecogenomics/CheckM) no qual genomas de *P. aeruginosa* com >95% de integridade, sendo a integridade definida como uma estimativa da fração de genes que se espera que estejam lá e que foram realmente encontrados e com <5% de contaminação foram mantidos para futuras análises, a contaminação se baseia na identificação do número de genes de cópia única, que deveriam estar lá apenas uma vez.[117] Para *K. pneumoniae* os parâmetros utilizados no CheckM foram: ≥95% de integridade e com <5% de contaminação, genomas que passaram por esta etapa foram mantidos e passaram por um segundo filtro.[118] Neste segundo filtro para os genomas de *K. pneumoniae* foram avaliadas 4 variáveis (https://bigsdb.pasteur.fr/klebsiella/genome-quality-check/) (Tabela 1).

Tabela 1. Critério de qualidade para remover genomas de baixa qualidade

Critério	**Método**	**Critério de aceitação**	**Critério de rejeição**
Identificação de espécie	Kleborate	Identidade aceita	Identidade fraca
Qualidade de genoma - nº de *contigs*	Kleborate	≤ 500 *contigs*	> 500 *contigs*
Qualidade de genoma - tamanho do genoma	Kleborate	4.969.898; 6.132846 pb	< 4.969.898 or > 6.132.846 pb
Qualidade de genoma - conteúdo de GC%	QUAST	56,35- 57,98%	< 56,35 ou > 57,98%

2.5 *Multilocus sequence typing*

Para a tipagem dos 7.249 genomas de *P. aeruginosa* foi usado o *script* disponível em (https://github.com/tseemann/mlst), usando o esquema de *multilocus sequence typing* (MLST) para *P. aeruginosa* obtido através do *Public databases for molecular typing and microbial genome diversity* (PubMLST).[119] Para selecionar os genomas de alto risco foi considerada a definição proposta por Del Barrio-Tofiño et al. e Treepong et al. que juntos descrevem 11 STs que são considerados de STs de alto risco sendo eles: ST111, ST175, ST233, ST235, ST244, ST277, ST298 ST308, ST357, ST395 e ST654.[13,14]

A tipagem por MLST para os 15.044 genomas de *K. pneumoniae* foi realizado com o mesmo *script* utilizado para *P. aeruginosa*, mas o esquema usado para tipagem foi o esquema publicado pelo Institut Pasteur[120] para *K. pneumoniae*. Para a

seleção dos clones de alto risco de *K. pneumoniae* foi usado a revisão de literatura publicada por Arcari et al.[84] Nesta revisão os autores destacam os grupos clonais (GC) GC23, GC65, GC86, GC101, GC147 e GC258. Estes 6 grupos clonais abrangem 19 STs, sendo eles: ST11, ST23, ST25, ST26, ST57, ST65, ST86, ST101, ST147, ST163, ST258, ST273, ST392, ST512, ST1685, ST2016, ST2017, ST2502 e ST3994.

2.6 Seleção de genomas esporádicos

Para minimizar o viés de amostragem de determinados STs e de região geográficas, genomas considerados como STs esporádicos (aqui representados pelos STs que não foram classificados como STs de alto risco tanto para *P. aeruginosa* como para *K. pneumoniae*) nós reamostramos a coleção para um conjunto de dados "não redundante". Está reamostragem foi realizada da seguinte forma: quando dois ou mais genomas apresentassem o mesmo tipo de ST, ano de isolamento, hospedeiro, país de isolamento e se disponível sítio de isolamento, apenas um dos genomas era selecionado, sendo esta seleção realizada aleatoriamente.

2.7 Anotação dos genomas obtidos em banco de dados públicos

Para anotar os genomas de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* a ferramenta utilizada foi o *Rapid Prokaryotic Genome Annotation* – Prokka (Universidade de Melbourne, Austrália), que coordena um conjunto de outros programas para realizar uma anotação confiável dos genomas bacterianos (https://github.com/tseemann/prokka) com parâmetros *default*.[120] O Prokka utiliza ferramentas externas, como o Prodigal[121] para identificar as sequências codificadoras dos genomas bacterianos, o RNAmmer[122] para a identificação de genes ribossomais, o ARAGORN[123] para a identificação de RNAs transportadores, e permite identificar sistemas CRISPR-Cas, uma característica que será analisada nos genomas uma vez que este sistema exibe um papel importante na formação do genoma acessório.[124] Como resultado o Prokka fornece 12 arquivos de saída, contendo dados relacionados à sequência de nucleotídeos bem como dados de proteínas no formato FASTA. O

arquivo de sequências anotadas do genoma é apresentado como *generic feature format version* 3 (GFF3) que contém as sequências e as anotações de cada genoma avaliado.

2.8 Análise do pangenoma para a determinação do genoma acessório dos genomas obtidos em banco de dados públicos

Para realizar a análise do genoma acessório o *software* escolhido foi o Roary (Pathogen Informatics, Hinxton, Cambs., UK) que é um *software* disponível em (https://sanger-pathogens.github.io/Roary/).[125] Para realizar a análise do pangenoma o Roary utiliza como arquivo de entrada o genoma anotado no formato GFF3, que é produzido pelo o Prokka (conforme o tópico 2.7 Anotação dos genomas obtidos em banco de dados públicos). A análise do pangenoma foi realizada com os seguintes parâmetros: -cd 95 (parâmetro que define a porcentagem de isolados que precisam ter o gene para que ele seja classificado como gene pertencente ao genoma central), -i 90 (porcentagem de identidade da sequência por blastp), -s (não adicionar genes parálogos). Definidos estes parâmetros o Roary irá dividir o pangenoma em 4 categorias: a primeira é denominada como *core* genes e representa o conjunto de genes presentes entre 99 – 100% dos isolados avaliados, a segunda categoria é classificada como *soft core* genes, que são os genes presentes 95 - >99% dos isolados avaliados, a terceira categoria é chamada *shell genes*, que são genes presentes em 15 - <95% dos isolados avaliados, e a quarta categoria é classificada como genes *cloud*, que são genes presentes <15% dos genomas avaliados. As categorias *soft*, *shell* e *cloud* contém os genes pertencentes ao genoma acessório. A matriz de presença e ausência gerada pelo Roary foi usada como *input* para o *software* Scoary (GNU - *General Public License*)[126] que foi usado com os parâmetros “-collapse” e demais parâmetros usados como *default*. Este *software* identifica genes ou polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs - *single nucleotide polymorphism*) associados a determinadas características realizando um *pan-genome wide association studies* (Pan-GWAS).

2.9 Avaliação da viabilidade e estoque dos isolados de *P. aeruginosa*

Os isolados bacterianos provenientes das amostras clínicas são sistematicamente armazenados pelo setor de microbiologia do HIAE no banco de cepas. Após serem isolados das amostras clínicas e identificados, alguns isolados são guardados em *freezer* -80°C em criotubos contendo 1mL de meio de cultivo com glicerol (concentração final de 20%). Depois de selecionados os isolados de *P. aeruginosa* de interesse no banco de cepas, 50µL dos inóculos foram semeados por esgotamento em placas de ágar MacConkey e incubadas a 37°C por 18 horas. O crescimento foi observado pelo aparecimento de colônias no meio de cultura. Em seguida, uma colônia isolada foi inoculada em 1mL de meio Luria Bertani (LB) (Kasvi, São Paulo, Brasil) líquido e incubado a 37°C por 18 horas. No dia seguinte, o inóculo foi transferido para criotubos contendo glicerol a uma concentração final de 20% e estocado a -80°C até a realização dos experimentos.

2.10 Extração de DNA genômico dos isolados bacterianos

O DNA genômico (gDNA – *genomic DNA*) dos isolados de *P. aeruginosa* foram extraídos como descrito por Marmur 1961.[127] Os inóculos foram feitos a partir das suspensões bacterianas puras estocadas. Os inóculos foram feitos em tubos de 15mL contendo 5mL meio de cultivo LB e deixados em um *shaker* orbital a 37°C por 18 horas a 180 rotações por minuto (rpm). No dia seguinte, os inóculos foram centrifugados a 12.000rpm por 1 minuto e o meio de cultivo foi retirado; o *pellet* foi lavado uma vez com água ultra-pura estéril para a retirada de resquícios de meio de cultura. Em seguida, os precipitados foram ressuspendidos em 600µL *Ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA) (Merck, Darmstadt, Alemanha) com salina (Merck, Darmstadt, Alemanha) (0,01M EDTA; 0,15M salina, pH=8,0); foram adicionados 80µL de *Sodium dodecyl sulfate* (SDS) (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) em uma concentração de 25% e os microtubos foram submetidos a agitação em vórtex. Após a agitação em vórtex na velocidade máxima, os microtubos foram incubados a 65°C por 10 minutos, sendo agitados em vórtex uma vez durante este tempo. Em seguida, 250µL de cloreto de sódio (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) a uma concentração de 4M e 400µL de clorofórmio (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) foram

adicionados e misturados por vórtex; os microtubos foram colocados em agitador orbital a 1.400rpm por 15 minutos. Em seguida, os microtubos foram centrifugados a 13.000g por 15 minutos, e após a centrifugação a camada superior foi transferida para um novo microtubo de 2mL contendo 400µL de clorofórmio. A solução foi misturada vigorosamente e colocada em centrífuga a 13.000g por 15 minutos; esta etapa do clorofórmio foi repetida uma vez mais. Aproximadamente 500µL da camada superior foi transferida para um novo microtubo contendo 45µL de acetato de sódio (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) a uma concentração de 3M e 300µL de isopropanol (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) gelado (4°C). Os microtubos foram delicadamente invertidos várias vezes até aparecer o DNA precipitado e então foram centrifugados a 13.000g por 10 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente retirado. Após a completa evaporação do isopropanol realizada em Speed Vac (Thermo Fisher Scientific), o *pellet* de DNA foi ressuspendido em 50µL de low-TE (1mM Tris; 0,1 mM EDTA, pH=8,0), tratado com RNAse (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) (10µg/mL) por 15 minutos a 37°C seguido de 15 minutos e 65°C para inativação da RNAse. O gDNA extraído foi estocado a -20°C até a realização dos experimentos.

2.11 Sequenciamento de genomas

O gDNA foi extraído conforme o item (Extração de gDNA dos isolados bacterianos), e a concentração e qualidade foram verificadas por espectrofotômetro NanoDrop™ One (Thermo Fischer Scientific). Em microtubos de 200µL, as amostras foram ajustadas para uma concentração final de 300ng com água livre de nuclease para um volume final de 35µL.

A fragmentação do gDNA para a construção das bibliotecas foi feita por restrição enzimática utilizando o *kit* de reagentes Ion Shear Plus (Thermo Fisher Scientific). Aos 35µL de DNA (300ng) foram adicionados 5µL do tampão e 10µL de Enzime Mix II disponibilizados no *kit*. Depois de homogeneizadas com pipeta, as amostras foram colocadas no termociclador a 37°C por 15 minutos, sem aquecimento da tampa, com o volume final de 50µL ajustado no termociclador. Após este tempo foram adicionados 5µL do reagente para parar a atividade enzimática. Em novos microtubos de 1,5mL foram adicionados os 55µL da amostra juntamente com 99µL de *beads* magnéticas com ponteira de baixa retenção. As amostras foram

homogeneizadas com pipeta e incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram colocadas em uma estante magnética e deixadas por 5 minutos. Após este tempo, o sobrenadante foi cuidadosamente retirado e descartado, e as *beads* foram lavadas com 500µL de etanol 70%. Os microtubos foram rotacionados duas vezes para que as *beads* passassem pelo etanol. Esta lavagem com etanol foi feita duas vezes. O etanol foi retirado e o microtubo permaneceu aberto para completa evaporação do etanol. Em seguida, foram adicionadas às *beads* magnéticas, 25µL de *low* TE disponibilizado no *kit* e as *beads* foram incubadas em temperatura ambiente por 2 minutos. Os microtubos foram colocados novamente na estante magnética e os 25µL de *low* TE contendo o DNA fragmentado foram recuperados e colocados em novos microtubos.

As bibliotecas foram construídas utilizando o *kit Ion Plus Fragment Library* (Ion Torrent™ - Thermo Fisher Scientific™). Neste passo foram ligados os adaptadores e os *barcodes* nos fragmentos de DNA para serem identificados posteriormente. Para cada amostra foi preparada uma solução contendo: 10µL de tampão ligase, 8µL de polimerase *nick repair*, 2µL de adaptadores P1, 2µL de dNTPs, 2µL DNA ligase, 2µL de um *barcode* previamente determinado e água para um volume final de 75µL. Em seguida, as amostras foram colocadas no termociclador a 25°C por 15 minutos e 75°C por 5 minutos. Em novos microtubos de 1,5mL foram adicionados os 100µL da amostra juntamente com 117,6µL de *beads* magnéticas com ponteira de baixa retenção. Esse volume de *beads* magnéticas é indicado pelo fabricante para fragmentos de 200-300 pares de base. As amostras foram homogeneizadas com pipeta e incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram colocadas em uma estante magnética e deixadas por 5 minutos. Após este tempo, o sobrenadante foi cuidadosamente retirado e as *beads* foram lavadas duas vezes com 500µL de etanol 70% como descrito anteriormente. Então, as amostras foram eluídas em 20µL *low* TE.

Os fragmentos de 300 pares de base foram selecionados por e-Gel (Thermo Fisher Scientific). Neste passo, 20µL de cada amostra foi adicionada a 2,5µL de *loading buffer* e 2,5µL de água livre de nuclease. Os 25µL de amostra e 25µL de padrão de bandas foram submetidos a uma eletroforese em um gel (e-Gel) próprio para esta finalidade e quando os fragmentos de tamanho esperado alcançaram o poço da coleta, estes foram recolhidos com pipeta (aproximadamente 25µL) e colocados em um novo microtubo.

Os fragmentos de interesse foram amplificados e selecionados por reação em cadeia da polimerase (PCR - *polymerase chain reaction*). Em cada amostra (25µL) foram adicionados 100µL de Platinum Supermix (Thermo Fisher Scientific) e 5µL de *primer mix*. Neste passo, foram amplificados os fragmentos contendo o adaptador P1 e o *barcode* em cada extremidade. Em seguida, ao produto da PCR foram adicionados 156µL de *beads* magnéticas. As amostras foram homogeneizadas com pipeta e incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram colocadas em uma estante magnética e deixadas por 5 minutos. Após este tempo, o sobrenadante foi cuidadosamente retirado e as *beads* foram lavadas duas vezes com 500µL de etanol 70% como descrito anteriormente. Por fim, as amostras foram eluídas em 20µL *low* TE.

As bibliotecas foram quantificadas no Bioanalyzer 2100, usando o *kit High sensitivity* DNA (Agilent™, Santa Clara, Califórnia, USA). A amplificação clonal das bibliotecas foi realizada usando Ion PI™ Hi-Q™ Chef *kit* (Ion Torrent™ - Thermo Fisher Scientific) e o DNA sequenciado usando o Ion PI™ Chip *kit* v3 e no Ion 540™ Chip o *kit* Ion PI™ Hi-Q™ *sequencing* 200 (Ion Torrent™ - Thermo Fisher Scientific) no sequenciador Ion Proton (Thermo Fisher Scientific) e no Ion GeneStudio S5.

2.12 Montagem dos genomas, anotação e análise do pangenoma das cepas de *P. aeruginosa* sequenciadas

Para a montagem *de novo* dos genomas foram utilizados *scripts* desenvolvidos por nosso grupo.[16] A qualidade das sequências foi avaliada por FastQC versão 0.11.2 (https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/). A montagem dos genomas foi realizada usando SPAdes versão 3.15.2 (https://github.com/ablab/spades). Os parâmetros de qualidade da montagem do genoma foram avaliados pelo programa QUAST (https://github.com/ablab/quast) usando como referência o genoma da cepa de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (número de acesso do GenBank AE004091.2) como referência. Para anotar os genomas de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* foi utilizada a ferramenta Prokka (https://github.com/tseemann/prokka), com parâmetros *default*. Todos os genomas de *P. aeruginosa* montados foram submetidos ao MLST *in silico* usando o *pipeline* disponível em (https://github.com/tseemann/mlst), que implementa o esquema para

MLST de *P. aeruginosa* disponível no PubMLST (https://pubmlst.org/bigsdb?db=pubmlst_paeruginosa_isolates). Para os alvos sem cobertura suficiente para a determinação do ST do isolado, o sequenciamento do fragmento específico foi realizado conforme descrito na literatura[128] no Centro de Estudos do Genoma Humano e Células-Tronco, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. O pangenoma das cepas sequenciadas de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* foram realizados com o Roary como descrito no tópico (2.8 Análise do pangenoma para a determinação do genoma acessório dos genomas obtidos em banco de dados públicos).

2.13 Análise filogenética

A análise filogenética de *P. aeruginosa* foi baseada nos SNPs do genoma central *core genome single nucleotide polymorphisms* (cgSNPS) que foram detectados usando o Snippy v4.6.0 (https://github.com/tseemann/snippy), com o genoma da cepa de *P. aeruginosa* PAO1 (número de acesso do GenBank AE004091.2) usado como genoma de referência. Uma árvore filogenética de máxima verossimilhança foi gerada usando IQ-TREE v2.2.2.6 (http://www.iqtree.org/). O ModelFinder identificou o melhor modelo de substituição de nucleotídeo (GTR+F+ASC+R5). O bootstrapping foi realizado 1.000 vezes usando bootstrap ultrarrápido (UFBoot). A árvore foi visualizada usando iTOL v7 (*biobyte solutions*, Alemanha).[129]

2.14 Predição do genoma central e acessório por meio da genômica comparativa

Para determinar possíveis regiões do genoma de *P. aeruginosa* que estariam associadas com a virulência em direção do *C. elegans*, foi realizada uma abordagem de genômica comparativa, como descrito por Allen et al.[8] Para esta abordagem, o genoma central de *P. aeruginosa* foi definido usando o Spine (https://github.com/egonozer/Spine)[21] baseado no genoma montado das cepas de *P. aeruginosa* sequenciadas neste estudo. Para esta análise a definição de genoma central foram regiões presentes em pelo menos 90% dos genomas.[21] Como arquivo

de entrada para as análises do genoma central usando o Spine foi usado o genoma bruto das cepas de *P. aeruginosa* sequenciadas no formato FASTA.

Após a finalização das análises pelo Spine foi usado o AGEnt (https://github.com/egonozer/AGEnt) para determinar as sequências do genoma acessório.[21] Este *software* subtrai o genoma central das cepas, restando apenas as sequências relacionadas ao genoma acessório, que são definidos como elementos do genoma acessório (AGEs - *accessory genomic elements*).[21] O próximo passo foi determinar o padrão dos AGEs identificado pelo AGEnt. Esta etapa foi realizada com o programa ClustAGE (https://sourceforge.net/projects/clustage/) que como arquivo de entrada aceita um conjunto de sequências de nucleotídeos, aqui os AGEs identificados pelo AGEnt. Os AGEs foram alinhados e clusterizados pelo ClustAGE e foram divididos em subelementos que são sequências menores derivadas dos AGEs. Esta coleção de sequências acessórias é denominada “bin”, com a maior sequência chamada de “bin” representativa. Os bins representativos foram então processados dentro de subelementos com base nos pontos de quebra do alinhamento, e sequências do genoma acessório foram então analisados quanto à sua presença ou ausência nos genomas analisados. Para este estudo, consideramos apenas subelementos ≥100pb. Estes subelementos foram anotados com o Prokka para buscar *open reading frames* (ORFs) e apenas os subelementos associados a ORFs foram analisados.[130]

Para os genomas de *K. pneumoniae* a mesma abordagem acima foi realizada, no entanto, o genoma central foi definido como regiões em no mínimo 95% dos genomas. Todos os demais passos foram realizados conforme descrito acima.

2.15 Identificação de genes de virulência em *P. aeruginosa* e análise de sorotipo

O ABRIcate v.1.0.1 (https://github.com/tseemann/abricate/) foi usado para a identificação de genes de virulência através da triagem do banco de dados *virulence factor database* (VFDB).[131] O gene foi considerado presente se houve no mínimo 80% de identidade e cobertura.[132,133]

Além do VFDB, nós utilizamos um conjunto de 60 genes que contribuem para a virulência de *P. aeruginosa* em *C. elegans* conforme descrito por Vasquez-Rifo et al.[106] A sequência de nucleotídeos dos 60 genes foi obtida do Pseudomonas Genome DB (https://www.pseudomonas.com/). A partir deste conjunto

criou-se um banco de dados, adicionado ao *pipeline* ABRIcate que, através de blastN, avaliou os genomas das cepas sequenciadas neste estudo. Para os genes homólogos entre a PAO1 e PA14 foram escolhidas as sequências da PA14 como referência. A identificação do sorotipo de *P. aeruginosa* foi realizada usando o genoma montado e o *script Pseudomonas aeruginosa serotyper* (PAst) (https://github.com/Sandramses/PAst).

2.16 Manutenção e sincronização de fase de desenvolvimento de *C. elegans*

O *C. elegans* com o genótipo CF1903-glp-1 (e2144) III foi obtido do *Caenorhabditis Genetics Center* (CGC) (https://cgc.umn.edu) e cedido gentilmente pelo Prof. Dr. Marcelo Alves da Silva Mori da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). O *C. elegans* foi mantido em placas de 9cm com o meio de crescimento de nematóide (NGM - *Nematode growth media*) de acordo com os protocolos do WormBook[134] a 15ºC para permitir a geração de novas larvas. Para a preparação de 1 litro de meio NGM utilizou-se: 3g de NaCl, 17g de ágar, 2,5g de peptona, 1mL de 1 Mollar de $CaCl_2$, 1mL de 5mg/mL de colesterol em etanol, 1mL de 1 M de $MgSO_4$ e 25mL de 1 Mo de tampão KPO_4. Estas placas continham um tapete bacteriano de *Escherichia coli* OP50 que é uma fonte padrão de alimentação de *C. elegans*. Quando a placa atingia uma confluência de aproximadamente 80% de adultos hermafroditas esta placa era sincronizada com hipoclorito comercial. A sincronização era realizada de acordo com Powell et al.[135] A placa era lavada com 3mL de tampão M9 (3g KH_2PO_4, 6g Na_2HPO_4, 5g NaCl, 1mL 1 M $MgSO_4$ em água para 1 litro). Após a lavagem da placa com o tampão M9 a solução contendo os vermes era colocada em um tubo cônico tipo falcon de 15mL e centrifugada por 1500g por 30 segundos. O sobrenadante era então removido e descartado, deixando apenas cerca de 500µL de sobrenadante e vermes remanescentes. Então 400µL de hipoclorito eram adicionados, juntamente com 100µL de 5M de NaOH. Esta mistura de vermes mais solução era homogeneizada através do vórtex por até 4 minutos, tempo suficiente para dissolver os vermes, mantendo os ovos intactos, liberados para a solução. Para inativar o hipoclorito, o volume era completado com tampão M9 até atingir o volume máximo de 15mL, então esta solução foi homogeneizada e centrifugada por 1500g por 30 segundos. Após o fim da centrifugação, o sobrenadante era removido restando apenas o *pellet* que era

ressuspendido com 15mL de uma nova solução de tampão M9 e centrifugado novamente por 1.500g por 30 segundos. Esta etapa foi repetida 3 vezes visando remover qualquer vestígio de hipoclorito. Na última centrifugação, quase todo o tampão era removido do tubo cônico deixando aproximadamente uns 500µL de tampão mais *pellet* (ovos e cutículas de vermes não dissolvidos). Para ressuspender o *pellet* foi adicionado 4,5mL de tampão M9 e realizado homogeneização invertendo o tubo manualmente. Esta solução de ovos e cutículas e tampão M9 era colocada em um agitador tipo *shaker* a temperatura ambiente e mantido por 24 horas para a eclosão das larvas no estágio L1. Após a eclosão das larvas, estas eram transferidas para placas de 9 cm contendo OP50 e mantidas a 25ºC, temperatura na qual CF1903-glp-1 (e2144) III não prolifera, e acompanhadas até a chegada na fase L4 para seguir a próxima etapa do experimento.

2.17 Ensaio de morte *slow-killing* de *C. elegans*

Visando identificar possíveis novos marcadores genéticos associados com a virulência e persistência dos clones no ambiente hospitalar, foi realizado um ensaio de morte *slow-killing* de acordo com o protocolo descrito por Powell et al.[135] Para o estudo de sobrevida, a OP50, foi usada como fonte de alimentação tradicional como controle negativo. Um total de 10µL de cultura *overnight* crescidas em meio LB das cepas a serem avaliadas ou OP50 foram espalhados por toda a placa de *Petri* contendo meio NGM e as placas foram incubadas a 37ºC por 24h. Subsequentemente, as placas foram incubadas a temperatura ambiente por 24 horas. Esta incubação permite que as bactérias produzam os fatores necessários para a sua plena virulência.[135] Cada placa então foi semeada com 10 *C. elegans* previamente sincronizados na fase L4 e as placas foram incubadas a 25ºC para prevenir a proliferação dos nematoides. As placas foram examinadas diariamente durante 12 dias com microscópio ZEISS Axio Vert.A1 com objetiva de aumento 50x. Os vermes foram considerados mortos quando não respondiam ao toque. Cada experimento foi repetido no mínimo 4 vezes. As bactérias foram ranqueadas quanto à virulência com base no LT50 (tempo requerido para matar 50% dos vermes). Diferenças na curva de sobrevida foram determinadas por meio do teste *log-rank* (GraphPad Prism).

2.18 Extração de RNA total de *C. elegans* durante a infecção por *P. aeruginosa*

A expressão *in vivo* de alguns genes de *P. aeruginosa* durante a infecção de *C. elegans* no ensaio de *slow killing* foi investigado por PCR em tempo real (qPCR). Para este ensaio, para o *slow killing* (tópico 2.17) foram utilizados 30 vermes na fase L4 por placa e para cada cepa avaliada o experimento foi realizado em quintuplicata. Os vermes permaneceram na placa contento as cepas de *P. aeruginosa* sob investigação durante um período de 72 horas, de acordo com um protocolo descrito na literatura.[136] Este intervalo de tempo de 72 horas foi adequado, de acordo com este estudo, para a maior expressão de exsA, que codifica o regulador transcricional do TTSS.[136] Após este período de 72 horas, os vermes eram coletados com tampão M9 e transferidos para um tubo cônico tipo falcon de 15mL.[137] Este tubo era centrifugado a 2000rpm por 30 segundos e o sobrenadante descartado. Este processo foi repetido até que o sobrenadante estivesse claro. Após a última centrifugação o sobrenadante era descartado e o *pellet* era então ressuspendido com 1mL de TRIzol (Thermo Fisher Scientific). A solução de TRIzol com os vermes lisados era transferida para um microtubo de 1.5 mL e mantida sob agitação em um vórtex durante 20 min a 200rpm. Decorrido este tempo, 200µL de clorofórmio eram adicionados ao microtubo e este incubado por 15 minutos a temperatura ambiente, com homogeneização em intervalos de 5 minutos. Após este tempo, o microtubo era centrifugado por 15 minutos a 14000g a 4ºC. Após esta centrifugação, o sobrenadante (parte clara) foi transferido para um novo tubo e novamente foram adicionados 200µL de clorofórmio, seguido por centrifugação por 15 minutos a 14000g a 4ºC. Este processo foi repetido 4 vezes para remover impurezas como proteínas. Terminada esta etapa, foi adicionado um volume igual de isopropanol ao sobrenadante e o tubo foi mantido em temperatura ambiente por 10 minutos. Uma nova centrifugação foi realizada por 20 minutos a 14000g a 4ºC. O sobrenadante foi então removido, e o *pellet* foi lavado com etanol 75% gelado e então centrifugado por 15 minutos a 14000g a 4ºC. Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido e o *pellet* secado a vácuo no Centrivap por 1 minuto. Posteriormente o *pellet* foi ressuspendido em 20µL de água ultrapura livre de DNAse e RNAse. Então a solução foi aquecida por 5 minutos a 65ºC para ajudar a dissolver o RNA, vortexada por 10 segundos em temperatura ambiente, centrifugada por 14000g a 4ºC por 1 minuto, e o RNA foi quantificado no Nanodrop (Thermo Fisher Scientific).

2.19 Ensaio de qPCR para a avaliação da expressão de genes de *P. aeruginosa* durante a infecção do *C. elegans*

Para o ensaio de qPCR, 2µg de RNA total foram tratados com DNase I (RNase-*free*) (NEB-M0303S) de acordo com as recomendações do fabricante. Em um tubo de 0,2mL foram adicionadas 2 unidades de DNAse, 1µL de tampão DNase I *reaction* e quando necessário era adicionado água ultrapura livre de DNAse e RNAse para completar o volume de 10µL. Esta solução era incubada no termociclador com um ciclo de 10 minutos a 37ºC, após o término deste ciclo era adicionado 1µL de EDTA 0.5 M e então seguia-se para o ciclo de inativação da DNAse a 75ºC por 10 minutos.

Após o tratamento com DNAse, o RNA tratado era então submetido a uma transcrição reversa com o *kit High-Capacity* cDNA *Reverse transcription kits* (Thermo Fisher Scientific) de acordo com as recomendações do fabricante. Então era preparado uma solução contento: 2µL de tampão RT, 0,8µL de dNTPs, 2uL de *primers* aleatórios, 1µL de enzima transcriptase e 4,2µL de água ultrapura para completar o volume de 10µL. Esta solução então recebia os 10µL de RNA tratado com DNAse e era incubada no termociclador, nas seguintes condições: 25ºC por 10 minutos, 37ºC por 120 minutos e 85ºC por 10 minutos e 4ºC por tempo indeterminado.

Após a transcrição reversa, era realizada a qPCR utilizando *primers* específicos (Apêndice 1). A qPCR foi realizada com o Power SYBR™ Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific). Para cada reação foram usados 6µL de Power SYBR™ Green PCR *Master mix*, 0,5µL de *primer forward* e 0,5µL de *primer* reverso, 3µL de água ultrapura e 2µL de cDNA a 50ng/µL. As reações foram realizadas em MicroAmp™ Optical 96-*Well reaction plates* (Thermo Fisher Scientific) e as reações foram conduzidas no instrumento QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific). Para cada gene avaliado este foi testado em triplicatas e o controle endógeno foi o gene rplU.[5] A diferença na expressão foi calculada através do método ΔΔCt.[138]

2.20 Ensaio de formação de biofilme

A quantificação do biofilme foi realizada em microplacas de 96 poços como descrito por O'Toole.[139] Primeiramente uma cepa criopreservada a -80°C foi semeada em uma placa de ágar MacConkey e incubada *overnight* a 37ºC para

crescimento e obtenção de colônias isoladas/unidades formadoras de colônias (UFC). No dia seguinte, uma UFC foi transferida para 12mL de meio líquido LB e incubado no *shaker* sob agitação a 37ºC a 200rpm. No dia seguinte, uma alíquota da cultura *overnight* foi diluída 1:100 em um meio de cultura fresco de LB. Após a diluição foram adicionados 100µL da diluição nos poços de uma microplaca de 96 poços em quintuplicata para cada cepa que foi avaliada. Em seguida a microplacas foram incubadas a 37ºC por 24 horas. Após a incubação de 24 horas, foi iniciada a coloração do biofilme. Este processo envolve, descartar a cultura que cresceu durante 24 horas virando a placa e sacudindo o líquido e em seguida gentilmente mergulhar as microplacas em um recipiente com água, este processo foi repetido 3 vezes e a cada repetição a água presente nos poços era sacudida. Em seguida, foram adicionados 125µL de uma solução de cristal violeta diluído para 0,1% em cada poço e incubado durante um período de 15 minutos a temperatura ambiente. Decorrido o tempo de incubação, estas microplacas eram gentilmente submergidas em um recipiente com água, este processo foi repetido 3 vezes e a cada repetição a água presente nos poços era sacudida. As microplacas foram deixadas em temperatura ambiente por algumas horas até que toda a água estivesse evaporada. Em seguida foi iniciado o processo de quantificação, adicionando-se 125µL de ácido acético a 30% diluído em água em cada poço e incubando por 15 minutos a temperatura ambiente. Depois esta solução contendo ácido acético mais o solubilizado do cristal violeta foi transferida para uma nova microplaca para quantificação no leitor de placa Varioskan LUX (Thermo Fisher Scientific) usando a absorbância de 550nm, o ácido acético como branco, e apenas o meio de cultura LB usado como controle. Poços para os quais as cepas tiveram uma OD maior que o branco foi considerado que houve produção de biofilme. Em seguida, calculamos os valores de corte usando a seguinte fórmula: OD controle (ODc) = média da OD do controle negativo +(3 × desvio padrão (DP) do controle negativo), OD da cepa = média da OD da cepa − ODc. Os resultados foram interpretados dentro de 4 categorias: OD ≤ ODc: sem produção de biofilme (NBP - *no biofilm production*); ODc < OD ≤ 2 × ODc: produção fraca de biofilme (WBP - *weak biofilm production*); 2 × ODc < OD ≤ 4 × ODc: produção moderada de biofilme (MBP - *moderate biofilm production*); e 4 × ODc < OD: produção forte de biofilme (SBP - *strong biofilm production*).[140, 141]

2.21 Ensaio de quantificação de piocianina

O ensaio de quantificação de produção de piocianina foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Chimi et al.[140] Em resumo, as cepas foram semeadas em ágar MacConkey e posteriormente uma UFC foi adicionada em 12mL de LB como descrito no tópico 2.20 (Ensaio de formação de biofilme). Depois do tempo de incubação a cultura *overnight* foi centrifugada a 1500 x*g* por 10 minutos. Após a centrifugação, 5mL do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo cônico de 15mL e este sobrenadante foram adicionados 3mL de clorofórmio. A solução foi submetida ao vórtex por 20 segundos e submetida a centrifugação por 5 minutos a 1500 x*g.* Posteriormente, a fase contendo clorofórmio e piocianina foi recuperada e transferida para um novo tubo cônico de 15mL, ao qual foi adicionado 1mL de 0,2 M de ácido clorídrico (HCL - *hydrochloric acid*) e centrifugado por 10 minutos a 1500 x*g*. A DO da fase do HCL foi mensurada a 520nm usando um espectrofotômetro (Pharmacia Biotech). O HCL foi usado como branco e apenas um tubo com apenas o LB foi usando para remover o *background*. A concentração de piocianina foi obtida usando a seguinte fórmula: concentração de piocianina (µg/mL) = (OD_{520nm} - OD_{branco}) * 17,072. O valor de 17,072 é o coeficiente de atenuação molar, ou o grau em que uma solução absorve luz, em termos de concentração da solução.

2.22 Avaliação da virulência de *P. aeruginosa* a partir da escolha de fontes alimentares bacterianas preferidas pelo *C. elegans*

Para este ensaio as 39 cepas de *P. aeruginosa* que foram previamente avaliadas no ensaio de *slow killing* foram utilizadas. Primeiramente a cepa criopreservada a 80ºC negativos, foi semeada em uma placa de ágar MacConkey e incubada *overnight* a 37ºC para crescimento e obtenção de UFCs. No dia seguinte, uma UFC foi transferida para 10mL de meio líquido LB e incubado no *shaker* sob agitação a 37ºC a 200rpm. No dia seguinte, 2,5µL de cada bactéria a ser avaliada foram posicionados ao longo de 5 colunas em uma placa de Petri de 150 x 15mm contendo meio NGM (8 cepas cada coluna). As placas foram incubadas *overnight* a 37ºC. Foram adicionados 10 vermes L4 em cada lado das placas (totalizando 20 vermes L4). As placas foram incubadas a 25ºC com monitoramento do movimento dos vermes em

direção à fonte de alimento durante 3 dias. Os resultados foram computados em porcentagem de bactérias presentes na cepa escolhida como fonte de alimentação.

2.23 Teste estatístico para associação de elementos genéticos (genes codificadores/não codificadores) com virulência

O teste de classificação de Mann-Whitney (MW) e a análise de regressão linear (LR) foram aplicados a cada subelemento (conforme identificados através do método descrito em 2.14) e para testar a associação do padrão de presença/ausência do subelemento com a virulência. Os subelementos foram considerados associados com virulência se ambos os testes apresentassem um valor-p menor que 0,05, e pelo menos um dos testes apresentasse um valor-p menor que 0,01. Entre os subelementos associados à virulência, os subelementos com inclinação negativa (com base na regressão linear) foram associados à baixa sobrevivência/alta virulência (referidos como associados à alta virulência ou HVA), enquanto os subelementos com inclinação positiva foram associados à alta sobrevivência/baixa virulência (referidos como associados à baixa virulência ou LVA). Todos os valores-p são mostrados na escala log10 como valores absolutos. O controle para testes de hipóteses múltiplas foi realizado usando um teste de permutação conforme descrito abaixo.[106]

2.24 Teste de permutação para controlar múltiplos testes de hipóteses

Dez mil permutações dos valores de virulência e sua atribuição a cada cepa foram geradas (ou seja, valores medianos de sobrevivência de vermes), e os testes de associação Mann-Whitney (MW) e Regressão linear (LR) foram repetidos para cada permutação. Para cada subelemento, o número de vezes que ele recebeu um melhor valor-p usando os dados de virulência embaralhados em comparação com o original foi registrado, separadamente para MW e LR. A contagem acima foi dividida por 10.000 para obter o valor de *p* corrigido de permutação para os testes MW e LR. Os valores-p MW e LR foram considerados significativos se pelo menos um deles

correspondesse ao valor-p corrigido menor que 0,05. O *script* usado foi o disponível em (https://github.com/isana18/PaeGWAS).[106]

2.25 Definição dos casos de colonização e infecção de *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos

Para considerar isolados de *K. pneumoniae* relacionados a colonização, foram considerados aqueles obtidos por meio do swab retal, enquanto infecção foram aqueles isolados de *K. pneumoniae* obtidos de sítios estéreis: sangue, lavado brônquico, líquido ascítico, secreção de abdômen, secreção traqueal e urina.

2.26 *Score* de virulência para *K. pneumoniae*

Para avaliar o *score* de virulência baseado em alguns marcadores de virulência específicos presentes no genoma de *K. pneumoniae* nós utilizamos o Kleborate (https://github.com/klebgenomics/Kleborate).[10] Este *pipeline* realiza a busca por marcadores pré-definidos: ybt, *colibactin* (clb) e iuc. Se estes marcadores estão presentes e dependendo da combinação entre eles, ou se estão totalmente ausentes, a cepa avaliada recebe um score que pode variar entre 0-5, sendo zero a ausência de todos os marcadores e 5 a presença de todos. Esta análise foi realizada baseada no artigo que já publicamos sobre *Klebsiella pneumoniae*, com dados iniciais gerados por este estudo.[142]

2.27 Anotação dos genomas *K. pneumoniae* e determinação do pangenoma

Os genomas de *K. pneumoniae* foram anotados com o Prokka (conforme o tópico 2.7 Anotação dos genomas obtidos em banco de dados públicos). Para investigar o pangenoma de *K. pneumoniae*, 124 cepas que tiveram seus genomas sequenciados foram analisadas (conforme o tópico 2.8 Análise do pangenoma para a determinação do genoma acessório dos genomas obtidos em banco de dados públicos). Estas cepas fazem parte de um estudo do nosso grupo de pesquisa que teve como objetivo investigar a transição entre colonização para infecção em pacientes que

carregavam *K. pneumoniae* produtora de carbapanemase (KpKPC).[143] Estes 124 genomas de KpKPC foram então anotados para determinar seu pangenoma e depois os genes do genoma acessório foram usados para identificar possíveis genes que poderiam estar associados a infecção do que colonização. Para identificar genes do genoma acessório que poderiam estar associados com a característica de infecção foi usado a abordagem descrita acima (conforme o tópico 2.8 Análise do pangenoma para a determinação do genoma acessório dos genomas obtidos em banco de dados públicos). Uma segunda abordagem usando as sequencias de genomas brutas foi implementada para tentar identificar regiões do genoma que estariam associadas com a característica de infecção, esta análise foi realizada conforme descrito acima (conforme o tópico 2.14 Predição do genoma central e acessório através da genômica comparativa). Posteriormente os genes do genoma acessório identificados associados com a característica de infecção foram comparados com os achados em genomas públicos de *K. pneumoniae* (conforme o tópico 2.4 Seleção de genomas depositados em bancos de dados públicos para análises *in silico*).

2.28 Determinação do *whole-genome* e *core-genome* MLST dos isolados de *K. pneumoniae*

A tipagem dos isolados baseada nos métodos de *core-genome multilocus sequence typing (*cgMLST) e *whole-genome multilocus sequence typing* (wgMLST) foi realizada pelo *software* chewBBACA que está disponível em (https://github.com/B-UMMI/chewBBACA).[144] Para realizar o cgMLST e o wgMLSTpara *K. pneumoniae* foi utilizado o esquema disponível publicamente em (https://www.cgmlst.org/ncs/schema/2187931/). Este esquema foi desenvolvido por meio da plataforma comercial do *software* Ridom SeqSphere+. Este esquema de cgMLST de *K. pneumoniae* possui 2.358 alvos. Por outro lado, o esquema de wgMLST possui 4.884 alvos (2.358 alvos do cgMLST e 2.526 alvos do genoma acessório). Para avaliar o impacto do cg/wgMLST foi calculado a distância genética entre isolados pareados como a proporção da diferença de alelos que foi obtida dividindo o número de alelos diferentes entre dois genomas pelo total de número de genes compartilhado entre estes dois genomas.[145] Para discriminar entre isolados epidemiologicamente relacionados de isolados não relacionados foram usados os *thresholds* 0,0035 para

cgMLST e 0,0045 para wgMLST proposto para *K. pneumoniae*.[146] Para avaliar se havia diferença na distância obtida por wgMLST e cgMLST foi realizado um teste *t* considerando um valor-p >0,05.

Minimum spanning tree (MST) foi gerada usando o *software* GrapeTree version 1.5.0 disponível em (https://github.com/achtman-lab/GrapeTree) usando o parâmetro MSTree v2 que implementa a opção ignorar valores perdidos.

2.29 Aspectos éticos

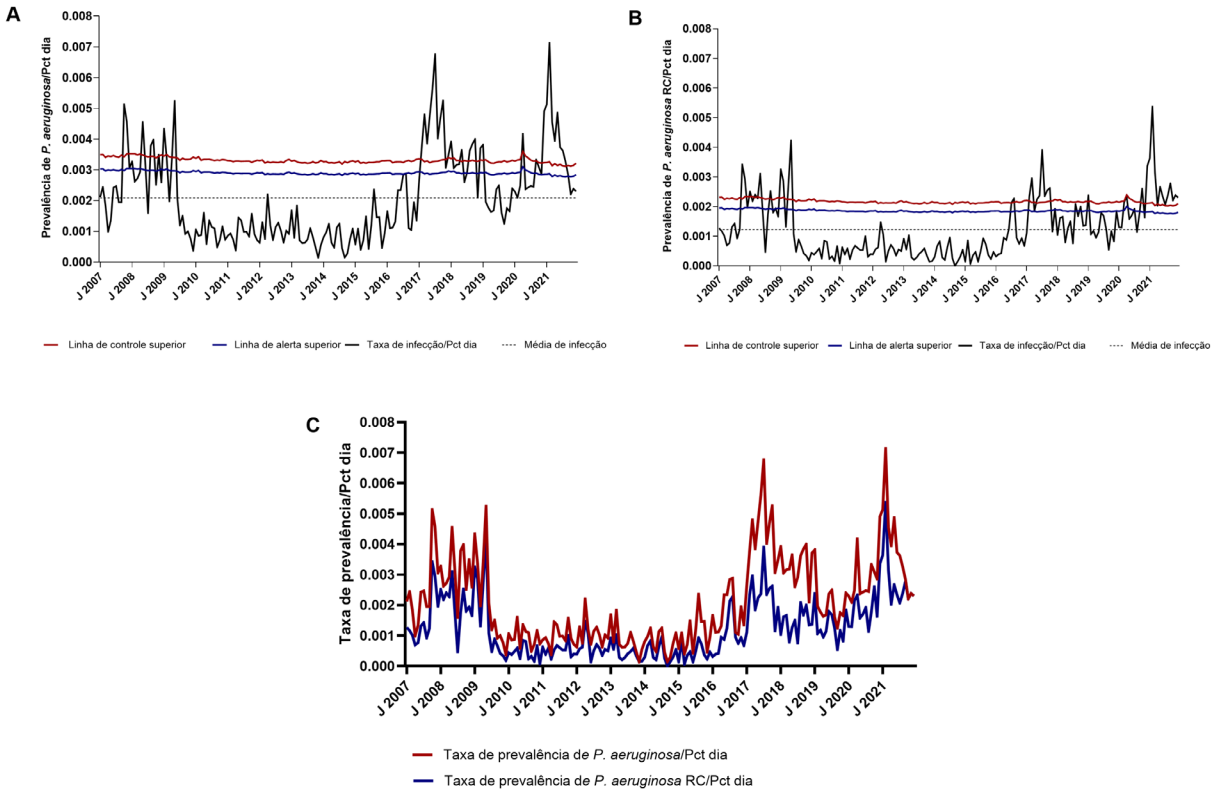
Este projeto foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HIAE (CAAE: 39720720.7.0000.0071) e SGPP nº4449.

3 RESULTADOS

3.1 Prevalência de *P. aeruginosa*

Entre janeiro de 2007 até dezembro de 2021 foram identificados 4.806 isolados únicos de *P. aeruginosa* pelo laboratório clínico provenientes dos sítios: hemocultura, lavado brônquico e secreção traqueal. O sítio mais predominante foi secreção traqueal correspondendo a 76,05% (3.655/4.806) das amostras, seguido por hemocultura 14,71% (707/4.806) e lavado brônquico 9,23% (444/4.806). A resistência aos carbapenêmicos (imipenem e/ou meropenem) foi de quase 60% (resistentes: 2.834; 58,96% *versus* sensíveis: 1972; 41,34%).

Baseado nos dados de distribuição dos isolados, foram construídos dois gráficos de prevalência ao longo do período: o primeiro considerando todos os 4.806 dados reportados entre 2007-2021 (Figura 2A) e o segundo considerando apenas o grupo de isolados de *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos (Figura 2B). Foi possível identificar 37 pontos em que o número de isolados de *P. aeruginosa* caracterizou um período epidêmico (Figura 2A). Nestes 37 pontos foram reportados 2.053 isolados de *P. aeruginosa*. Por outro lado, quando usamos apenas os dados dos isolados resistentes aos carbapenêmicos (RC), foram identificados 34 pontos em que os isolados de *P. aeruginosa* RC ficaram acima do limite superior, constituindo um período epidêmico (Figura 2B). Nestes 34 pontos foram reportados 1.838 isolados de *P. aeruginosa*. Uma comparação da prevalência entre todos os isolados foi realizada, demonstrando que os isolados resistentes aos carbapenêmicos acompanham a taxa de prevalência da população geral de *P. aeruginosa* (Figura 2C).



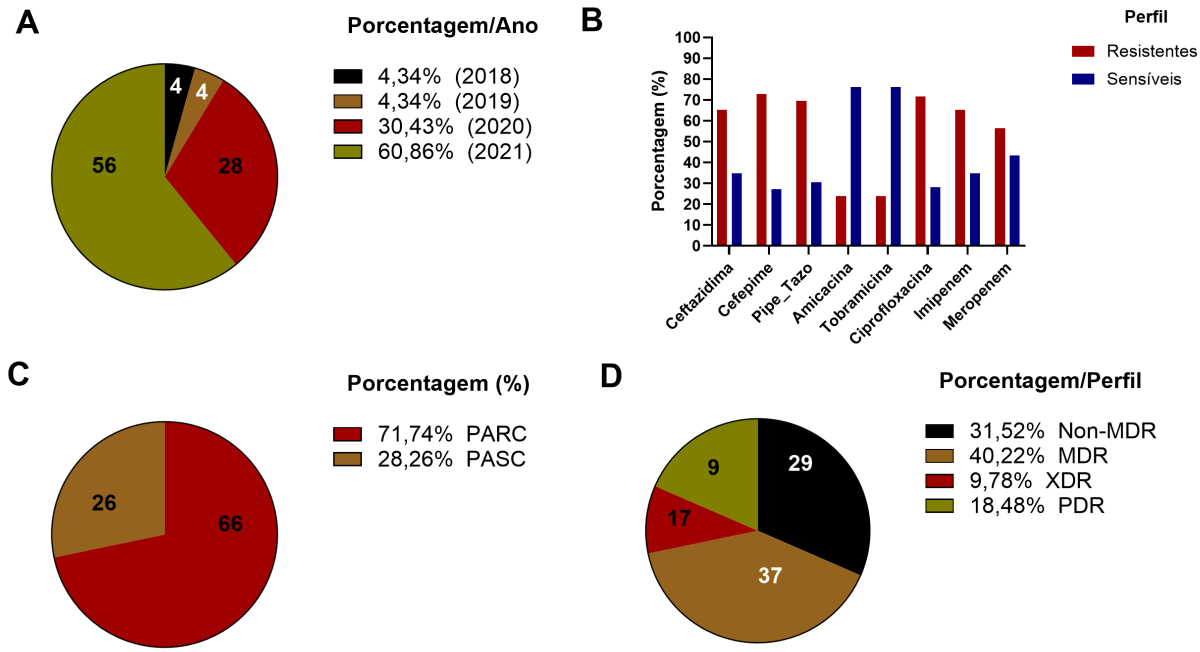
A. Prevalência de *P. aeruginosa* resistente ou sensível aos carbapenêmicos. B. Prevalência de *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos. C. Comparação da taxa de prevalência de *P. aeruginosa* sensíveis ou resistentes aos carbapenêmicos *versus* a taxa de prevalência de isolados de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos (*P. aeruginosa* RC). Pct: pacientes; RC: resistentes aos carbapenêmicos.

Figura 2. Prevalência de *P. aeruginosa* ao longo do tempo

Com base nos períodos epidêmicos foram selecionados, isolados e coletados próximos ou durante os momentos epidêmicos (Figura 2A e 2B). Esta seleção visou identificar clones de alto risco presentes nestes momentos, para investigar o *background* genético destes clones e marcadores genéticos associados com a virulência e persistência destes clones no ambiente hospitalar.

Durante o processo de reativação dos isolados, observamos que aqueles mais antigos, não estavam viáveis. Para as análises moleculares foram incluídos, portanto, os isolados mais recentes, entre 2018-2021. Além disso, optamos por selecionar isolados de *P. aeruginosa* provenientes de hemocultura por estarem mais possivelmente associadas com IRAS. Este conjunto representou 124 isolados de *P. aeruginosa*, dos quais 74,19% (92/124) foram reativados com sucesso. Estes 92 isolados de *P. aeruginosa*, apresentaram as seguintes características: 60,86% (n=56) dos isolados foram reportados principalmente no ano de 2021 (Figura 3A), os isolados

exibem um perfil de resistência aos antibióticos testados com exceção dos antibióticos amicacina e tobramicina (Figura 3B), em relação à resistência aos carbapenêmicos (imipenem e/ou meropenem) quase 72% dos isolados são resistentes a esta classe (Figura 3C) e aproximadamente 19% dos isolados são classificados como pan-resistentes (PDR - *pandrug-resistant*) (Figura 3D). Para este conjunto de 92 isolados foi selecionado para sequenciamento e posterior análise do viruloma, resistoma e demais ensaios com o modelo *C. elegans*.

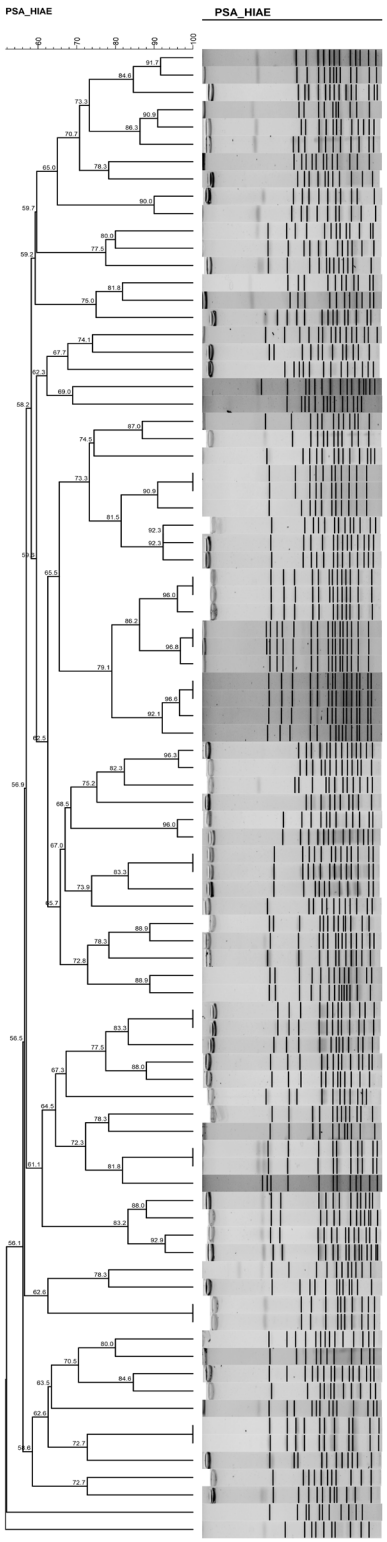


A. Distribuição em porcentagem dos isolados entre 2018-2021. B. Perfil de sensibilidade em porcentagem aos antimicrobianos testados. C. Perfil de sensibilidade em porcentagem a classe dos carbapenêmicos. D. Porcentagem dos isolados classificados como Non-MDR, MDR, XDR e PDR. Non-MDR: não multirresistente; MDR: multirresistente; XDR: extensivamente resistente; PDR: pan-resistentes. Os números dentro dos gráficos representam o número de isolados para cada variável.
Figura 3. Características dos 92 isolados de hemocultura de *P. aeruginosa*

3.2 Caracterização da população de *P. aeruginosa* endêmica e esporádica por PFGE

Dos 92 isolados de *P. aeruginosa* provenientes de hemocultura foi possível realizar a caracterização da população baseada no perfil de PFGE de 93,47% (86/92) dos isolados. Os 86 isolados tipados foram agrupados em 48 pulsotipos diferentes baseados no perfil de bandas que estes isolados exibiram (Figura 4). Além

disso, 67,39% (62/92) dos isolados foram agrupados em 22 *clusters* (≥2 isolados com ≥80% de similaridade) (Apêndice 2). Para a caracterização da população de *P. aeruginosa*, os isolados foram classificados em duas categorias: endêmicos e esporádicos. Os isolados endêmicos foram aqueles que apareceram em mais de um período ao longo do tempo, enquanto os isolados esporádicos foram aqueles que apareceram em um ou mais pacientes internados no mesmo período e não voltaram a ser isolados em anos posteriores, ou seja, foram restritos a um período específico. Dos 86 isolados de *P. aeruginosa* caracterizados por PFGE, 66,27% (57/86) foram considerados esporádicos e 33,72% (29/86) foram endêmicos. Estes 29 isolados de *P. aeruginosa* classificados como endêmicos foram agrupados em 9 linhagens endêmicas circulantes no hospital ao longo dos anos e os 57 isolados esporádicos foram agrupados em 39 linhagens diferentes. Estes resultados demonstram que o conjunto de 86 isolados de *P. aeruginosa* avaliados, representam uma população heterogênea, e durante o período em que estes isolados foram identificados não foi reportado surto associado a *P. aeruginosa*.



Key	ID_Paciente	Data de isolamento	Sítio	Pulsotype	Cluster_80	End/Esp
PA113	Pct36	02/21	Hemocultura	1	1	0
PA151	Pct36	02/21	Hemocultura	1A	1	0
PA176	Pct30	07/21	Hemocultura	1B	1	0
PA152	Pct8	09/20	Hemocultura	2	2	1
PA161	Pct37	06/21	Hemocultura	2A	2	1
PA163	Pct53	06/21	Hemocultura	2B	2	1
PA153	Pct29	09/20	Hemocultura	3		0
PA202	Pct60	12/21	Hemocultura	4		0
PA189	Pct34	10/21	Hemocultura	5	3	0
PA229	Pct48	10/21	Hemocultura	5A	3	0
PA231	Pct31	12/21	Hemocultura	6	4	1
PA105	Pct52	12/20	Hemocultura	6A	4	1
PA168	Pct2	07/21	Hemocultura	7		0
PA140	Pct47	12/20	Hemocultura	8	5	0
PA141	Pct47	12/20	Hemocultura	8A	5	0
PA198	Pct20	11/21	Hemocultura	9		0
PA160	Pct57	06/21	Hemocultura	10		0
PA224	Pct56	05/21	Hemocultura	11		0
PA228	Pct54	09/21	Hemocultura	12		0
PA106	Pct35	12/20	Hemocultura	13		0
PA111	Pct28	01/21	Hemocultura	14		0
PA146	Pct3	01/21	Hemocultura	15	6	0
PA220	Pct3	01/21	Hemocultura	15A	6	0
PA102	Pct46	04/20	Hemocultura	16		0
PA120	Pct6	03/20	Hemocultura	17	7	1
PA121	Pct6	03/20	Hemocultura	17	7	1
PA122	Pct46	04/20	Hemocultura	17A	7	1
PA123	Pct23	08/18	Hemocultura	17B	7	1
PA179	Pct32	08/21	Hemocultura	17C	7	1
PA181	Pct59	09/21	Hemocultura	17D	7	1
PA154	Pct22	10/20	Hemocultura	18	8	1
PA155	Pct22	10/20	Hemocultura	18	8	1
PA150	Pct12	02/21	Hemocultura	18A	8	1
PA142	Pct55	12/20	Hemocultura	19	8	1
PA143	Pct22	12/20	Hemocultura	19	8	1
PA144	Pct39	12/20	Hemocultura	19A	8	1
PA108	Pct55	12/20	Hemocultura	20	9	1
PA109	Pct55	12/20	Hemocultura	20	9	1
PA110	Pct55	12/20	Hemocultura	20A	9	1
PA112	Pct12	02/21	Hemocultura	20B	9	1
PA186	Pct24	09/21	Hemocultura	21	10	1
PA218	Pct1	01/19	Hemocultura	21A	10	
PA166	Pct26	06/21	Hemocultura	21B	10	1
PA183	Pct15	09/21	Hemocultura	22		0
PA193	Pct4	10/21	Hemocultura	23	11	0
PA200	Pct38	12/21	Hemocultura	23A	11	0
PA203	Pct14	12/21	Hemocultura	24	12	1
PA204	Pct14	12/21	Hemocultura	24	12	1
PA210	Pct46	04/20	Hemocultura	24A	12	
PA180	Pct17	09/21	Hemocultura	25		0
PA157	Pct28	05/21	Hemocultura	26	13	0
PA182	Pct59	09/21	Hemocultura	26A	13	0
PA165	Pct18	06/21	Hemocultura	27		0
PA130	Pct27	01/19	Hemocultura	28	14	0
PA132	Pct27	01/19	Hemocultura	28A	14	0
PA195	Pct59	10/21	Hemocultura	29	15	0
PA196	Pct59	10/21	Hemocultura	29	15	0
PA201	Pct60	12/21	Hemocultura	29A	15	0
PA188	Pct7	10/21	Hemocultura	30	16	0
PA192	Pct4	10/21	Hemocultura	30A	16	0
PA187	Pct25	10/21	Hemocultura	31		0
PA148	Pct21	02/21	Hemocultura	32		0
PA149	Pct21	02/21	Hemocultura	33		0
PA103	Pct5	04/20	Hemocultura	34	17	0
PA104	Pct5	04/20	Hemocultura	34	17	0
PA107	Pct10	12/20	Hemocultura	34A	17	0
PA162	Pct16	06/21	Hemocultura	35	18	0
PA164	Pct16	06/21	Hemocultura	35A	18	0
PA174	Pct16	07/21	Hemocultura	36	18	0
PA175	Pct16	07/21	Hemocultura	36A	18	0
PA135	Pct42	08/18	Hemocultura	37		0
PA190	Pct11	10/21	Hemocultura	38		0
PA116	Pct50	03/20	Hemocultura	39	19	0
PA119	Pct50	03/20	Hemocultura	39	19	0
PA101	Pct41	04/20	Hemocultura	40	20	1
PA137	Pct44	01/19	Hemocultura	40A	20	1
PA191	Pct11	10/21	Hemocultura	41	21	0
PA223	Pct19	01/21	Hemocultura	41A	21	0
PA159	Pct58	05/21	Hemocultura	42		0
PA117	Pct40	03/20	Hemocultura	43	22	
PA118	Pct40	03/20	Hemocultura	43	22	0
PA185	Pct40	09/21	Hemocultura	44		0
PA136	Pct47	10/18	Hemocultura	45		0
PA199	Pct51	11/21	Hemocultura	46		0
PA126	Pct33	10/18	Hemocultura	47		0
PA230	Pct45	11/21	Hemocultura	48		0

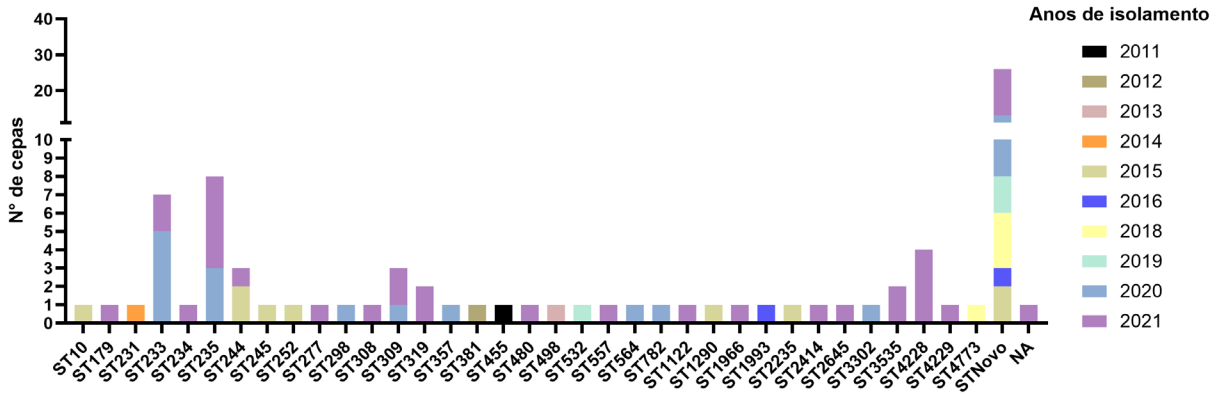
O padrão de bandas foi gerado através da digestão do DNA genômico com a enzima de restrição *SpeI*. *Key* identificação do isolado. ID_Paciente: número que foi atribuído a cada paciente único; data de isolamento: (mês/ano); sítio: sítio de isolamento; *pulsetype*: perfil do isolado de eletroforese em gel de campo pulsado baseado no padrão de bandas; *cluster*: dois ou mais isolados que compartilharam ≥80% de similaridades baseado no padrão de bandas; endo/espo: endêmico (1) ou esporádico (0).
Elaborada pelo *software* BioNumerics v7.5.

Figura 4. Dendrograma mostrando a relação dos 86 isolados de *P. aeruginosa* selecionados em períodos de maior incidência

3.3 Sequenciamento de *P. aeruginosa*

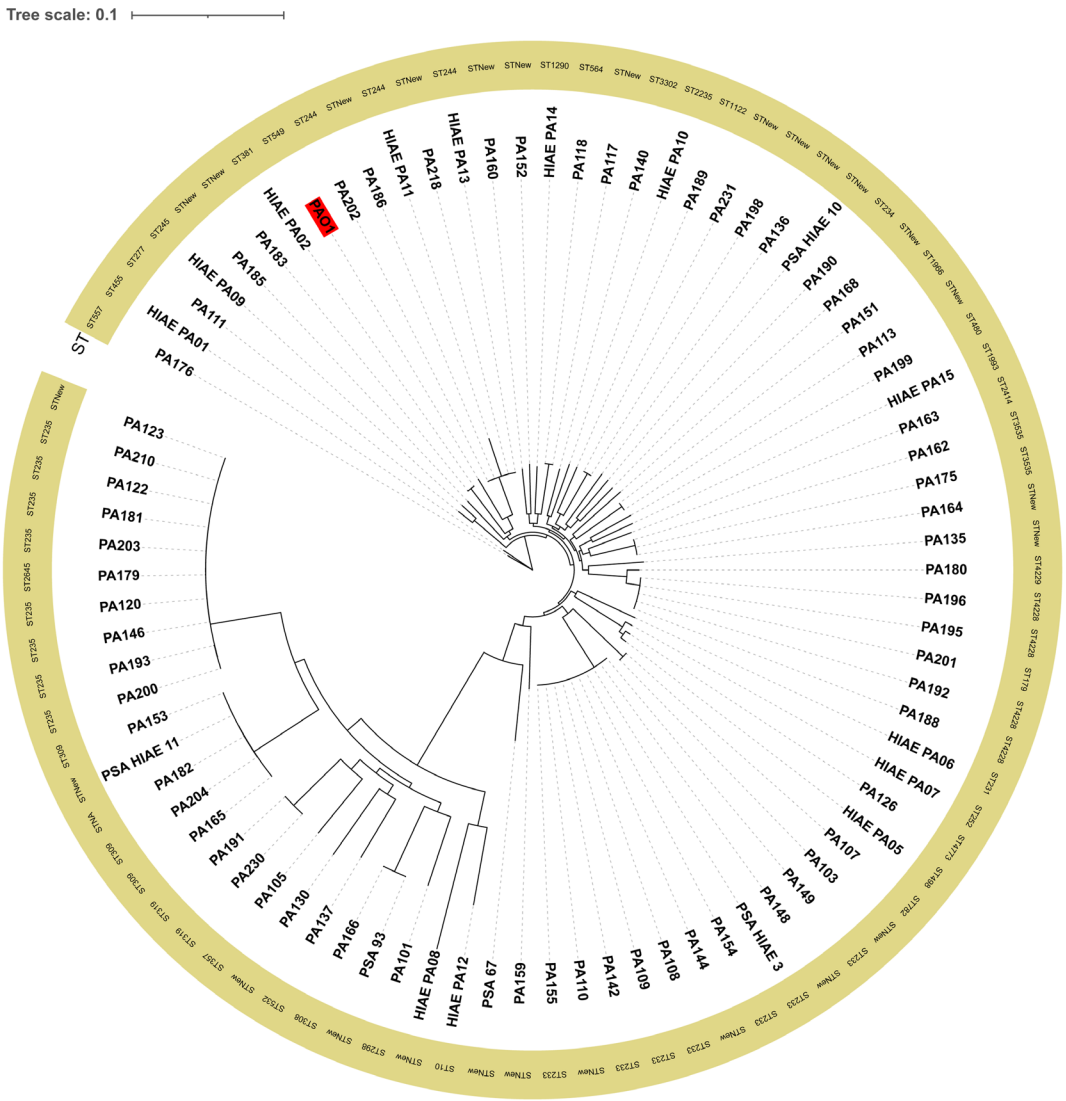
Para o sequenciamento foram selecionados isolados pertencentes a 44 PFGE *pulsotypes*, correspondentes a 80 isolados de *P. aeruginosa*. Destes 80 isolados sequenciados, 14 isolados foram removidos das análises devido a critérios de qualidade (número de *reads* <1 milhão). Para aumentar a diversidade de cepas avaliadas neste estudo, incluímos um conjunto de 18 cepas de *P. aeruginosa* que haviam sido sequenciados em anos posteriores por nosso grupo de pesquisa.[147] Estas 18 cepas consistiam em 13 cepas não relacionadas epidemiologicamente, distribuídas entre 2011 e 2016 e coletadas de diferentes sítios, e 5 cepas provenientes de hemocultura, sendo 2 cepas reportadas entre 2015-2016 e 3 cepas reportadas em 2021, durante os períodos de maior prevalência de *P. aeruginosa*. Desta forma, o total de cepas de *P. aeruginosa* que seguiram para as próximas etapas foi de 84 cepas (Apêndice 2).

As 84 cepas sequenciadas, reforçam os achados encontrados por PFGE, pois constituem uma amostragem heterogênea com 35 STs conhecidos, agrupando 57 cepas, e 26 cepas pertencentes a STs ainda não descritos no banco pubMLST (recebendo a classificação de STNovo para este estudo). Uma cepa (PA182) não foi possível tipar por MLST por perda de um ou mais dos genes alvos do MLST sendo classificada como “ST não atribuído” (NA) e está cepa não foi incluída nas comparações entre clones de alto risco ou clones esporádicos. Os tipos de sequências predominantes entre os STs conhecidos foram o ST235 (8/84; 9,52%) e ST233 (7/84; 8,33%), foram identificadas 22 cepas pertencentes a STs de alto risco (ST233, ST235, ST244, ST277, ST298, ST308 e ST357), e 61 cepas pertenciam a STs esporádicos (Figura 5).



ST: *sequence type*; NA: não atribuído.
Figura 5. Distribuição de *sequence type* por ano de isolamento

Para analisar como estas cepas se relacionavam entre si, foi construída uma árvore filogenética baseada nos SNPs presentes no genoma central destas cepas cgSNPs. O agrupamento gerado pelo alinhamento do cgSNP demonstrou que as cepas foram frequentemente agrupadas baseada no seu tipo de sequência (ST) (Figura 6). A análise de cgSNPs demonstraram que as 84 cepas de *P. aeruginosa* apresentaram entre 6,114 e 17,152 cgSNPs em comparação com a cepa de referência PAO1. A cepa com o maior número de cgSNPs foi a HIAE_PA08, com 17,152.



A cepa destacada com fundo vermelho é a cepa PAO1 usada como referência. ST: *sequence type*. cgSNPs: *core genome single nucleotide polymorphisms.*
Figura 6. Árvore de máxima verossimilhança gerada a partir do alinhamento cgSNPs das 84 cepas de *P. aeruginosa*

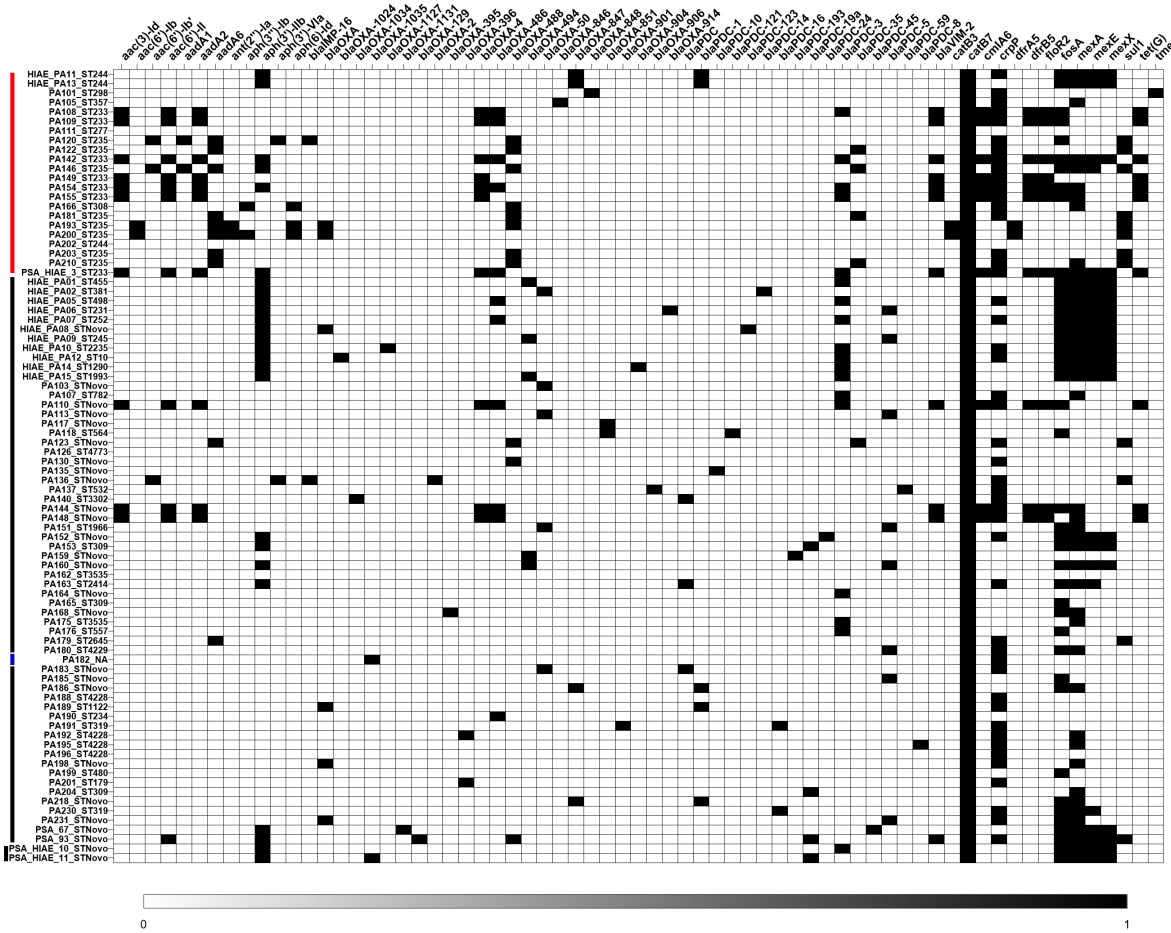
3.4 Resistoma das cepas *P. aeruginosa* sequenciadas

A análise do resistoma das 84 cepas sequenciadas de *P. aeruginosa* revelou que essas cepas carregavam 67 genes e/ou variantes exclusivos relacionados à resistência antimicrobiana, juntos estes 67 genes identificados podem conferir resistência a oito classes de antibióticos: aminoglicosídeos, beta-lactâmicos, fenicóis, fluoroquinolonas, trimetoprima, fosfomicina, sulfonamidas e tetraciclinas (Figura 7). A maioria dos genes e/ou variantes identificados relacionados a resistência

antimicrobiana foram atribuídos a classe dos beta-lactâmicos representando (61,19%), com 41 genes ou variantes identificados. Notavelmente, os genes *bla*$_{\text{VIM-2}}$ (13,10%; 11/84) e *bla*$_{\text{IMP-16}}$ (2,38%; 2/84) foram os principais genes identificados nas cepas de *P. aeruginosa* devido a sua importância dentro do cenário de resistência antimicrobiana e impacto no tratamento das infecções decorrentes de patógenos multirresistentes. Os genes e/ou variantes que conferem resistência a classe dos aminoglicosídeos foram o segundo grupo mais predominante nas 84 cepas avaliadas, representando (17,91%) dos genes relacionados a resistência antimicrobiana. Doze genes e/ou variantes foram identificados, sendo os mais representativos *aph(3')-IIb* (29,76%; 25/84), *aac(6')-Il* (13,10%; 11/84) e *aac(3)-Id*, *aadA2* e *aadA6*, cada um com 11,90% (10/84). No geral, o número de genes e/ou variantes por cepa variou entre 1 a 18. Uma investigação sobre o fenótipo de resistência das 84 cepas sequenciadas mostrou que quase 71,43% da população exibiu um fenótipo multirresistente (MDR, XDR ou PDR). Esses dados se alinham com a diversidade de genes ou variantes de resistência antimicrobiana identificados nestas cepas.

Quando dividimos as cepas em clones de alto risco e clones esporádicos (aqueles que não pertencem ao grupo de clones de alto risco), identificamos que, entre os 67 genes e/ou variantes únicos, os clones de alto risco não apresentavam 29 genes e/ou variantes identificados em cepas esporádicas. Esses genes/variantes estão relacionados a *bla*$_{\text{OXA}}$ e *bla*$_{\text{PDC}}$. Por outro lado, as cepas esporádicas não apresentavam 10 genes e/ou variantes únicos presentes em clones de alto risco.

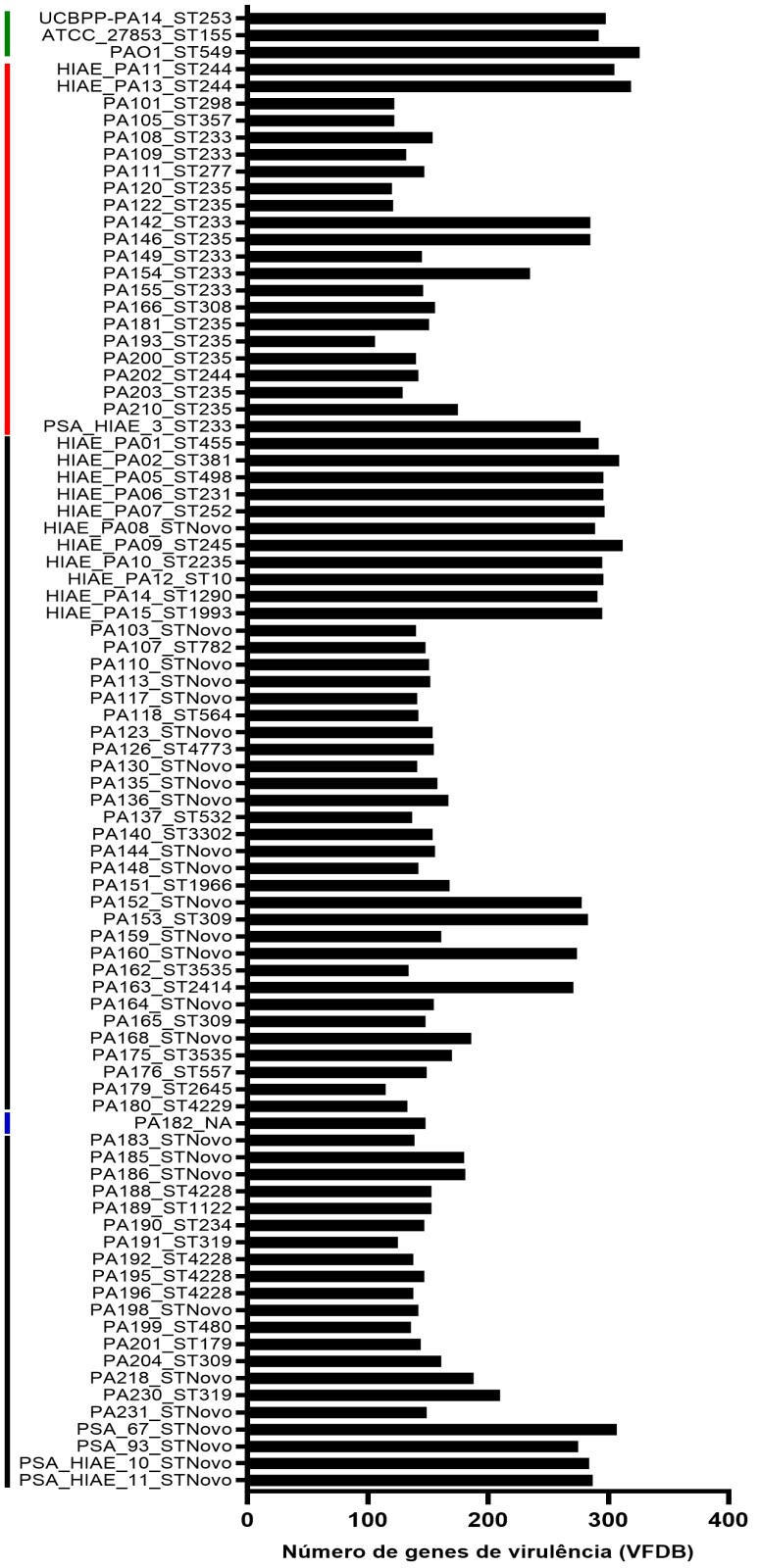
Em geral, ao comparar clones de alto risco e esporádicos, ambos apresentavam um número semelhante de genes resistência antimicrobiana. No entanto, ao analisar por classe, os resultados indicam que os clones de alto risco carregam com mais frequência genes de resistência a aminoglicosídeos, e para os beta-lactâmicos os genes *bla*$_{\text{VIM-2}}$ e *bla*$_{\text{IMP-16}}$ foram também mais prevalentes em clones de alto risco. Para a classe dos genes de resistência a aminoglicosídeos no qual 12 genes e/ou variantes foram identificados, os clones de alto risco apresentaram mais genes dessa classe em comparação aos clones esporádicos, com a única exceção sendo o gene *aph(3')-IIb* (clones esporádicos 31,15% *versus* clones de alto risco 27,27%). Em relação aos principais genes que conferem resistência a beta-lactâmicos, *bla*$_{\text{VIM-2}}$ (31,82 *versus* 6,56%) e *bla*$_{\text{IMP-16}}$ (4,55 *versus* 1,64%) foram mais recorrentes nos clones de alto risco do que nas cepas esporádicas.



As cores do mapa de calor indicam: branca representa a ausência do gene e preto genes/variantes presentes nas cepas avaliadas. A linha vermelha vertical antes dos IDs das cepas destaca as cepas pertencentes a clones de alto risco, enquanto a linha preta vertical destaca os clones esporádicos e a linha azul vertical destaca cepa sem ST. ST: *sequence type*; NA: não atribuído.
Figura 7. Distribuição da presença e ausência dos genes/variantes identificados nas 84 cepas de *P. aeruginosa* sequenciadas neste estudo

3.5 Viruloma e análise *in silico* da contribuição destes genes para a virulência de *P. aeruginosa* em *C. elegans*

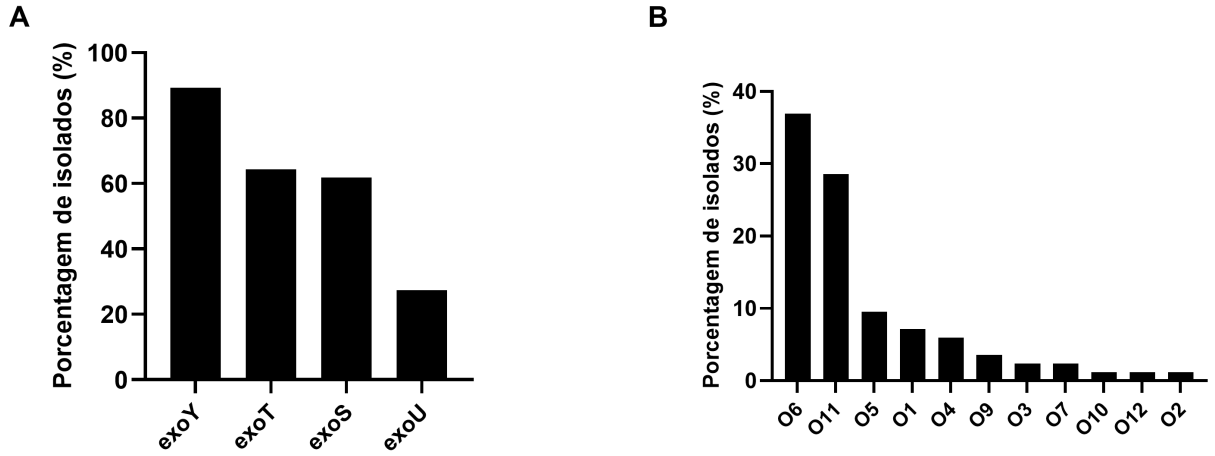
As 84 cepas de *P. aeruginosa* analisadas neste estudo reforçam a elevada adaptabilidade e flexibilidade desta bactéria, pois o número de fatores de virulência únicos identificados foi de 327, e cada cepa carregava entre 106 e 319 fatores de virulência em seu genoma (Figura 8). Este conjunto de 327 genes foram agrupados em 8 categorias de fatores de virulência e foram identificados: sistema de entrega efetor, fatores nutricionais/metabólicos, motilidade, adesão, biofilme, modulação imunológica, exotoxinas e exoenzimas. A busca por genes de virulência foi feita no banco de dados *virulence factor database* (VFDB).



A linha verde vertical antes dos IDs destaca as cepas usadas como referência (UCBPP-PA14, PAO1 e ATCC_2785), a linha vermelha vertical destaca as cepas pertencentes a clones de alto risco, a linha preta vertical destaca as cepas pertencentes a clones esporádicos e a linha azul destaca cepa sem ST. ST: *sequence type*; NA: não atribuído. Pesquisa no banco de dados *virulence factor database* (VFDB).

Figura 8. Distribuição do número de genes de virulência por cepa

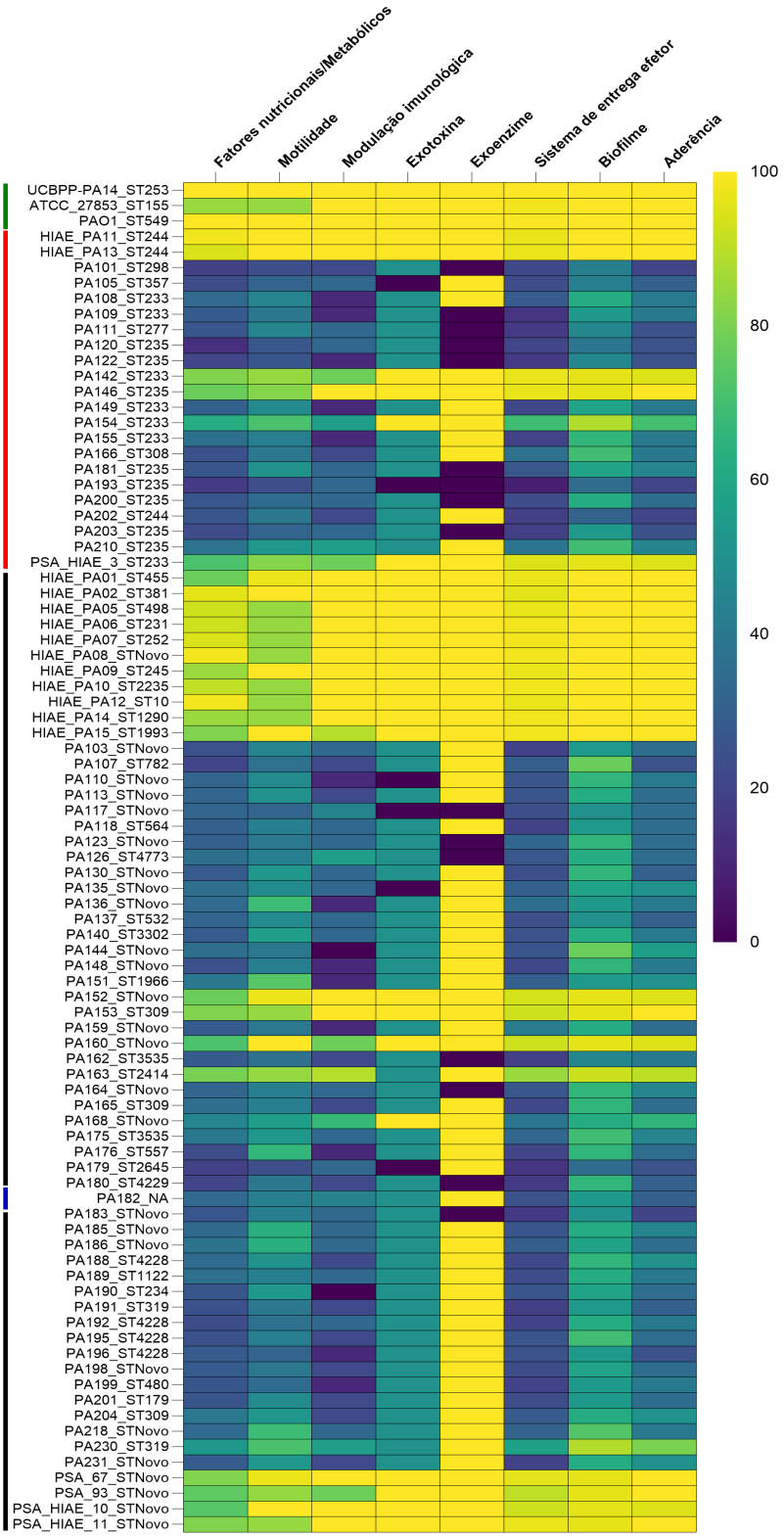
As categorias mais representadas foram sistema de entrega efetor (34,86%), fatores nutricionais/metabólicos (16,51%), motilidade (16,21%) e adesão (14,07%). O sistema de entrega efetor comporta os genes (*exoS*, *exoT*, *exoU*, *exoY*) que formam sistema de secreção tipo III (T3SS), sendo este um importante mecanismo de virulência de *P. aeruginosa*. Por esse motivo, analisamos a presença de componentes T3SS nas cepas estudadas e identificamos as seguintes distribuições: ExoY: 89,29%, ExoT: 64,29%, ExoS: 61,90% e ExoU: 27,38% (Figura 9A). O lipopolissacarídeos (LPS) são componentes importantes da membrana externa de bactérias gram-negativas e desempenha um papel importante na virulência e é responsável por conferir especificidade aos sorotipos. Por isso, analisamos a distribuição dos sorotipos entre as 84 cepas de *P. aeruginosa*. Esta análise revelou 11 sorotipos diferentes: O6, O11, O5, O1, O4, O9, O12, O3, O7, O10 e O2. Os sorotipos mais prevalentes foram O6 (n=31; 36,90%), O11 (n=24; 28,57%) e O5 (n=8; 9,52%) (Figura 9B).



A. Distribuição de cada gene no sistema de secreção tipo 3. B. Distribuição dos sorotipos identificados nas cepas deste estudo.
Figura 9. Distribuição dos genes do sistema de secreção tipo 3 e sorotipo de *P. aeruginosa*

Quando dividimos as 83 cepas de *P. aeruginosa* sequenciadas neste estudo com ST em clones de alto risco (n=22) e clones esporádicos (n=61) e comparamos qual grupo de clones apresentava maior porcentagem de genes de virulência, identificamos que as cepas pertencentes a clones esporádicos frequentemente apresentavam a maior porcentagem de genes de virulência, 61,16% (200/327), enquanto os clones de alto risco apresentavam 21,71% (71/327) e 17,13%

(56/327) dos genes tinham a mesma distribuição em ambos os grupos. Devido à importância da UCBPP-PA14 como cepa altamente virulenta em diferentes modelos de teste, inclusive o nematoide *C. elegans*,[111,148-150] foi realizada uma comparação visando identificar quais dos 298 genes de virulência identificados na UCBPP-PA14 estavam presentes nas 84 cepas sequenciadas. Dos 298 genes de virulência identificados na UCBPP-PA14, 56 genes (18,79%) foram identificados em todas as cepas sequenciadas neste estudo, inclusive nas duas cepas de referência PAO1 e ATCC_27853. Um total de 242 genes de virulência presentes na UCBPP-PA14 apresentava distribuição irregular entre as cepas investigadas neste estudo, estes genes com distribuição irregular foram agrupados por classe de virulência para avaliar a similaridade entre o viruloma da cepa UCBPP-PA14 e as cepas investigadas neste estudo. Os 242 genes foram categorizados em 8 classes de virulência (Figura 10). Dentre essas classes, a classe exoenzima estava presente em mais de 80% das cepas (81,61%), tornando-se a classe mais conservada quando comparada à UCBPP-PA14 (Figura 10). Entretanto, quando analisamos apenas os clones de alto risco para a presença da classe exoenzima, verificamos que 59,09% (13/22) dos clones de alto risco foram positivos, em comparação com 88,52% (54/61) dos clones esporádicos. Essa classe de fatores de virulência desempenha um papel importante na evasão imune de *P. aeruginosa*, pois suprime localmente a resposta imune do hospedeiro.

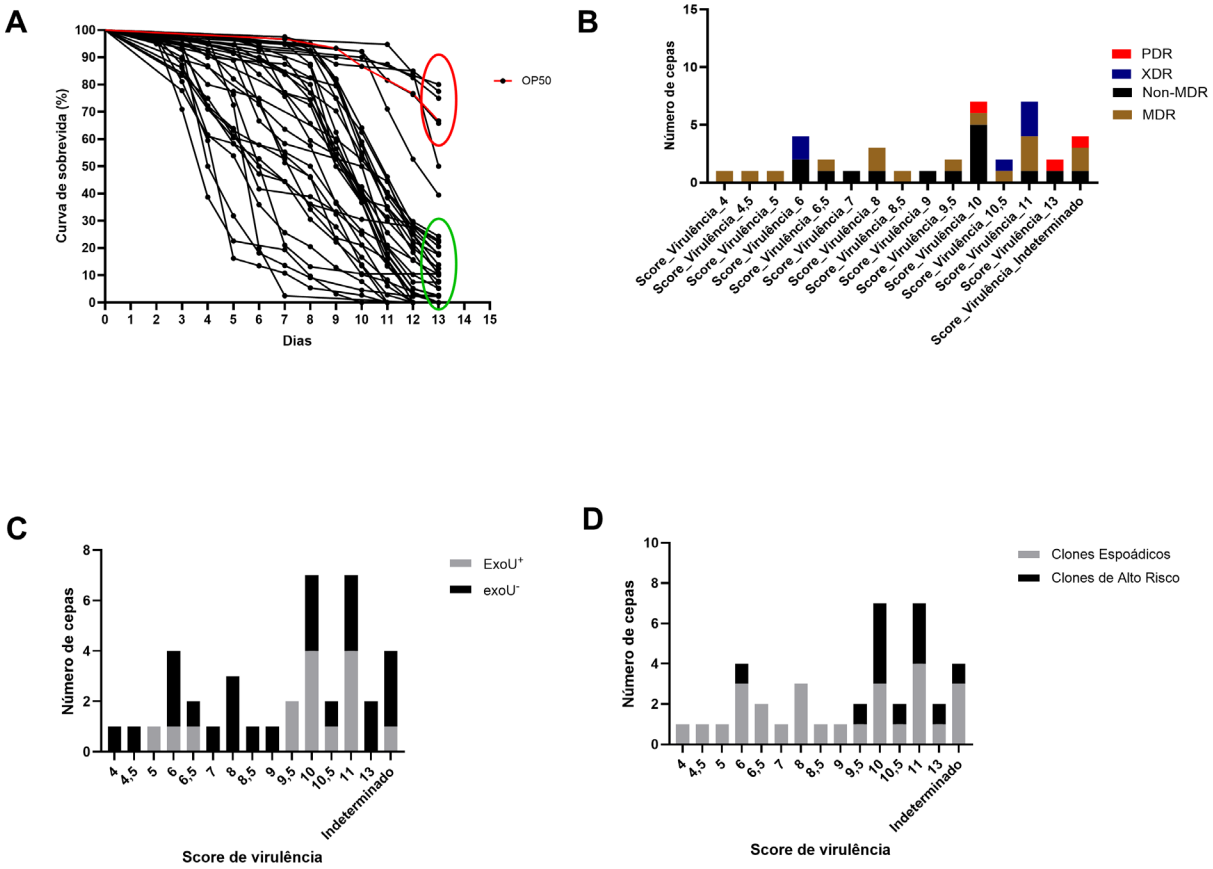


Cepas avaliadas no mapa de calor em relação ao viruloma da cepa de referência UCBPP-PA14. A linha verde vertical destaca as cepas usadas como referência (UCBPP-PA14, PAO1 e ATCC_2785), a linha vermelha vertical destaca as cepas pertencentes a clones de alto risco, a linha preta vertical destaca as cepas pertencentes a clones esporádicos e a linha azul vertical destaca cepa sem ST. ST: *sequence type;* NA: não atribuído.

Figura 10. Mapa de calor demonstrando a porcentagem das classes de virulência encontradas nas 84 cepas de *P. aeruginosa*

3.6 A virulência em relação ao nematóide *C. elegans* varia fortemente entre as cepas de *P. aeruginosa*

As interações de *P. aeruginosa* com *C. elegans* foram avaliadas para um conjunto de 39 cepas de *P. aeruginosa*. O ensaio de *slow killing* permitiu separar estas cepas de acordo com a curva de sobrevida (Figura 11A). O *score* de virulência variou de 4 (altamente virulento) a indeterminado (sobrevivência excedia 50% no maior tempo avaliado). Os *scores* de 10 e 11 foram os mais comuns entre as cepas avaliadas, cada um representando 17,94% (7/39), e dentre as cepas mais virulentas observou-se também fenótipo MDR (Figura 11B). O gene exoU é um dos principais marcadores de virulência em *P. aeruginosa*[14] e observou-se *scores* de virulência variados dentre as cepas que carreavam este gene (Figura 11C). Os clones de alto risco (30,76%; 12/39) foram distribuídos entre 7 diferentes *scores* de virulência, com o *score* de virulência 6 representando o mais virulento (Figura 11D). As cepas mais virulentas foram associadas com clones esporádicos, especificamente o ST455 e outras duas cepas com STs ainda não reportados no banco de dados do MLST de *P. aeruginosa*.

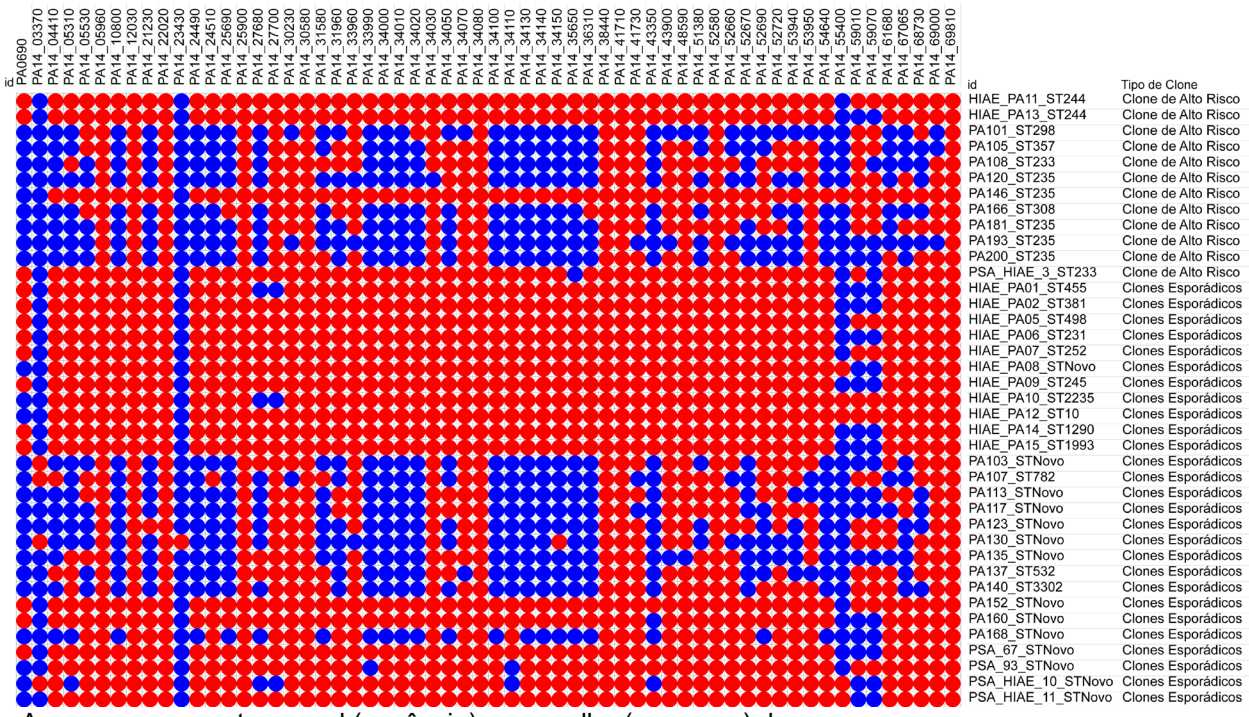


O círculo vermelho destaca as cepas mais virulentas e o círculo verde as cepas menos virulentas. Non-MDR: não multirresistente; MDR: multirresistente; XDR: extensivamente resistente; PDR: pan-resistente. A. Curva de sobrevida dos *C. elegans* expostos a coleção de 39 cepas de *P. aeruginosa*. B. Distribuição do *score* de virulência em função do fenótipo de resistência: Non-MDR, MDR, XDR e PDR. C. *Score* de virulência e presença/ausência de ExoU. D. Distribuição do *score* de virulência entre os clones de alto risco e esporádico.

Figura 11. Virulência de *P. aeruginosa* em relação a *C. elegans*

Uma coleção previamente reportada na literatura de 60 genes de *P. aeruginosa* que contribuem para a virulência em *C. elegans* foi investigada.[106,151,152] As cepas carregavam entre 25 e 95% dos 60 genes analisados (Figura 12). Destes, 10 genes (PA14_05960, PA14_12030, PA14_22020, PA14_25900, PA14_30580, PA14_34080, PA14_38440, PA14_41710, PA14_52580 e PA14_69810), foram identificados em todas as 39 cepas. Os genes identificados com a menor frequência foram: PA14_23430 (1/39; 2,56%), PA14_03370 (4/39; 10,25%) e PA14_55400 (6/39; 15,38%). O PA14_23430/*hepP* mutado em UCBPP-PA14 afeta diretamente sua capacidade de matar o *C. elegans*.[112] Já os genes PA14_03370 e PA14_55400 são genes que contribuem para a virulência de *P. aeruginosa* em *C. elegans*.[153,154] Entre os clones de alto risco, o gene PA14_03370 (proteína hipotética) e PA14_23430 (*hepP*)

estavam ausentes em todos os isolados, tendo sido detectado em 14,81 e 3,70% dos clones esporádicos, respectivamente. No geral, os clones esporádicos carregaram maior proporção dos 60 genes de virulência previamente identificados em *P. aeruginosa*.[109,152,153] Entretanto, os clones de alto risco carregaram 11 genes presentes em todos os isolados do grupo; 10 deles também encontrados em todos os clones esporádicos, mas o gene PA14_27700 (regulador transcricional) foi exclusivo em clones de alto risco.



As cores representam: azul (ausência) e vermelho (presença) do gene.

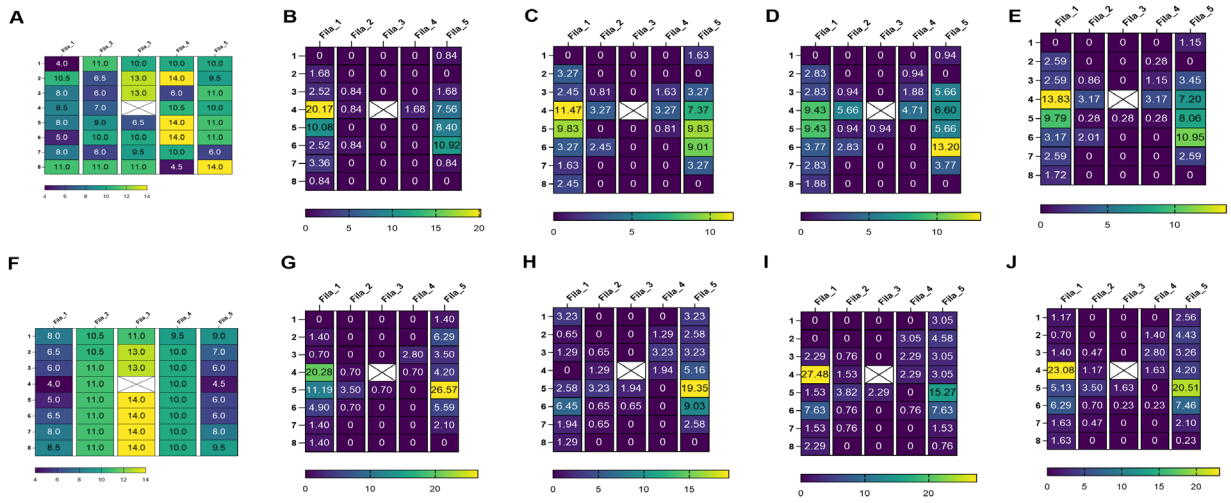
Figura 12. Matriz de presença e ausência dos 60 genes de virulência associados à infecção de *P. aeruginosa* em *C. elegans*

3.7 Fontes alimentares preferidas para *C. elegans*

Fontes alimentares bacterianas estão associadas a benefícios para o *C. elegans*, incluindo o aumento da expectativa de vida e da aptidão reprodutiva, e estes podem identificar e recusar cepas mais virulentas como fontes de alimento.[111] Considerando estes aspectos foram testadas as 39 cepas de *P. aeruginosa* submetidas ao ensaio de *slow killing* com relação à preferência do nematódeo. No primeiro experimento, a distribuição das cepas na placa foi baseada no *score* de virulência (Figura 13A). A escolha da fonte de alimentação foi avaliada por 3 dias consecutivos

(Figura 13B-D). As duas cepas mais escolhidas neste primeiro experimento tinham *score* de 8,5 (13,75% dos vermes escolheram esta fonte de alimentação) e *score* 11 (10,89% dos vermes escolheram esta cepa).

Um segundo experimento foi realizado distribuindo as cepas de forma diferente, com as cepas mais virulentas na borda da placa (Figura 13F). No primeiro dia de avaliação a cepa com *score* 6 foi a principal escolhida, com 26,57% dos vermes (Figura 13G), no segundo dia o resultado foi similar (Figura 13H), e no terceiro dia, uma cepa com score de 4 (altamente virulenta) foi a preferida (Figura 13I). O compilado dos três dias demonstrou que a cepa preferida tinha *score* de 4 (23,08% dos vermes), seguida por cepa com *score* 6 (20,51% dos vermes) (Figura 13J). Estes resultados demonstram que o *C. elegans* não foi capaz de escolher cepas menos virulentas como sua fonte de alimentação quando consideramos resultados de *slow killing,* fato que pode estar relacionado com a linhagem do *C. elegans* ou com fatores bacterianos que permitiriam esta identificação por parte do *C. elegans* e não estavam expressos neste ensaio.[111,155]



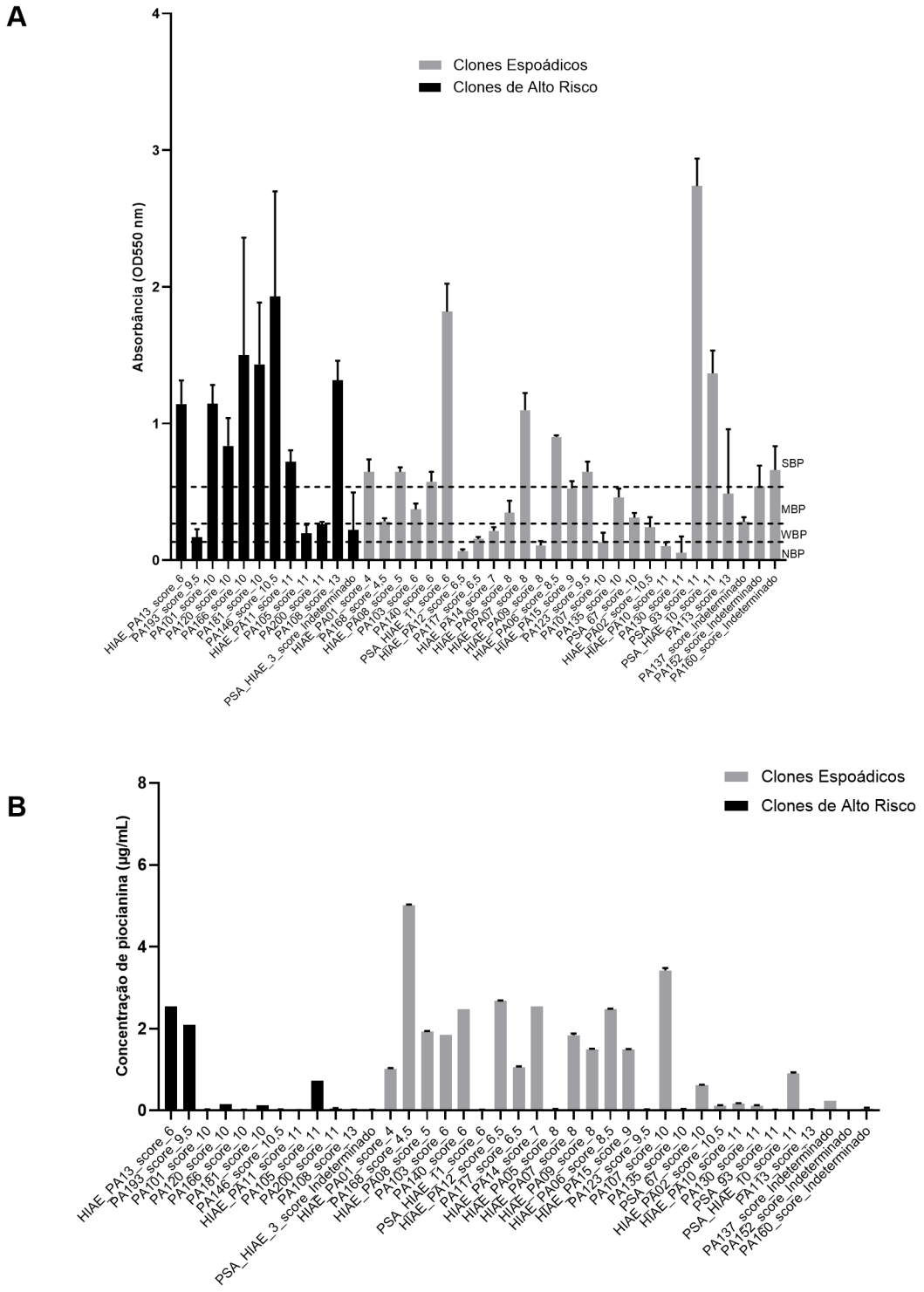
Foram distribuídas 8 cepas por coluna totalizando as 39 cepas de *P. aeruginosa*. Fila: cepas de *P. aeruginosa* adicionadas. A. Distribuição do *score* das cepas na placa do primeiro experimento. B. Distribuição dos vermes em porcentagem no primeiro dia. C. Distribuição dos vermes em porcentagem no segundo dia. D. Distribuição dos vermes em porcentagem no terceiro dia. E. Avaliação total da distribuição do *C. elegans* nos três dias de experimento. F. Distribuição do *score* das cepas na placa do segundo experimento. G. Distribuição dos vermes em porcentagem no primeiro dia. H. Distribuição dos vermes em porcentagem no segundo dia. I. Distribuição dos vermes em porcentagem no terceiro dia. J. Avaliação total da distribuição do *C. elegans* nos três dias de experimento.

Figura 13. Comportamento alimentar preferido do *C. elegans*

3.8 Habilidade de *P. aeruginosa* para formação de biofilme e piocianina

A habilidade de diferentes isolados formar biofilme foi avaliada por 24 horas para as 39 cepas que foram submetidas ao ensaio de *slow killing* (Figura 14A). Quando fragmentamos a produção de biofilme nos grupos NBP, WBP, MBP e SBP, observamos que 12,82% das cepas não foram produtoras de biofilme (NBP), 15,38% foram produtores fracos de biofilme (WBP), 23,08% foram produtores moderados de biofilme (MBP) e 48,72% das cepas foram fortes produtores de biofilme (SBP). Quando analisamos clones de alto risco *versus* clones esporádicos, observamos que os clones de alto risco são mais produtores de biofilme do que clones esporádicos, pois os clones de alto risco foram mais representativos nos grupos WBP (25 *versus* 11,11%) e principalmente no grupo de maiores produtores de biofilme SBP (66,67 *versus* 40,74%) e nenhuma cepa pertencente aos clones de alto risco foi classificado como NBP. No entanto, os clones de esporádicos tiveram 18,52% das cepas classificadas como NBP e foram mais representativos no grupo MBP (29,63 *versus* 8,33%).

A capacidade de produção de piocianina em 24 horas também foi avaliada (Figura 14A). Entre as 39 cepas avaliadas, nem todas foram produtoras de piocianina usando o método adotado neste estudo, e a produção variou entre 0 e 5,02µg/mL. As cepas que mais produziram piocianina foram a PA168 (5,02µg/mL) e a PA107 (3,42µg/mL), enquanto as cepas que apresentaram *score* de virulência ≥10 frequentemente foram as cepas com baixa produção de piocianina. Quando comparamos a produção de piocianina entre os clones de alto risco e clones esporádicos, observamos que a produção de piocianina dos clones esporádicos foi superior (Figura 14B).



As cepas foram submetidas ao ensaio de *slow killing* agrupadas por clones de alto risco e clones esporádicos. A. Formação de biofilme. B. Produção de piocianina. NBP: não produtoras de biofilme; WBP: produção fraca de biofilme; MBP: produção moderada de biofilme; SBP: produção forte de biofilme.

Figura 14. Formação de biofilme e produção de piocianina para as 39 cepas de *P. aeruginosa*

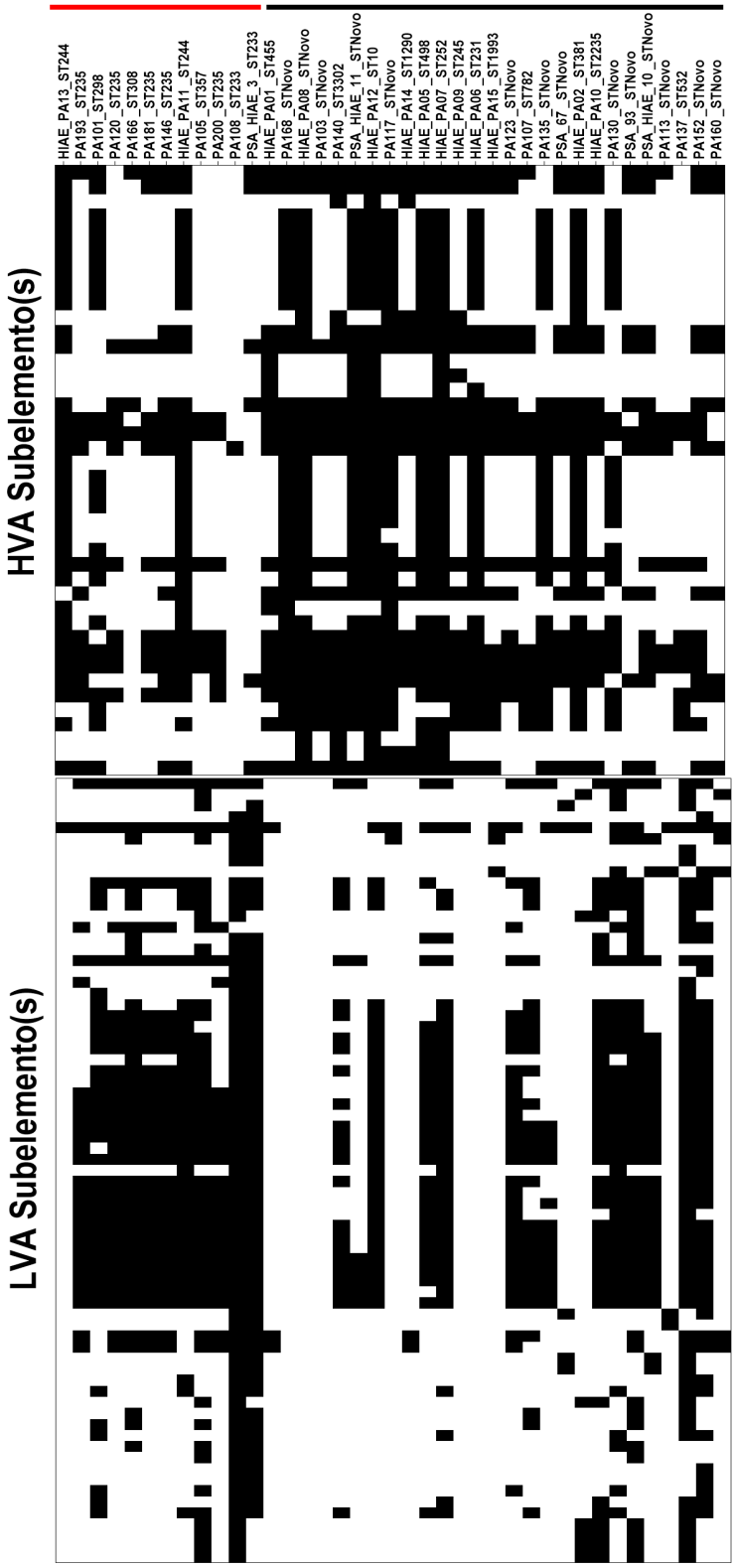
3.9 A virulência de *P. aeruginosa* se correlaciona com a presença de elementos acessórios do genoma

Para identificar sequências do genoma acessório que possam estar associadas com isolados mais virulentos utilizamos o *pipeline* descrito por Allen et al., com algumas modificações.[8] O genoma central das 84 cepas de *P. aeruginosa* foi determinado pelo programa Spine. A partir deste genoma central, o genoma acessório para cada uma das 39 cepas que foram submetidas ao ensaio de *slow killing* foi determinado através do programa AGEnt.[21] O genoma acessório foi então analisado usando o ClustAGE para determinar os padrões de sequências compartilhadas entre as 39 cepas. Uma vantagem desta abordagem é que ela é independente da anotação dos genes, sendo assim capaz de identificar sequências intergênicas e intragênicas que diferem entre os isolados. Esta análise identificou 10.899 subelementos que estavam distribuídos através das 39 cepas.

Após a identificação destes subelementos, estes foram submetidos a uma análise de associação genética para testar se a virulência das cepas de *P. aeruginosa* em direção ao *C. elegans* poderia estar associada à presença ou ausência de certos elementos do genoma acessório AGEs/subelementos. Nesta análise, a virulência é definida como uma característica quantitativa para cada cepa, correspondendo ao score obtido a partir do ensaio de sobrevida de *C. elegans* quando alimentados com cada uma das cepas. A associação entre AGEs/subelementos e virulência foi medida usando os testes de MW e LR, seguidos por uma abordagem de permutação genética, para controlar múltiplos testes estatísticos e, assim, avaliar a confiabilidade do valor-p. Na análise de associação foram avaliados 10.899 subelementos que foram associados ao genoma acessório das 39 cepas de *P. aeruginosa*.

Entre os 10.899 subelementos presentes no genoma acessório das 39 cepas avaliadas, a análise de associação identificou 113 subelementos que foram associados com a virulência, seja positivamente ou negativamente (Figura 15, valor-p<0,01 para o teste de MW ou LR). Dos 113, 42 subelementos (37,16%) foram identificados em um conjunto de cepas com elevada virulência. Nós então referenciamos estes como subelementos associados à alta virulência (HVA – *high virulence-associated subelements*). Para os outros 71 subelementos (62,83%) a

presença foi associada com cepas de baixa virulência. Nós então referenciamos estes como subelementos associados à baixa virulência (LVA – *low virulence-associated subelements*). A sequência de nucleotídeos dos 113 subelementos associados com virulência foi submetida a anotação pelo Prokka v1.14.6. Por esta análise 57/113 subelementos foram anotados com sucesso, gerando 120 sequências codificadoras (CDS – *coding sequences*), 2/113 subelementos foram identificados como CRISPR (CRISPR – *clustered regularly interspaced short palindromic*) e 56/113 não foram anotados pelo Prokka. Das 120 CDS geradas pelo Prokka, 102 foram anotados como proteínas hipotéticas. Portanto, as sequências de nucleotídeos das 120 CDS gerados pelo Prokka foram submetidas a uma busca BLASTN usando o banco de dados de nucleotídeos core_nt, selecionando “Pseudomonas aeruginosa (taxid:287)” como o organismo. Além disso, realizamos a mesma análise usando apenas o genoma da cepa UCBPP-PA14. Na primeira abordagem, após a análise BLASTN, apenas 22 CDS permaneceram anotados como proteínas hipotéticas (Apêndice 3). Na segunda comparação, usando apenas o genoma da cepa UCBPP-PA14, foram identificados 74 CDS alinhados com genes ou fragmentos de genes da cepa UCBPP-PA14 (Apêndice 3).



A linha vermelha superior horizontal destaca as cepas pertencentes aos clones de alto risco, e a linha preta destaca os clones esporádicos. Preto indica presença do subelemento e branco ausência do subelemento. HVA: subelementos associados à alta virulência; LVA: subelementos associados à baixa virulência.

Figura 15. Matriz de presença e ausência de subelementos HVA e LVA

3.10 Genes associados à alta e baixa virulência em *P. aeruginosa*: funções e distribuição

Entre as anotações encontradas para o grupo do HVA podemos destacar os genes que foram encontrados na cepa *Pseudomonas aeruginosa* UCBPP-PA14: PA14_33690 (*pvdE*), PA14_33680 (*fpvA*), PA14_33650 (*pvdD*), PA14_33610 (*pvdI*), PA14_33630 (*pvdJ*) estes genes são associados a produção de pioverdina que é um importante fator de virulência para *P. aeruginosa*. Outros exemplos de HVA são: *wzzB*, *wbpA*, *wbpB*, *wbpD*, *wbpE* e *wzY*. Estes homólogos codificam enzimas requeridas para a síntese do LPS antígeno O, um componente estrutural da membrana externa bacteriana. Estes genes são conhecidos por contribuírem com a virulência de *P. aeruginosa*.

No entanto, a análise também revelou alguns genes que não foram previamente associados com a virulência em *C. elegans* (Apêndice 3). Por exemplo o gene cdsA (PA14_17120) está relacionado ao metabolismo do glicerofosfolipídio. Os glicerofosfolipídios de *Pseudomonas* possuem funções estruturais e desempenham papéis importantes na adaptação bacteriana às modificações ambientais. O gene (*clpP*) não foi ainda associado com a virulência de *Pseudomonas* em *C. elegans*, mas está associado a formação de biofilme em algumas espécies patogênicas.[183,184] O *wecA* está envolvido na síntese de LPS e os genes associados a síntese de LPS são comumente associados a virulência, como por exemplo: *wbpX* (PA5449), *wpbY* (PA5448), e *wbpZ* (PA5447).[156]

Por outro lado, vários dos genes associados com baixa virulência LVA foram anotados como elementos conjugativos integrativos (PA14_60130, PA14_59660, PA14_59670, PA14_59680, PA14_59690 e PA14_59860), e alguns relacionados a fagos (bin5_se000211 e bin19_se00022) (Apêndice 3). Os subelementos anotados como CRISPR foram associados com o grupo LVA.

Nós investigamos a distribuição de genes não previamente associados à virulência contra *C. elegans* entre clones de alto risco e clones esporádicos. Para o gene *cdsA* (PA14_17120, fosfatidato citidililtransferase), 58,33% (7/12) dos clones de alto risco apresentavam esse gene, em comparação com 85,19% (23/27) dos clones esporádicos. Para o gene *clpP*, nenhum dos clones de alto risco apresentava o subelemento correspondente, enquanto 14,81% (4/27) dos clones

esporádicos o apresentavam. Em relação ao gene *wecA*, o subelemento que contém esse gene estava ausente nos clones de alto risco, mas presente em 25,93% (7/27) dos clones esporádicos.

Para genes previamente associados à LVA, como PA14_60130, PA14_59130, PA14_59660, PA14_59670, PA14_59680, PA14_59690 e PA14_59860, todos foram encontrados com maior frequência em clones de alto risco do que em clones esporádicos. Um padrão semelhante foi observado para bin5_se00011 e bin19_se00022, bin19_se00012 que são subelementos associados a fagos.

3.11 Investigando genes associados a HVA e genes associados a LVA em clones esporádicos e de alto risco de bancos de dados públicos

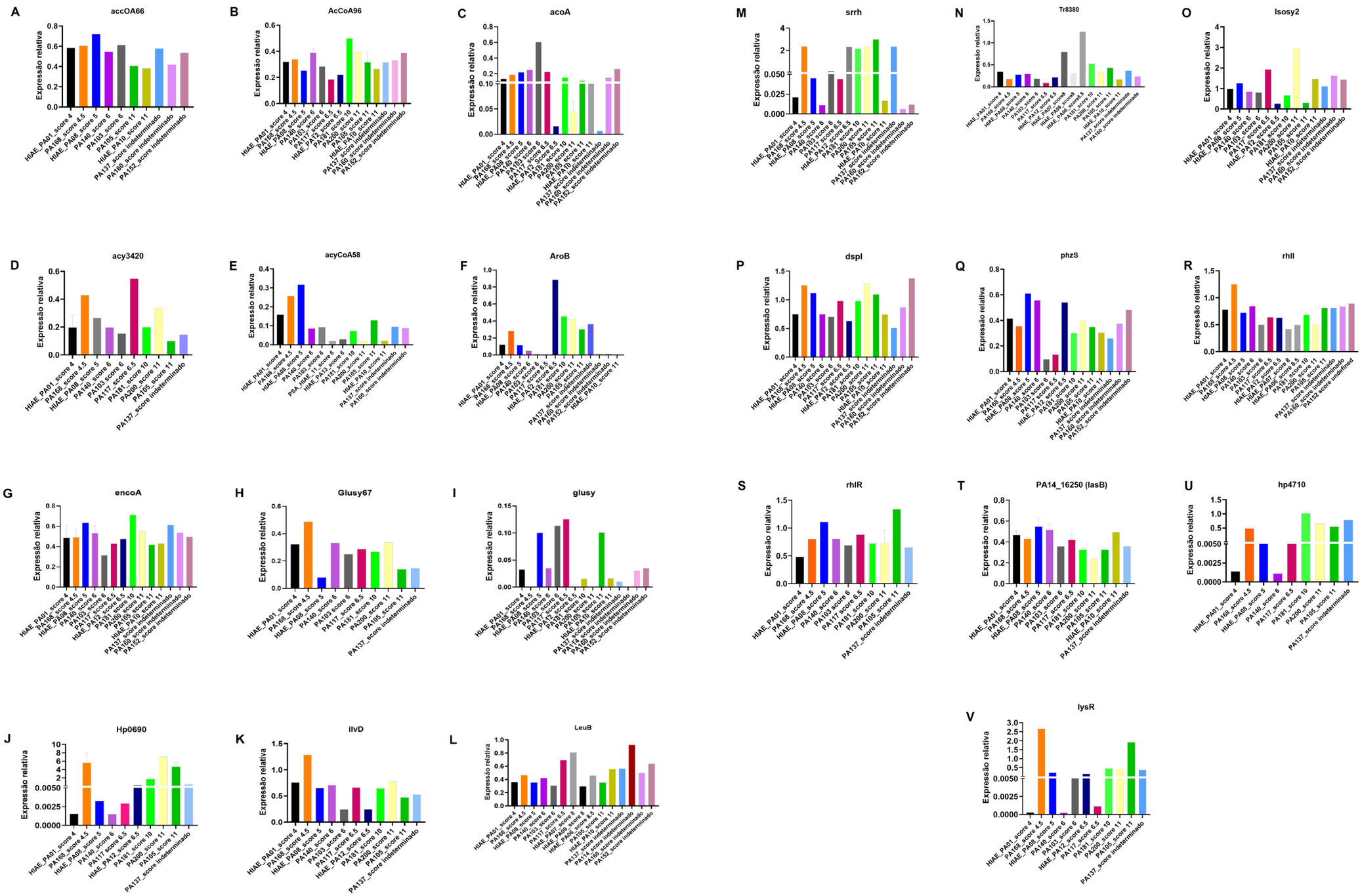
A análise do pangenoma realizada com Roary em 4.835 genomas de *P. aeruginosa* (3.176 clones esporádicos e 1.659 clones de alto risco) produziu um pangenoma contendo 58.754 genes. O genoma central foi definido por um conjunto de 4.496 genes, com o genoma central definido como aqueles genes presentes em ≥95% dos genomas analisados. Para identificar genes no genoma acessório associados a clones de alto risco *versus* clones esporádicos, utilizamos Scoary, colapsando genes que exibiam padrões idênticos de presença/ausência em todos os isolados sequenciados (por exemplo, genes organizados em *operons*, ligados a MGEs, etc.) em unidades e comparando as frequências de unidades entre clones de alto risco e esporádicos. Um total de 5.966 genes foram associados a genomas de alto risco ($p<0,05$, Bonferroni). No entanto, nenhum gene foi encontrado como exclusivo em clones de alto risco. Entre os 5.966 genes do genoma acessório, que foram mais frequentemente associados a clones de alto risco, buscamos os 113 subelementos encontrados associados à virulência de *P. aeruginosa*, positiva (HVA) ou negativamente (LVA). Para os 71 subelementos associados negativamente (LVA) em nossas 39 cepas submetidas ao ensaio de *slow killing* de *C. elegans*, 42,25% (30/71) desses subelementos foram encontrados entre os 5.966 genes do genoma acessório ($p<0,05$, Bonferroni), representando um total de 37 genes. Esses 37 genes foram associados principalmente a clones de alto risco, exceto para o grupo_24287. Dos 42 subelementos associados positivamente à HVA, 28,57% (12/42) foram encontrados principalmente entre os 5.966 genes do genoma acessório ($p<0,05$, Bonferroni),

representando um total de 23 genes. No entanto, todos eles foram principalmente associados a clones esporádicos.

3.12 Expressão de genes de *P. aeruginosa* durante a infecção *in vivo* no *C. elegans*

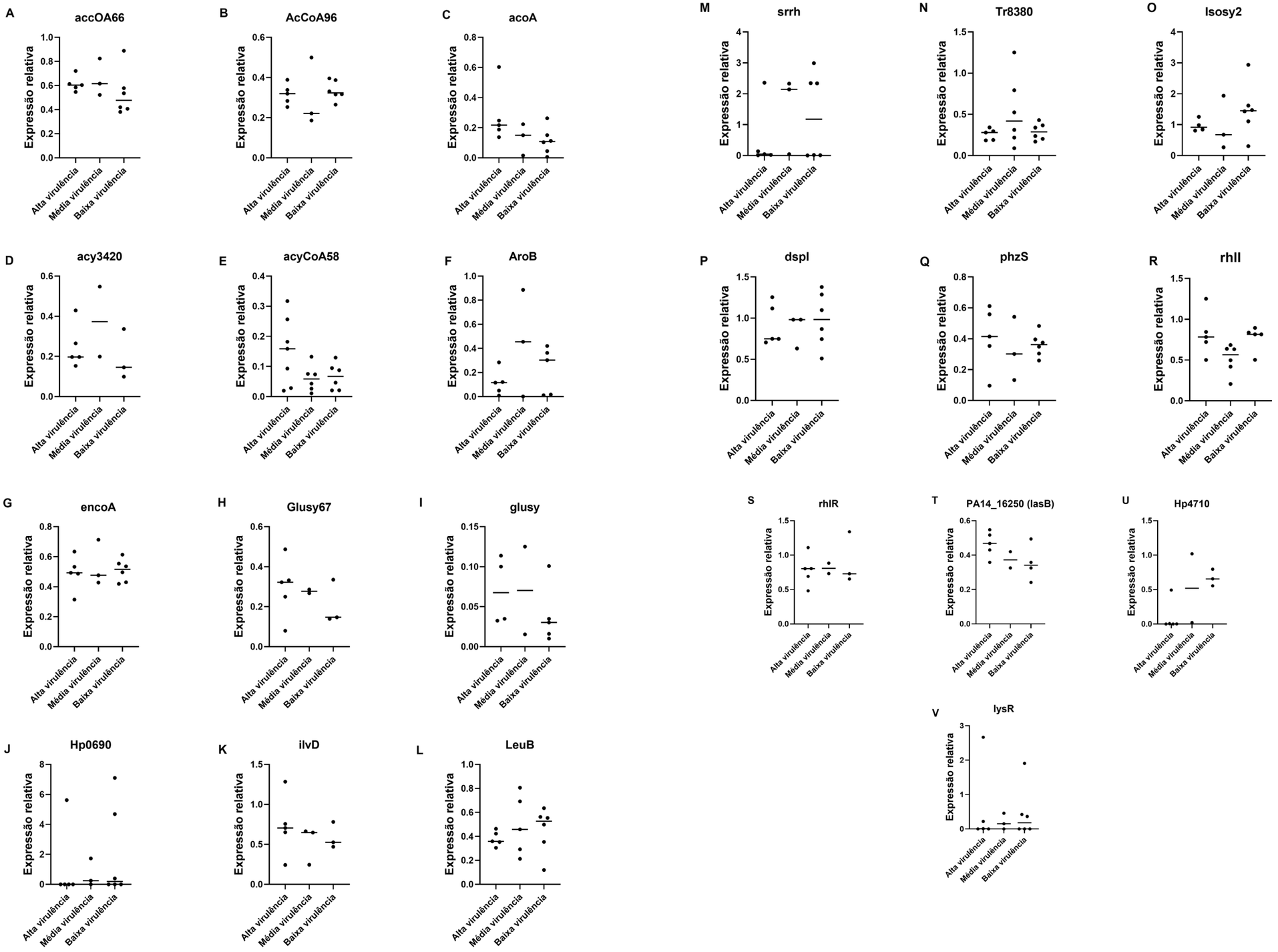
Foram selecionados 37 genes de *P. aeruginosa* relacionados ao metabolismo central e genes de virulência para a análise de expressão gênica após 72 horas de infecção em *C. elegans* (Apêndice 1). Estes 37 alvos foram escolhidos com base nos resultados encontrados por Panayidou et al.[5] que identificam um conjunto de genes diferencialmente expressos em cepas de elevada virulência *versus* cepas de baixa virulência. Para estes ensaios foram selecionadas cepas com elevada virulência (*score* baixo), cepas com virulência intermediária e cepas com baixa virulência (*score* alto).

Dentre os 37 genes, 15 apresentaram amplificação inespecífica e foram removidos das análises. Os 22 genes que não tiveram problemas na amplificação podem ser divididos em: 15 genes relacionados ao metabolismo central de *P. aeruginosa* (Figura 16 A-O), 5 genes de virulência de *P. aeruginosa* (Figura 16 P-T) e 2 genes não relacionados com metabolismo ou diretamente com a virulência (Figura 16 U-V). Todos os resultados de amplificação foram normalizados por resultados para o gene *rpl*U 50S *ribosomal protein* L21.



72 horas de experimento *slow killing*.
Figura 16. Expressão gênica de 22 genes de *P. aeruginosa* avaliados durante a infecção em *C. elegans* por *P. aeruginosa*

Para analisar diferenças na expressão, foram formados três grupos de acordo com o *score* de virulência: alta (*score* entre 4 e 6), média (*score* entre 6,5 e 10) e baixa virulência (*score* ≥ 11) usando os *scores* obtidos nos ensaios *slow killing* (Figura 17A-V). Não foram encontradas diferenças significativas quando comparados os três grupos.



Os dados de expressão foram agrupados em três categorias e comparados entre si pelo teste *Kruskal-Wallis* considerando p<0,05 como significativo.
Figura 17. Expressão gênica de 22 genes de *P. aeruginosa* avaliada durante a infecção de *C. elegans* por *P. aeruginosa* por 72 horas

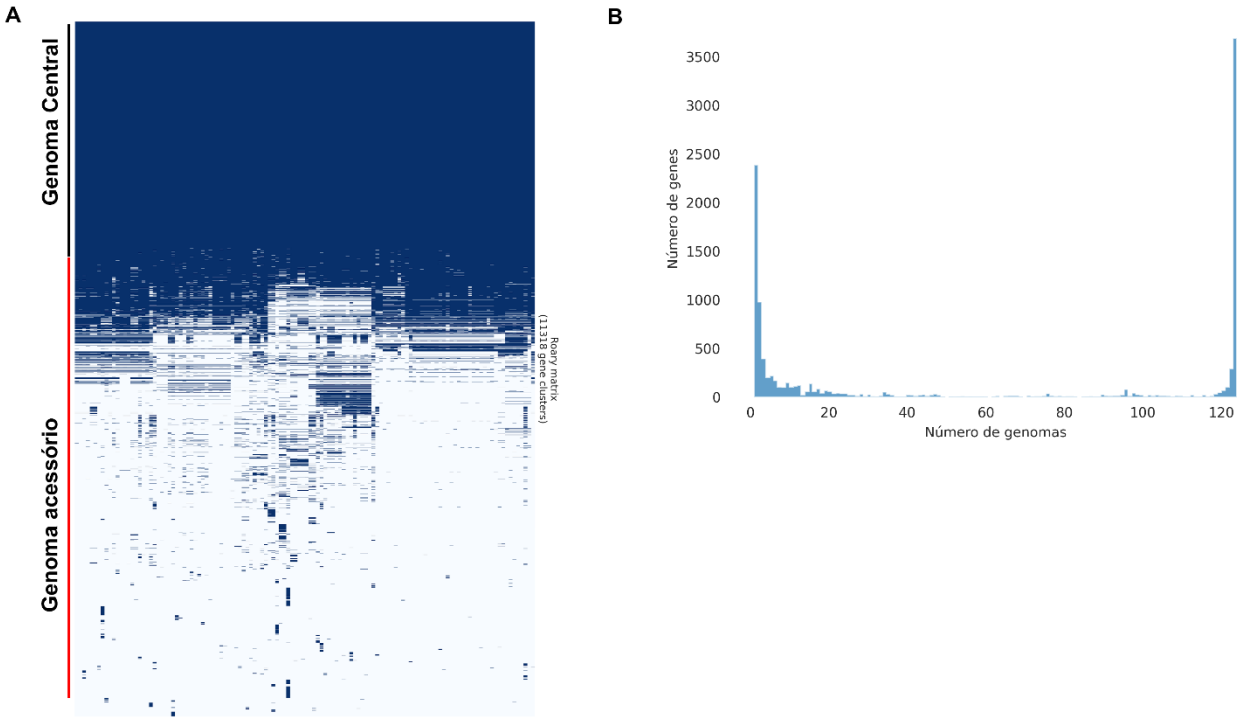
3.13 Caracterização da população de *K. pneumoniae* por PFGE e sequenciamento de genoma completo

Dos 128 pacientes com episódios de colonização/infecção em 30 dias, 54 atenderam aos critérios de inclusão descritos em materiais e métodos, e ambos os isolados de colonização e infecção foram selecionados (n=108). Já para os 523 episódios de colonização, 68 isolados de diferentes pacientes foram selecionados para a análise por PFGE. No total, 176 KpKPC provenientes de 122 pacientes diferentes foram avaliados por PFGE. A partir do perfil de bandas obtido pelo PFGE, foi selecionado pelo menos um pulsotipo para o sequenciamento. Um conjunto de 124 isolados de *K. pneumoniae* carreadores de *klebsiella pneumoniae* produtora de carbapanemase (Kp-KPC) foram sequenciadas. Estes 124 genomas de KpKPC são provenientes de 122 pacientes, sendo 54 destes decorrentes de pacientes que apresentaram episódios de infecção e 70 provenientes de episódios de colonização. Estes 124 genomas de KpKPC foram então anotados para determinar seu pangenoma e depois os genes do genoma acessório foram usados para identificar possíveis genes que poderiam estar associados a infecção do que colonização. Posteriormente os genes do genoma acessório identificados como associados com a característica de infecção foram comparados com os achados em genomas públicos de *K. Pneumoniae.* Para esta análise foram obtidos do RefSeq um total de 15.044 genomas de *K. Pneumoniae* (conforme o tópico 2.4 Seleção de genomas depositados em bancos de dados públicos para análises *in silico*).

3.14 Análise do genoma acessório das 124 cepas de *K. pneumoniae* e sua relação com infecção e colonização, e comparação com resultados obtidos a partir de bancos de dados públicos

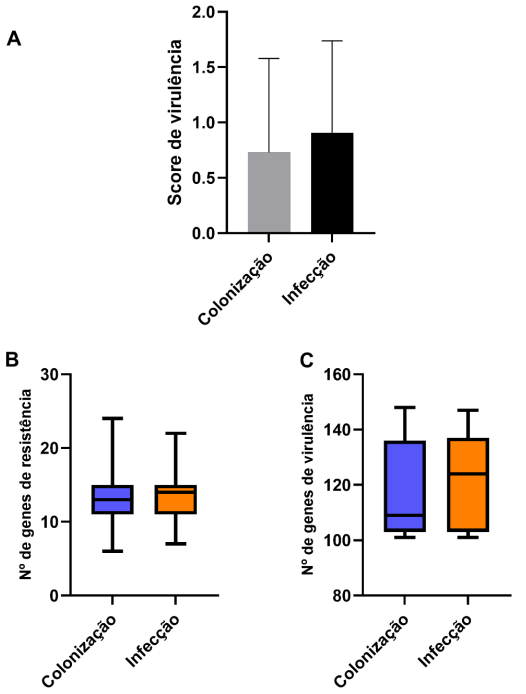
O pangenoma foi determinado com o *software* Roary para as 124 cepas de *K. pneumoniae*, que identificou um pangenoma com 11.318 genes, sendo o genoma central (genes presentes em ≥95% das cepas) construído por 4.258 genes (Figura 18A). O pangenoma destas cepas apresenta uma distribuição bimodal, com máximos proeminentes correspondentes aos genes presentes em todas as cepas analisadas e o conjunto de genes que ocorrem apenas uma vez nestas cepas (Figura 18B). A taxa entre o pangenoma e o genoma central (2,65), confirma que *K. pneumoniae*

abriga uma grande variação em genes codificadores de proteínas e que esta espécie bacteriana possui o pangenoma aberto, ou seja, quanto mais cepas forem sequenciadas mais genes serão identificados.[157]



A. Matriz de presença e ausência dos genes das cepas de *K. pneumoniae.* O genoma central e o genoma acessório estão destacados. B. Frequência e distribuição dos genes entre as 124 cepas.
Figura 18. Características do pangenoma das 124 cepas de *K. pneumoniae*

A comparação do pangenoma entre as cepas de infecção (n=54) e colonização (n=70) revelou que ambos os grupos possuem um número similar de genes no pangenoma (9.142 *versus* 10.858 genes respectivamente), resultado similar foi obtido do genoma central (4.261 *versus* 4.237 genes respectivamente). Usando o *score* de virulência gerado pelo o Kleborate, que é atribuído baseado no número de *loci* de fatores de virulência encontrados nos genomas, não foi identificada diferença significativa entre infecção e colonização (infecção *score* = 0,907 ± 0,830; colonização *score* de virulência = 0,728 ± 0,849, p=0,2429, Student's *t-test*) (Figura 19A). Além disso, também não houve diferença entre o número de genes de resistência e virulência entre os isolados de colonização e infecção (Figura 19B e 19C).



A. *Score* de virulência das cepas de colonização *versus* infecção. B. Número de genes de resistência das cepas de colonização *versus* infecção. C. Número de genes de virulência das cepas de colonização *versus* infecção.

Figura 19. Comparação dos *scores*, genes de virulência e resistência das 124 cepas de *K. pneumoniae* (70 cepas de colonização e 54 de infecção)

Para identificar genes específicos no genoma acessório que poderiam estar associados com cepas de infecção nós usamos o Scoary. O Scoary usou como arquivo de entrada o resultado obtido pelo Roary. O Roary necessita que os genes estejam anotados para realizar sua análise de pangenoma. Foram identificados 25 genes que apresentaram um valor-p<0,05 que estavam mais associados com a característica de infecção do que colonização. Estes 25 genes podem ser divididos dentro de 7 categorias, sendo elas: proteínas hipotéticas (n=16), fator de divisão celular (n=2), elemento genético móveis (n=1), regulador transcricional (n=1), resistência a antibióticos (n=2), genes de resistência a metais (n=2) e transportador de íons (n=1). Vale ressaltar que nenhum destes 25 genes estava exclusivamente presente nos isolados de infecção e nenhum dos 25 genes identificados com p<0,05 codifica fatores de virulência conhecidos. Este resultado é concordante com o estudo de Vornhagen et al.[158]

Uma segunda abordagem foi utilizada para verificar possíveis genes associados com infecção. Nesta abordagem nós utilizamos a sequência bruta (sem anotação) dos genomas das 124 cepas de *K. pneumoniae*, as sequências foram então usadas como entrada para os *softwares* Agent, seguido pelo Spine e por fim o ClustAGE. O resultado obtido com o ClustAGE foi usado pelo Scoary para a análise de associação. Por meio da análise de associação realizado pelo Scoary foi identificado que 34 subelementos foram associados com a característica de infecção. Dos 34 subelementos encontrados, apenas 6/34 subelementos possuíam ORFs. As 6 ORFs foram anotadas como: Mph(A) *family macrolide* 2'-*phosphotransferase*, *dihydrofolate reductase*, *sensor histidine kinase* CusS, MFS *transporter*, *transposase*, IS110 *family, hypotetical protein*.

As duas abordagens utilizadas identificaram características distintas associadas com a infecção. Isso pode ocorrer porque a primeira abordagem parte do gene anotado e a segunda abordagem utiliza as sequencias brutas de DNA do genoma não anotado. Uma vantagem de se utilizar a abordagem que é independente da anotação é que esta é capaz de identificar sequências intergênicas e intragênicas.[8]

Dos 15.044 genomas obtidos do RefSeq, após a aplicação de diferentes filtros de qualidade, foram selecionados 10.327 para as análises. Destes, 5.951 genomas foram atribuídos a clones esporádicos e 4.376 foram atribuídos a clones de alto risco. Todos os 10.327 genomas foram anotados, gerando um pangenoma com 61.983 genes, destes 3.903 eram pertencentes ao genoma central (definido neste estudo como genes que deveriam estar presentes em ≥95% dos genomas analisados). Uma análise foi conduzida com o *software* Scoary que usou como arquivo de entrada a matrix produzida pelo Roary com os genes anotados. Esta análise de associação foi conduzida para identificar genes pertencentes ao genoma acessório dos isolados para encontrar relação com clones de alto risco. Foram identificados 7.591 genes associados com a característica de genomas de alto risco (Bonferroni *correction* $p<0,05$). Estes 7.591 foram usados para validar os resultados obtidos na primeira e segunda abordagem que visou identificar genes associados com a característica de infecção das cepas de *K. pneumoniae* avaliadas neste estudo. Em relação aos 25 genes encontrados associados com a característica de infecção de *K. pneumoniae* (n=124), apenas 7/25 genes foram encontrados dentre os 7.591 genes encontrados nos genomas depositados nos bancos de dados públicos usados como validação, sendo os genes: ant1 - *Streptomycin* 3''-*adenylyltransferase*, group_5489 - IS1595 *family transposase* ISSsu9, tap - *hypothetical protein*, silE_1 - *Silver-binding protein* SilE, pcoE - *putative copper-binding protein* PcoE,

srpC - *putative chromate transport protein*, neo - *aminoglycoside* 3'-*phosphotransferase*. Já na segunda abordagem em que foram identificados apenas 6 ORFs associados com a característica de infecção, nenhuma foi identificada entre os 7.591 genes encontrados nos genomas depositados nos bancos de dados públicos usados como validação.

3.15 Caracterização do conjunto de isolados de *K. pneumoniae* por cgMLST e wgMLST

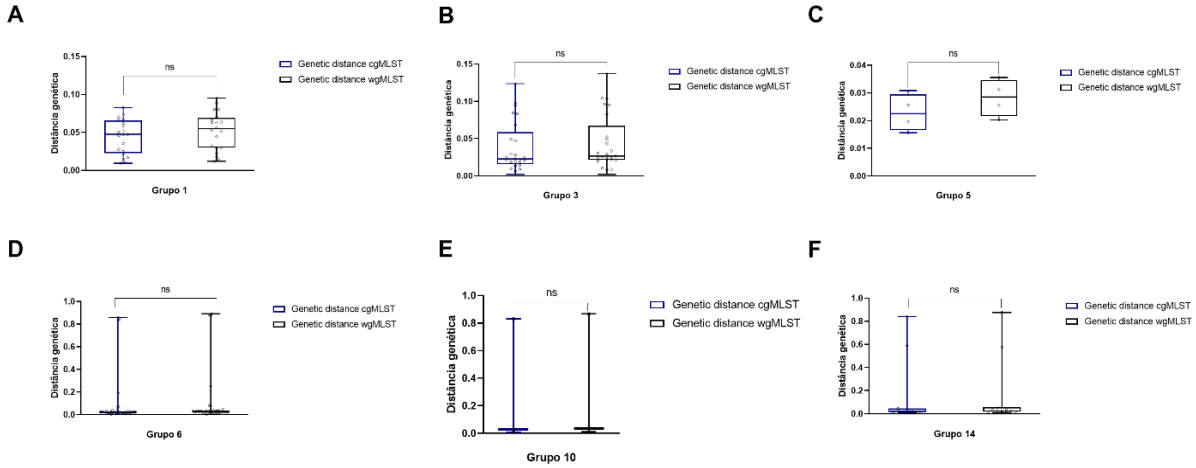
Para investigar o pangenoma de *K. pneumoniae*, 124 cepas que tiveram seus genomas sequenciados foram analisadas. Estas cepas fazem parte de um estudo do nosso grupo de pesquisa que teve como objetivo investigar a transição entre colonização para infecção em pacientes que carregavam *K. pneumoniae* produtora de carbapanemase (KpKPC).[143] Aqui, visamos melhor caracterizar esta população utilizando wgMLST e cgMLST como análises complementares ao MLST anteriormente utilizado.

Como esperado tanto o wgMLST como o cgMLST diferenciaram entre os isolados pertencentes ao mesmo ST. A diferença genética encontrada no wgMLST variou entre: 0,001643578 - 0,892770 e diferença genética por cgMLST: 0,001337494 - 0,858371041. Tanto para o wg/cgMLST a maior diferença genética foi reportada para o grupo 6 (diferença genética por wg/cgMLST: 0,892770 e 0,858371041), este grupo é representado predominantemente por isolados pertencentes ao ST437 (39/43; 90,69%). Por outro lado, a menor distância genética foi encontrada em grupos diferentes por wgMLST e cgMLST: para o wgMLST a menor distância genética foi reportada no grupo 3 (distância genética: 0,001629802) que agrupou apenas isolados pertencentes ao ST11, enquanto para o cgMLST foi identificado no grupo 6 (distância genética: 0,001337494).

Dentre os 124 isolados de *K. pneumoniae* avaliados neste estudo, foram identificadas duas duplas de isolados epidemiologicamente relacionados, tanto com base no número de alelos, quanto baseado na distância genética. Para a primeira dupla, Kp374 e Kp391, observou-se uma diferença alélica com o wgMLST e cgMLST de 7 e 4 respectivamente, e uma distância genética de 0,001629802 para wgMLST e 0,00178731 cgMLST. A segunda dupla de isolados epidemiologicamente relacionados, Kp384 e Kp374, apresentou uma diferença alélica utilizando wgMLST e cgMLST de 7 e

4 respectivamente, e uma distância genética de 0,001643578 para wgMLST e 0,001337494 para cgMLST.

Os resultados obtidos por ambos os métodos demonstram que não houve diferença significativa entre os dados obtidos por cgMLST e wgMLST (Figura 20). Uma das principais diferenças dos dois esquemas, é que o cgMLST inclui genes que são compartilhados por quase ou todos os membros daquela espécie para o qual o esquema foi desenvolvido.(159) Por outro lado, o wgMLST inclui genes relacionados ao genoma acessório dos isolados daquela espécie, e os genes do genoma acessório podem variar com frequência, o que pode impactar no resultado da árvore filogenética.(159) Em uma comparação realizada para *P. aeruginosa* entre wgMLST e cgMLST na literatura, houve perda de discriminação, uma vez que a falta de determinados loci variou entre 2 a 38% entre wgMLST e cgMLST.(159)



A. Comparação entre o grupo 1 com 21 isolados de KpKPC. B. Comparação entre o grupo 3 com 26 isolados de Kp-KPC. C. Comparação entre o grupo 5 com 5 isolados de Kp-KPC. D. Comparação entre o grupo 6 com 43 isolados de Kp-KPC. E. Comparação entre o grupo 10 com 4 isolados de Kp-KPC. F. Comparação entre o grupo 14 com 12 isolados de Kp-KPC. Ns: significância estatística não foi observada considerando p<0,05 (*t-test*). cgMLST: *core-genome multilocus sequence typing;* wgMLST: *whole-genome multilocus sequence typing;* Kp-KPC: *klebsiella pneumoniae produtora de carbapanemase.*

Figura 20. Comparação entre cgMLST e wgMLST para 124 isolados de Kp-KPC

4 DISCUSSÃO

A crescente disseminação de bactérias gram-negativas multirresistentes, especialmente aquelas pertencentes ao grupo “ESKAPE”, representa um dos principais desafios contemporâneos à saúde pública global.[71] Entre esses patógenos, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* têm se destacado não apenas pela ampla resistência a antimicrobianos, mas também pelo alto potencial de virulência. A identificação e caracterização de clones de alto risco, definidos por sua ampla distribuição geográfica, resistência antimicrobiana e elevado potencial patogênico, são essenciais para o entendimento da dinâmica de infecção hospitalar e para o desenvolvimento de medidas de controle mais eficazes.[13,84]

Neste estudo, buscamos elucidar os determinantes genéticos e funcionais que sustentam o sucesso de clones de alto risco de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*, integrando análises genômicas comparativas com abordagens fenotípicas em modelo de infecção com *C. elegans*, para *P. aeruginosa* e a transição de colonização para infecção para *K. pneumoniae*, esta última abordagem baseada em resultados anteriormente obtidos por nosso grupo de pesquisa.[143]

Usando MLST, Curran et al.[160] confirmaram que *P. aeruginosa* exibe uma estrutura populacional epidêmica não clonal.[161] Esta espécie apresenta vários tipos de sequência (ST111, ST175, ST235, ST244 e ST395) distribuídos ao redor do mundo e frequentemente associados a surtos.[14] Devido a frequentes recombinações ocasionalmente surgem clones epidêmicos altamente bem-sucedidos, chamados de clones de alto risco.[161] Neste estudo nós observamos esta característica de não clonalidade, pois identificamos nas 84 cepas sequenciadas 35 STs conhecidos que agruparam 57 cepas e outras 26 cepas às quais foram atribuídos a STs ainda não descritos. Neste estudo nós identificamos 22 cepas que pertencem a clones de alto risco (ST233, ST235, ST244, ST277, ST298, ST308 e ST357). Um dos principais problemas do surgimento de clones de alto risco é que estes frequentemente exibem fenótipos MDR, XDR e PDR representando uma séria ameaça à saúde global.[162]

O rápido aumento na resistência aos antimicrobianos em *P. aeruginosa* está associado com o aparecimento de clones de alto risco multirresistentes entre eles podemos destacar ST111, ST235 e ST175 que são os mais predominantes entre os clones de alto risco. Estes clones de alto risco tem elevada capacidade de

adquirir e manter os genes de resistência, tornando-os um subconjunto distinto das linhagens mais críticas em ambientes hospitalares.[163,164] Neste estudo nós encontramos elevada similaridade entre o número de genes que conferem resistência aos antibióticos entre os clones de alto risco e clones esporádicos. No entanto, a classe dos aminoglicosídeos e os genes que conferem resistência aos beta-lactâmicos *bla*$_{VIM-2}$ e *bla*$_{IMP-16}$ foram principalmente associados a clones de alto risco. Este resultado reforça a elevada plasticidade genômica que os clones de alto risco possuem em adquirir novos genes de resistência e manter estes genes, sendo esta característica um dos traços que fazem os clones de alto risco se destacar em relação aos clones esporádicos.

Como outros patógenos, *P. aeruginosa* codifica fatores de virulência que proporcionam maior aptidão e maiores chances de sobrevivência no hospedeiro, favorecendo a invasão de tecidos e causando danos como por exemplo: necrose tecidual, evasão imune e comprometimento do sistema imunológico.[71,165] Dessa forma os fatores de virulência são os pilares que permitem uma bactéria colonizar e infectar um hospedeiro e são frequentemente responsáveis pelos sintomas da infecção exibidos pelo hospedeiro. *P. aeruginosa* pode produzir uma ampla gama de fatores de virulência, incluindo: (1) pigmentos como piocianina e pioverdina, que podem inibir outros organismos e impactar a progressão da doença, como em fibrose cística, alterando a função da mucosa pulmonar;[166,167] (2) enzimas e toxinas que podem romper as células hospedeiras e auxiliam a invasão bacteriana;[168] (3) flagelos que estão envolvidos na motilidade do patógeno em ambientes líquidos;[169] (4) pili que desempenham um papel na adesão a células e superfícies;[54] e (5) biofilmes que são produzidos tanto no ambiente externo, como em superfícies e dispositivos médicos, bem como durante o curso da colonização/infecção no hospedeiro, além disto os biofilmes fornecem proteção contra antibióticos, produtos de limpeza e o sistema imunológico.[170]

Em relação os diferentes fatores de virulência destacados acima, podemos ressaltar a produção de piocianina. Entre as cepas que foram avaliadas no ensaio de *slow killing*, nem todas foram produtoras de piocianina. Clones esporádicos apresentaram uma produção maior de piocianina do que as cepas pertencentes a clones de alto risco. Esta fraca produção de piocianina por clones de alto risco já foi relatada na literatura.[12] Todas as cepas que foram avaliadas no ensaio de *slow killing* apresentaram diferentes níveis de produção de biofilme. No entanto, as cepas que foram pertencentes aos clones de alto risco foram fortes produtoras de biofilme, ou seja, produziram um biofilme mais robusto do que os clones esporádicos. Esse resultado reforça os achados

da literatura que demonstram que entre os traços associados a característica dos clones de alto risco está a formação de um biofilme mais robusto quando comparado a clones esporádicos.[12]

Todos estes fatores de virulência são envolvidos por circuitos regulatórios complexos e sistemas de sinalização interligados, que conferem a esta bactéria uma grande plasticidade.[32,171,172] Em relação ao viruloma das nossas 84 cepas de *P. aeruginosa* estas apresentaram uma ampla gama de fatores de virulência, sendo que cada cepa carregava entre 106 a 319 genes de virulência, reforçando os achados da literatura sobre um arsenal de virulência diversificado, graças a sua plasticidade genômica.[173] Destacamos ainda que o número de genes de virulência não foi fator que implicou o score de virulência no ensaio de *slow killing*. Este resultado reforça os achados de Panayidou et al., que reportaram que a virulência não pode ser explicada apenas analisando a presença e ausência de genes, mas sim a nível transcricional.[5]

Em termos de toxinas, o T3SS é um sistema complexo e pode dificultar severamente a defesa do hospedeiro por meio da injeção de citotoxinas, incluindo ExoU, ExoT, ExoS e ExoY, que afetam o ambiente intracelular, especialmente bloqueando a fagocitose e a eliminação bacteriana.[60] Este sistema é o mais importante e amplamente estudado em *P. aeruginosa*, e em geral os genes *exoT*, *exoS* e *exoY*, podem ser identificados em até 100% dos isolados, e o *exoU* em menos da metade dos isolados clínicos (24–42%).[54,174] De todas as cepas sequenciadas neste estudo, apenas 27,38% carregavam o gene *exoU*, resultado similar ao observado na literatura. O gene *exoU* é identificado em praticamente todos os isolados ST235 de *P. aeruginosa*.[14,147] Todos os isolados ST235 deste estudo também carregavam o gene *exoU*, demonstrando que este elemento genético móvel é quase que intrínseco desta linhagem. Analisando, as categorias de virulência, a mais conservada dentre as 8 categorias identificadas neste estudo, foi a exotoxina. Esta classe inclui o gene *aprA*, este gene foi mais associado a clones esporádicos. *P. aeruginosa* secreta a protease alcalina deste fator de virulência (*aprA*) para aumentar sua sobrevivência. A *aprA* cliva uma das principais moléculas de reconhecimento microbiano, a flagelina monomérica, diminuindo assim a ativação do receptor *toll-like* 5. Além disso, a *aprA* degrada proteínas do hospedeiro, como proteínas do sistema complemento e citocinas.[175]

Para integrar as análises genômicas comparativas em *P. aeruginosa* com abordagens fenotípicas, utilizamos o modelo de infecção *C. elegans*. A escolha deste modelo experimental segue diretrizes éticas modernas,[101,107,176] se fundamenta

em evidências de sua robustez na predição de genes críticos para a virulência em vertebrados,[101,107] e é particularmente relevante diante da diversidade do genoma acessório de *P. aeruginosa*, o qual desempenha papel central na aquisição de fatores de virulência e resistência.

Escolhemos o genótipo *C. elegans* glp-1(e2144) III pois este genótipo tem como diferencial a possibilidade de inibirmos a geração de progênie através da temperatura, o que permitiu acompanhar os vermes desde o dia um até o 12º dia de experimento, definido neste estudo, sem a interferência da proliferação. Através do ensaio denominado *slow killing* nós investigamos a capacidade de virulência das nossas cepas de *P. aeruginosa*. Este método é chamado assim, pois a bactéria cresce em um meio de cultura com baixas quantidades de nutrientes, e a morte do *C. elegans* ocorre de maneira lenta alcançando até vários dias a depender da cepa avaliada. Foi demonstrado que no ensaio de *slow killing* é necessário que a bactéria esteja viva e, conforme o *C. elegans* se alimenta dela, as bactérias vão se acumulando no intestino.[108,176] A variabilidade na virulência entre as cepas de *P. aeruginosa* é comparável com a diversidade genômica presente nesta espécie bacteriana. As cepas de *P. aeruginosa* contém genomas relativamente grandes para um procarioto (5–7 Mb; 5.000–7.000 genes) com uma porção considerável de elementos do genoma acessório.[106] Nossos dados demonstram que a variação da virulência entre as cepas de *P. aeruginosa* no ensaio de *slow killing* pode estar associada à presença de determinados elementos/genes do genoma acessório. Como por exemplo, genes envolvidos na biossíntese de pioverdina: PA14_33690 (*pvdE*), PA14_33680 (*fpvA*), PA14_33650 (*pvdD*), PA14_33610 (*pvdI*) e PA14_33630 (*pvdJ*). A pioverdina, além de quelar ferro de fontes inorgânicas, compete com proteínas do hospedeiro como transferrina e ferroproteínas mitocondriais, impactando vias de defesa celular.[177-179] Também foram identificados genes relacionados à síntese do LPS (*wzzB*,*wbpA*, *wbpB*, *wbpD*, *wbpE*, *wzy*) todos previamente associados à virulência.[180,181] Além de genes previamente já associados com a virulência de *P. aeruginosa*, este trabalho também identificou novos genes não associados com a virulência de *P. aeruginosa* em *C. elegans*. Por exemplo, o *cdsA* (PA14_17120), envolvido no metabolismo de glicerofosfolipídios, está relacionado à adaptação bacteriana em ambientes variáveis.[182] O clpP afeta a formação de biofilmes e *swarming* em *P. aeruginosa*,[183,184] e *wecA* que está envolvido na biossíntese do LPS, assim como os genes *wbpX*, *wbpY* e *wbpZ*.[156] Já o gene *gnu*, com domínio *wcaG*, contribui para resistência à fagocitose ao participar

da biossíntese da fucose capsular.[185] Estes novos genes do genoma acessório associados a uma maior virulência em *P. aeruginosa* em direção ao *C. elegans* reforçam as evidências de que o genoma acessório é enriquecido com genes de virulência com o potencial de conferir traços distintos de patogenicidade em alguns membros de uma espécie bacteriana.[6,8]

Neste estudo foi demostrado que a análise de associação genômica ampla (GWAS - *genome-wide association*) de um conjunto de cepas geneticamente diversas de uma espécie bacteriana pode identificar elementos do genoma acessório que anteriormente não eram associados com um fenótipo específico, que neste caso foi a avaliação da virulência de *P. aeruginosa* contra um modelo de infecção invertebrado o *C. elegans*.

A patogenicidade de *P. aeruginosa* é multifatorial e combinatória, específica da cepa e dependente de fatores complexos do hospedeiro. Os genes necessários para a patogenicidade em uma cepa de *P. aeruginosa* não são necessários nem preditivos de virulência em outras cepas. Ou seja, a virulência é o resultado de um conjunto de genes relacionados à patogenicidade que interagem em diversas combinações em diferentes origens genéticas.[153] Além disto, foi demonstrado por a Panayidou et al. que genes do metabolismo central são essenciais para a completa expressão dos fatores de virulência de *P. aeruginosa*.[5] No entanto, a variação de virulência de *P. aeruginosa* entre cepas, não é totalmente explicada apenas a nível de genoma, ou seja, presença e ausência de genes, mas esta diferença pode ser dissecada a nível de vias específicas por meio da transcriptômica funcional do metabolismo central.[5] Aproximadamente 9% do genoma de *P. aeruginosa* codifica reguladores transcricionais. Esses mecanismos regulatórios impulsionam mudanças fenotípicas e permitem que *P. aeruginosa* ative vias metabólicas específicas, facilitando a absorção e utilização de várias fontes de carbono e nitrogênio, bem como muitos outros nutrientes essenciais, como o ferro.[186] Neste estudo não conseguimos identificar diferenças significativas na expressão de genes específicos avaliados durante a infecção por *P. aeruginosa* através do ensaio de *slow killing.* Além de termos avaliado um número pequeno de isolados, o que possivelmente não foi suficiente para capturar a variabilidade na expressão destes genes selecionados a partir do estudo de Panayidou et al.,[5] a expressão de gênica de *P. aeruginosa* pode variar quando cultivada em LB e *in vivo* no *C. elegans*. Por exemplo, no ensaio de *fast killing* os genes de *P. aeruginosa* responsáveis por levar a morte do *C. elegans* são diferentes dos genes requeridos para

a morte do *C. elegans* em condições de *slow killing* e estes genes não têm sobreposição.[107,108,113]

Para *K. pneumoniae*, utilizamos os resultados fenotípicos destas cepas para tentar encontrar genes que poderiam estar mais associados com a característica de infecção do que colonização, usando a abordagem de GWAS. A partir desta informação realizamos abordagens comparativas entre os dois conjuntos de cepas: 54 cepas isoladas de pacientes que apresentaram episódios de infecção e 70 cepas provenientes de episódios de colonização, sem infecção posterior. Vornhagen et al.[158] também realizaram uma abordagem comparando dois conjuntos de cepas (colonização *versus* infecção), e os autores demonstraram que dentre os genes que foram associados a característica de infecção nenhum havia sido previamente descrito como fator de virulência. Resultado similar foi obtido com as análises conduzidas neste estudo, onde nenhum dos genes associados com a característica de infecção foi classificado como fator de virulência. Genes de resistência a antibióticos foram também associados com a característica de infecção por *K. pneumoniae* em Vornhagen et al., que reportaram os genes $bla_{\text{CTX-M-15}}$, $bla_{\text{OXA-1}}$ e $bla_{\text{TEM-1}}$.[158] Nossos resultados reforçam os achados anteriores, destacando a importância dos genes de resistência antimicrobiana na transição de colonização para infecção por *K. pneumoniae*. Uma das possíveis explicações para que genes de resistência sejam associados a infecção é que estes genes poderiam possibilitar o crescimento e a dominância intestinal após a exposição a um antibiótico.[158] E vale ressaltar que em um trabalho publicado anteriormente por nosso grupo de pesquisa, foi demonstrado que a elevada carga intestinal de enterobactérias carregadoras de bla_{KPC} foi um dos fatores associados com a transição de colonização para infecção em pacientes internados em semi-UTI e UTI.[143]

Dessa forma as análises de GWAS realizadas com genomas provenientes de bactérias da espécie *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* isolados do hospital em avaliação permitiram a identificação de elementos que foram associados com a característica de virulência de *P. aeruginosa*, bem como a identificação de fatores que podem estar mais envolvidos a característica de infecção em *K. pneumoniae*. Os dados obtidos com estas duas espécies bacterianas, foram validados com genomas depositados em banco de dados públicos e os resultados obtidos podem trazer novas possibilidades para o entendimento de clones de alto risco tanto de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*.

Nossos resultados apoiam e complementam estudos anteriores que destacam que a patogenicidade e a virulência de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* são multifatoriais e dependem de fatores complexos do hospedeiro, aqui avaliados através do modelo *C. elegans* para *P. aeruginosa* e pela transição entre colonização e infecção para *K. pneumoniae.*

5 CONCLUSÕES

1. As análises dos genomas de *P. aeruginosa* obtidas de banco de dados públicos demonstraram que 5.966 genes foram relacionados com a característica de clones de alto risco para *P. aeruginosa*. Estes dados podem auxiliar na investigação de novos fatores de virulência e trazer *insights* a respeito das diferenças genéticas entre clones de alto risco e esporádicos que contribuam para a compreensão de determinantes de prevalência de clones em ambientes hospitalares;

2. Para esta abordagem foram sequenciadas cepas de *P. aeruginosa* pertencentes a clones de alto risco e clones esporádicos. Estas cepas apresentaram diferentes *scores* de virulência e para entender como o genoma acessório impacta a virulência, uma análise de correlação foi conduzida entre o pangenoma e o *score* de virulência, identificando subelementos associados positivamente e negativamente com a virulência. Dos subelementos que influenciaram positivamente a virulência identificamos alguns genes que já eram conhecidos por contribuir com a virulência, mas também identificamos genes que ainda não haviam sido associados com a virulência no modelo *C. elegans*. Nossos resultados ressaltam que o genoma acessório de *P. aeruginosa* pode conter novos marcadores de virulência ainda não descritos, e que mais estudos são necessários para compreender a contribuição destes genes. A análise de expressão gênica de genes que poderiam estar contribuindo para a infecção de *P. aeruginosa* em *C. elegans* não identificou diferenças significativas quando comparados os grupos de alta, média e baixa virulência. Este resultado por estar relacionado com os padrões de expressão destes genes durante a infecção, que podem variar e não termos escolhido o momento adequado para a extração de RNA;

3. Para esta análise os genomas de *K. pneumoniae* obtidas de banco de dados públicos, diversos genes foram relacionados com a característica de clones de alto risco *K. pneumoniae*. Muitos dos genes possuem características desconhecidas e foram anotados como proteínas hipotéticas. Os dados identificados podem auxiliar na investigação de novos fatores de virulência. Alguns dos genes associados com a característica de infecção de *K. pneumoniae* foram também encontrados entre os genes associados a clones de alto risco na análise de Pan-GWAS conduzida com genomas públicos;

4. A análise do pangenoma de cepas associadas com a infecção e colonização, demonstrou que possuem um *background* similar de genes de virulência e resistência. Não foi observada diferença estatística usando o *score* de virulência entre cepas de colonização e infecção demonstrando que os genes de virulência não são fatores que sozinhos explicam por que uma cepa pode levar a infecção e outra não. Para ir além dos fatores de virulência realizamos duas análises de Pan-GWAS diferentes. A primeira abordagem demonstrou que 25 genes foram associados com a característica de infecção, mas nenhum destes genes foram exclusivamente pertencentes ao grupo de infecção. Já a segunda abordagem demonstrou que 6 genes foram atribuídos a característica de infecção. Estas abordagens não apresentaram concordância entre os genes, demonstraram que nenhum dos genes associados à infecção estavam diretamente associados com a virulência e que elementos genéticos móveis e genes de resistência a antibióticos foram classes comuns entre as duas abordagens.

6 REFERÊNCIAS

1. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, et al.; WHO Pathogens Priority List Working Group. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. Lancet Infect Dis. 2018;18(3):318-27.

2. Mulani MS, Kamble EE, Kumkar SN, Tawre MS, Pardesi KR. Emerging strategies to combat ESKAPE pathogens in the era of antimicrobial resistance: a review. Front Microbiol. 2019;10:539.

3. Rice LB. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. J Infect Dis. 2008;197(8):1079-81.

4. Jackson RW, Vinatzer B, Arnold DL, Dorus S, Murillo J. The influence of the accessory genome on bacterial pathogen evolution. Mob Genet Elements. 2011;1(1):55-65.

5. Panayidou S, Georgiades K, Christofi T, Tamana S, Promponas VJ, Apidianakis Y. *Pseudomonas aeruginosa* core metabolism exerts a widespread growth-independent control on virulence. Sci Rep. 2020;10(1):9505.

6. Ho Sui SJ, Fedynak A, Hsiao WW, Langille MG, Brinkman FS. The association of virulence factors with genomic islands. PLoS One. 2009;4(12):e8094.

7. Horna G, Amaro C, Palacios A, Guerra H, Ruiz J. High frequency of the exoU+/exoS+ genotype associated with multidrug-resistant “high-risk clones” of *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Peruvian hospitals. Sci Rep. 2019;9(1):10874.

8. Allen JP, Ozer EA, Minasov G, Shuvalova L, Kiryukhina O, Satchell KJ, et al. A comparative genomics approach identifies contact-dependent growth inhibition as a virulence determinant. Proc Natl Acad Sci USA. 2020;117(12):6811–21. Erratum in: Proc Natl Acad Sci USA. 2020;117(20):11184.

9. Wyres KL, Lam MM, Holt KE. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. Nat Rev Microbiol. 2020;18(6):344–59.

10. Lam MM, Wick RR, Watts SC, Cerdeira LT, Wyres KL, Holt KE. A genomic surveillance framework and genotyping tool for *Klebsiella pneumoniae* and its related species complex. Nat Commun. 2021;12(1):4188.

11. Martínez JL, Baquero F. Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance. Clin Microbiol Rev. 2002;15(4):647-79.

12. Mulet X, Cabot G, Ocampo-Sosa AA, Domínguez MA, Zamorano L, Juan C, et al.; Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI). Biological markers of *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clones. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57(11):5527–35.

13. Del Barrio-Tofiño E, López-Causapé C, Oliver A. *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clones and their association with horizontally-acquired β-lactamases: 2020 update. Int J Antimicrob Agents. 2020;56(6):106196.

14. Treepong P, Kos VN, Guyeux C, Blanc DS, Bertrand X, Valot B, et al. Global emergence of the widespread *Pseudomonas aeruginosa* ST235 clone. Clin Microbiol Infect. 2018;24(3):258–66.

15. Andrey DO, Dantas PP, Martins WB, Carvalho FM, Almeida LG, Sands K, et al. An emerging clone, *Klebsiellapneumoniae* Carbapenemase 2-producing *K. pneumoniae* sequence type 16, associated with high mortality rates in a CC258-endemic setting. Clin Infect Dis. 2020;71(7):e141-50.

16. Migliorini LB, Sales RO, Koga PC, Doi AM, Poehlein A, Toniolo AR, et al. Prevalence of blaKPC-2, blaKPC-3 and blaKPC-30-carrying plasmids in *Klebsiella pneumoniae* isolated in a Brazilian hospital. Pathogens. 2021;10(3):332.

17. Fuursted K, Schøler L, Hansen F, Dam K, Bojer MS, Hammerum AM, et al. Virulence of a *Klebsiella pneumoniae* strain carrying the New Delhi metallo-beta-lactamase-1 (NDM-1). Microbes Infect. 2012;14(2):155-8.

18. Navas A, Cobas G, Talavera M, Ayala JA, López JA, Martínez JL. Experimental validation of Haldane's hypothesis on the role of infection as an evolutionary force for Metazoans. Proc Natl Acad Sci USA. 2007;104(34):13728-31.

19. O'Reilly LP, Benson JA, Cummings EE, Perlmutter DH, Silverman GA, Pak SC. Worming our way to novel drug discovery with the Caenorhabditis elegans proteostasis network, stress response and insulin-signaling pathways. Expert Opin Drug Discov. 2014;9(9):1021-32.

20. Liao C, Huang X, Wang Q, Yao D, Lu W. Virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* and antivirulence strategies to combat its drug resistance. Front Cell Infect Microbiol. 2022;12:926758.

21. Ozer EA, Allen JP, Hauser AR. Characterization of the core and accessory genomes of *Pseudomonas aeruginosa* using bioinformatic tools Spine and AGEnt. BMC Genomics. 2014;15(1):737.

22. Klockgether J, Cramer N, Wiehlmann L, Davenport CF, Tümmler B. *Pseudomonas aeruginosa* genomic structure and diversity. Front Microbiol. 2011;2:150.

23. Subedi D, Vijay AK, Kohli GS, Rice SA, Willcox M. Comparative genomics of clinical strains of Pseudomonas aeruginosa strains isolated from different geographic sites. Sci Rep. 2018;8(1):15668.

24. Ikeno T, Fukuda K, Ogawa M, Honda M, Tanabe T, Taniguchi H. Small and rough colony *pseudomonas aeruginosa* with elevated biofilm formation ability isolated in hospitalized patients. Microbiol Immunol. 2007;51(10):929-38.

25. Chatterjee M, Anju CP, Biswas L, Anil Kumar V, Gopi Mohan C, Biswas R. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and alternative therapeutic options. Int J Med Microbiol. 2016;306(1):48–58.

26. Allen P, Borick J, Borick J. Acute and chronic infection management in CF. In: Lewis MD, editor. Cystic fibrosis in primary care: an essential guide to a complex, multi-system disease. Cham: Springer International Publishing; 2020. p. 69–87.

27. Rissetto NG, Oliveira JW, Nisihara R. Main pathogens causing infections and antibiotic resistance profile in major burns in Brazil comparing two periods: 2015/2016 and 2019/2020. J Burn Care Res. 2024;45(1):145–50.

28. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Boletim Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 31. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2025. Avaliação dos indicadores nacionais de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) e resistência microbiana (RM). Anos 2012 a 2023; [Publicado em 28/08/2023 - atualizado em 06/08/2025]. Disponível em: https://www.gov.br/anvisa/pt-

br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/paineis-analiticos/boletins-das-notificacoes-de-iras-e-outros-eventos-adversos.

29. Tenover FC. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. Am J Med. 2006;119(6 Suppl 1):S3–10.

30. Langendonk RF, Neill DR, Fothergill JL. The building blocks of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: implications for current resistance-breaking therapies. Front Cell Infect Microbiol. 2021;11:665759.

31. Breidenstein EB, de la Fuente-Núñez C, Hancock RE. *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance. Trends Microbiol. 2011;19(8):419–26.

32. Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin TJ, Cheng Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. Biotechnol Adv. 2019;37(1):177–92.

33. Hancock RE. Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria. Clin Infect Dis. 1998;27(Suppl 1):S93–9.

34. Sun J, Deng Z, Yan A. Bacterial multidrug efflux pumps: mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. Biochem Biophys Res Commun. 2014;453(2):254–67. Erratum in: Biochem Biophys Res Commun. 2015;465(1):165.

35. El Zowalaty ME, Al Thani AA, Webster TJ, El Zowalaty AE, Schweizer HP, Nasrallah GK, et al. *Pseudomonas aeruginosa*: arsenal of resistance mechanisms, decades of changing resistance profiles, and future antimicrobial therapies. Future Microbiol. 2015;10(10):1683-706.

36. Mirsalehian A, Kalantar-Neyestanaki D, Nourijelyani K, Asadollahi K, Taherikalani M, Emaneini M, et al. Detection of AmpC-β-lactamases producing isolates among carbapenem resistant *P. aeruginosa* isolated from burn patient. Iran J Microbiol. 2014;6(5):306–10.

37. Lee JH, Kim NH, Jang KM, Jin H, Shin K, Jeong BC, et al. Prioritization of critical factors for surveillance of the dissemination of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: a systematic review. Int J Mol Sci. 2023;24(20):15209. Erratum in: Int J Mol Sci. 2025;26(9):4166.

38. Poole K. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to the max. Front Microbiol. 2011;2:65.

39. Karampatakis T, Antachopoulos C, Tsakris A, Roilides E. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in an endemic area: comparison with global data. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2018;37(7):1211–20.

40. Tenover FC, Nicolau DP, Gill CM. Carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* -an emerging challenge. Emerg Microbes Infect. 2022;11(1):811–4.

41. Escandón-Vargas K, Reyes S, Gutiérrez S, Villegas MV. The epidemiology of carbapenemases in Latin America and the Caribbean. Expert Rev Anti Infect Ther. 2017;15(3):277–97.

42. Zowawi HM, Balkhy HH, Walsh TR, Paterson DL. β-Lactamase production in key gram-negative pathogen isolates from the Arabian Peninsula. Clin Microbiol Rev. 2013;26(3):361-80.

43. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Antimicrobial Resistance & Patient Safety Portal. Atlanta: U.S. Department of Health and Human Services; 2025 [citado 2023 Nov 15]. Disponível em: https://arpsp.cdc.gov/profile/antibiotic-resistance/carbapenem-resistant-pseudomonas-aeruginosa.

44. Stanton RA, Campbell D, McAllister GA, Breaker E, Adamczyk M, Daniels JB, et al. Whole-genome sequencing reveals diversity of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* collected through CDC's emerging infections program, United States, 2016-2018. Antimicrob Agents Chemother. 2022;66(9):e0049622.

45. López-Causapé C, Cabot G, Del Barrio-Tofiño E, Oliver A. The versatile mutational resistome of *Pseudomonas aeruginosa*. Front Microbiol. 2018;9:685.

46. Sandoval-Motta S, Aldana M. Adaptive resistance to antibiotics in bacteria: a systems biology perspective. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med. 2016;8(3):253-67.

47. Barclay ML, Begg EJ, Chambers ST, Thornley PE, Pattemore PK, Grimwood K. Adaptive resistance to tobramycin in *Pseudomonas aeruginosa* lung infection in cystic fibrosis. J Antimicrob Chemother. 1996;37(6):1155–64.

48. Sindeldecker D, Stoodley P. The many antibiotic resistance and tolerance strategies of *Pseudomonas aeruginosa*. Biofilm. 2021;3:100056.

49. Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrener P, Hickey MJ, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. Nature. 2000;406(6799):959–64.

50. Rasko DA, Sperandio V. Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. Nat Rev Drug Discov. 2010;9(2):117–28.

51. Diggle SP, Whiteley M. Microbe profile: *Pseudomonas aeruginosa*: opportunistic pathogen and lab rat. Microbiology (Reading). 2020;166(1):30-3. Erratum in: Microbiology (Reading). 2021;167(8).

52. Hahn HP. The type-4 pilus is the major virulence-associated adhesin of *Pseudomonas aeruginosa* - a review. Gene. 1997;192(1):99–108.

53. Burrows LL. *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility: type IV pili in action. Annu Rev Microbiol. 2012;66(1):493–520.

54. Jurado-Martín I, Sainz-Mejías M, McClean S. *Pseudomonas aeruginosa*: an audacious pathogen with an adaptable arsenal of virulence factors. Int J Mol Sci. 2021;22(6):3128.

55. Campodónico VL, Llosa NJ, Grout M, Döring G, Maira-Litrán T, Pier GB. Evaluation of flagella and flagellin of *Pseudomonas aeruginosa* as vaccines. Infect Immun. 2010;78(2):746–55.

56. Pier GB. *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide: a major virulence factor, initiator of inflammation and target for effective immunity. Int J Med Microbiol. 2007;297(5):277–95.

57. Montor WR, Huang J, Hu Y, Hainsworth E, Lynch S, Kronish JW, et al. Genome-wide study of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein immunogenicity using self-assembling protein microarrays. Infect Immun. 2009;77(11):4877–86.

58. Remans K, Vercammen K, Bodilis J, Cornelis P. Genome-wide analysis and literature-based survey of lipoproteins in Pseudomonas aeruginosa. Microbiology (Reading). 2010;156(Pt 9):2597–607.

59. Huszczynski SM, Lam JS, Khursigara CM. The role of *Pseudomonas aeruginosa* Lipopolysaccharide in bacterial pathogenesis and physiology. Pathogens. 2019;9(1):6.

60. Qin S, Xiao W, Zhou C, Pu Q, Deng X, Lan L, et al. *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. Signal Transduct Target Ther. 2022;7(1):199.

61. Franklin M, Nivens D, Weadge J, Howell P. Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* Extracellular Polysaccharides, Alginate, Pel, and Psl. Front Microbiol. 2011;2:167.

62. Le Mauff F, Razvi E, Reichhardt C, Sivarajah P, Parsek MR, Howell PL, et al. The Pel polysaccharide is predominantly composed of a dimeric repeat of α-1,4 linked galactosamine and *N-acetylgalactosamine*. Commun Biol. 2022;5(1):502. Erratum in: Commun Biol. 2022;5(1):624.

63. Dauner M, Skerra A. Scavenging bacterial siderophores with engineered lipocalin proteins as an alternative antimicrobial strategy. Chembiochem. 2020;21(5):601–6.

64. Cornelis P, Dingemans J. *Pseudomonas aeruginosa* adapts its iron uptake strategies in function of the type of infections. Front Cell Infect Microbiol. 2013;3:75.

65. Bleves S, Viarre V, Salacha R, Michel GP, Filloux A, Voulhoux R. Protein secretion systems in *Pseudomonas aeruginosa*: a wealth of pathogenic weapons. Int J Med Microbiol. 2010;300(8):534-43.

66. Matsumoto T, Tateda K, Furuya N, Miyazaki S, Ohno A, Ishii Y, et al. Efficacies of alkaline protease, elastase and exotoxin A toxoid vaccines against gut-derived *Pseudomonas aeruginosa* sepsis in mice. J Med Microbiol. 1998;47(4):303-8.

67. Kessler E, Safrin M, Abrams WR, Rosenbloom J, Ohman DE. Inhibitors and specificity of *Pseudomonas aeruginosa* LasA. J Biol Chem. 1997;272(15):9884-9.

68. Llanos A, Achard P, Bousquet J, Lozano C, Zalacain M, Sable C, et al. Higher levels of *Pseudomonas aeruginosa* LasB elastase expression are associated with early-stage infection in cystic fibrosis patients. Sci Rep. 2023;13(1):14208.

69. Lee J, Zhang L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. Protein Cell. 2015;6(1):26–41.

70. Wade DS, Calfee MW, Rocha ER, Ling EA, Engstrom E, Coleman JP, et al. Regulation of Pseudomonas quinolone signal synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol. 2005;187(13):4372–80.

71. Chadha J, Harjai K, Chhibber S. Revisiting the virulence hallmarks of *Pseudomonas aeruginosa*: a chronicle through the perspective of quorum sensing. Environ Microbiol. 2022;24(6):2630-56.

72. Deep A, Chaudhary U, Gupta V. Quorum sensing and bacterial pathogenicity: from molecules to disease. J Lab Physicians. 2011;3(1):4–11.

73. Schuster M, Greenberg EP. A network of networks: quorum-sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. Int J Med Microbiol. 2006;296(2-3):73–81.

74. O'Donnell JN, Bidell MR, Lodise TP. Approach to the treatment of patients with serious multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infections. Pharmacotherapy. 2020;40(9):952–69.

75. Rezzoagli C, Archetti M, Mignot I, Baumgartner M, Kümmerli R. Combining antibiotics with antivirulence compounds can have synergistic effects and reverse selection for antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. PLoS Biol. 2020;18(8):e3000805.

76. Rollet C, Gal L, Guzzo J. Biofilm-detached cells, a transition from a sessile to a planktonic phenotype: a comparative study of adhesion and physiological characteristics in *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol Lett. 2009;290(2):135–42.

77. Thi MT, Wibowo D, Rehm BH. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Int J Mol Sci. 2020;21(22):8671.

78. Peirano G, Chen L, Kreiswirth BN, Pitout JD. Emerging antimicrobial-resistant high-risk *Klebsiella pneumoniae* clones ST307 and ST147. Antimicrob Agents Chemother. 2020;64(10):e01148-20.

79. Nageeb W, Amin DH, Mohammedsaleh ZM, Makharita RR. Novel molecular markers linked to *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clones. Antibiotics (Basel). 2021;10(1):35.

80. Correa A, Del Campo R, Perenguez M, Blanco VM, Rodríguez-Baños M, Perez F, et al. Dissemination of high-risk clones of extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Colombia. Antimicrob Agents Chemother. 2015;59(4):2421–5.

81. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. Clin Microbiol Infect. 2012;18(3):268–81.

82. DiGiandomenico A, Keller AE, Gao C, Rainey GJ, Warrener P, Camara MM, et al. A multifunctional bispecific antibody protects against *Pseudomonas aeruginosa*. Sci Transl Med. 2014;6(262):262ra155.

83. Kirienko DR, Kang D, Kirienko NV. Novel pyoverdine inhibitors mitigate *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. Front Microbiol. 2019;9:3317.

84. Arcari G, Carattoli A. Global spread and evolutionary convergence of multidrug-resistant and hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* high-risk clones. Pathog Glob Health. 2023;117(4):328–41.

85. Wyres KL, Holt KE. *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria. Curr Opin Microbiol. 2018;45:131–9.

86. Navon-Venezia S, Kondratyeva K, Carattoli A. Klebsiella pneumoniae: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. FEMS Microbiol Rev. 2017;41(3):252–75.

87. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, et al.; WHO Pathogens Priority List Working Group. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. Lancet Infect Dis. 2018;18(3):318–27.

88. Iredell J, Brown J, Tagg K. Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae: mechanisms and clinical implications. BMJ. 2016;352:h6420.

89. Li Y, Kumar S, Zhang L, Wu H. *Klebsiella pneumonia* and its antibiotic resistance: a bibliometric analysis. BioMed Res Int. 2022;2022(1):1668789.

90. Kot B, Piechota M, Szweda P, Mitrus J, Wicha J, Grużewska A, et al. Virulence analysis and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae* isolates from hospitalised patients in Poland. Sci Rep. 2023;13(1):4448.

91. Guo H, Wu Y, Li L, Wang J, Xu J, He F. Global emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* co-carrying multiple carbapenemases. Comput Struct Biotechnol J. 2023;21:3557–63.

92. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. Clin Microbiol Rev. 2007;20(3):440–58, table of contents.

93. Brandt C, Viehweger A, Singh A, Pletz MW, Wibberg D, Kalinowski J, et al. Assessing genetic diversity and similarity of 435 KPC-carrying plasmids. Sci Rep. 2019;9(1):11223.

94. Lee CR, Lee JH, Park KS, Kim YB, Jeong BC, Lee SH. Global dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods. Front Microbiol. 2016;7:895.

95. Davoudabadi S, Goudarzi M, Hashemi A. Detection of virulence factors and antibiotic resistance among *Klebsiella pneumoniae* isolates from Iran. BioMed Res Int. 2023;2023(1):3624497.

96. Riwu KH, Effendi MH, Rantam FA, Khairullah AR, Widodo A. A review: virulence factors of *Klebsiella pneumonia* as emerging infection on the food chain. Vet World. 2022;15(9):2172–9.

97. Remya PA, Shanthi M, Sekar U. Characterisation of virulence genes associated with pathogenicity in *Klebsiella pneumoniae*. Indian J Med Microbiol. 2019;37(2):210–8.

98. Paczosa MK, Mecsas J. Klebsiella pneumoniae: going on the offense with a strong defense. Microbiol Mol Biol Rev. 2016;80(3):629–61.

99. Bassetti M, Peghin M, Vena A, Giacobbe DR. Treatment of infections due to MDR gram-negative bacteria. Front Med (Lausanne). 2019;6:74.

100. David S, Reuter S, Harris SR, Glasner C, Feltwell T, Argimon S, et al.; EuSCAPE Working Group; ESGEM Study Group. Epidemic of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Europe is driven by nosocomial spread. Nat Microbiol. 2019;4(11):1919-29.

101. Kurz CL, Ewbank JJ. *Caenorhabditis elegans* for the study of host-pathogen interactions. Trends Microbiol. 2000;8(3):142–4.

102. Moy TI, Conery AL, Larkins-Ford J, Wu G, Mazitschek R, Casadei G, et al. High-throughput screen for novel antimicrobials using a whole animal infection model. ACS Chem Biol. 2009;4(7):527–33.

103. Lakshmanan U, Yap A, Fulwood J, Yichun L, Hoon SS, Lim J, et al. Establishment of a novel whole animal HTS technology platform for melioidosis drug discovery. Comb Chem High Throughput Screen. 2014;17(9):790–803.

104. O'Reilly LP, Benson JA, Cummings EE, Perlmutter DH, Silverman GA, Pak SC. Worming our way to novel drug discovery with the *Caenorhabditis elegans* proteostasis network, stress response and insulin-signaling pathways. Expert Opin Drug Discov. 2014;9(9):1021–32.

105. Sánchez-Diener I, Zamorano L, López-Causapé C, Cabot G, Mulet X, Peña C, et al. Interplay among resistance profiles, high-risk clones, and virulence in the *Caenorhabditis elegans Pseudomonas aeruginosa* infection model. Antimicrob Agents Chemother. 2017;61(12):e01586-17.

106. Vasquez-Rifo A, Veksler-Lublinsky I, Cheng Z, Ausubel FM, Ambros V. The *Pseudomonas aeruginosa* accessory genome elements influence virulence towards *Caenorhabditis elegans*. Genome Biol. 2019;20(1):270.

107. Aballay A, Ausubel FM. *Caenorhabditis elegans* as a host for the study of host-pathogen interactions. Curr Opin Microbiol. 2002;5(1):97–101.

108. Tan MW, Mahajan-Miklos S, Ausubel FM. Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Pseudomonas aeruginosa* used to model mammalian bacterial pathogenesis. Proc Natl Acad Sci USA. 1999;96(2):715–20.

109. Darby C, Cosma CL, Thomas JH, Manoil C. Lethal paralysis of *Caenorhabditis elegans* by *Pseudomonas aeruginosa*. Proc Natl Acad Sci USA. 1999;96(26):15202–7.

110. Gallagher LA, Manoil C. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 kills *Caenorhabditis elegans* by cyanide poisoning. J Bacteriol. 2001;183(21):6207–14.

111. Lewenza S, Charron-Mazenod L, Giroux L, Zamponi AD. Feeding behaviour of *Caenorhabditis elegans* is an indicator of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 virulence. PeerJ. 2014;2:e521.

112. Dzvova N, Colmer-Hamood JA, Griswold JA, Hamood AN. Isolation and characterization of HepP: a virulence-related *Pseudomonas aeruginosa* heparinase. BMC Microbiol. 2017;17(1):233.

113. Lee DG, Urbach JM, Wu G, Liberati NT, Feinbaum RL, Miyata S, et al. Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. Genome Biol. 2006;7(10):R90.

114. Mahajan-Miklos S, Tan MW, Rahme LG, Ausubel FM. Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa*-*Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. Cell. 1999;96(1):47–56.

115. Grundmann H, Schneider C, Hartung D, Daschner FD, Pitt TL. Discriminatory power of three DNA-based typing techniques for *Pseudomonas aeruginosa*. J Clin Microbiol. 1995;33(3):528–34.

116. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol. 1995;33(9):2233–9.

117. Pitout JD, Chow BL, Gregson DB, Laupland KB, Elsayed S, Church DL. Molecular epidemiology of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the Calgary Health Region: emergence of VIM-2-producing isolates. J Clin Microbiol. 2007;45(2):294–8.

118. Diorio-Toth L, Irum S, Potter RF, Wallace MA, Arslan M, Munir T, et al. Genomic surveillance of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates reveals an additive effect of carbapenemase production on carbapenem resistance. Microbiol Spectr. 2022;10(3):e0076622.

119. Wang J, Feng Y, Zong Z. The origins of ST11 KL64 Klebsiella pneumoniae: a genome-based study. Microbiol Spectr. 2023;11(2):e0416522.

120. Jolley KA, Bray JE, Maiden MC. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. Wellcome Open Res. 2018;3:124.

121. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. Bioinformatics. 2014;30(14):2068-9.

122. Hyatt D, Chen GL, Locascio PF, Land ML, Larimer FW, Hauser LJ. Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. BMC Bioinformatics. 2010;11(1):119.

123. Lagesen K, Hallin P, Rødland EA, Staerfeldt HH, Rognes T, Ussery DW. RNAmmer: consistent and rapid annotation of ribosomal RNA genes. Nucleic Acids Res. 2007;35(9):3100–8.

124. Laslett D, Canback B. ARAGORN, a program to detect tRNA genes and tmRNA genes in nucleotide sequences. Nucleic Acids Res. 2004;32(1):11–6.

125. van Belkum A, Soriaga LB, LaFave MC, Akella S, Veyrieras JB, Barbu EM, et al. Phylogenetic distribution of CRISPR-Cas systems in antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. MBio. 2015;6(6):e01796–15.

126. Page AJ, Cummins CA, Hunt M, Wong VK, Reuter S, Holden MT, et al. Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. Bioinformatics. 2015;31(22):3691-3.

127. Brynildsrud O, Bohlin J, Scheffer L, Eldholm V. Rapid scoring of genes in microbial pan-genome-wide association studies with scoary. Genome Biol. 2016;17(1):238. Erratum in: Genome Biol. 2016;17(1):262.

128. Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. J Mol Biol. 1961;3(2):208-218.

129. van Mansfeld R, Willems R, Brimicombe R, Heijerman H, van Berkhout FT, Wolfs T, et al. *Pseudomonas aeruginosa* genotype prevalence in Dutch cystic fibrosis patients and age dependency of colonization by various *P. aeruginosa* sequence types. J Clin Microbiol. 2009;47(12):4096–101. Erratum in: J Clin Microbiol. 2013;51(1):386.

130. Letunic I, Bork P. Interactive Tree of Life (iTOL) v6: recent updates to the phylogenetic tree display and annotation tool. Nucleic Acids Res. 2024;52 W1:W78–82.

131. Zhou CE, Smith J, Lam M, Zemla A, Dyer MD, Slezak T. MvirDB—a microbial database of protein toxins, virulence factors and antibiotic resistance genes for bio-defence applications. Nucleic Acids Res. 2007;35(Database issue):D391–4.

132. Liu B, Zheng D, Zhou S, Chen L, Yang J. VFDB 2022: a general classification scheme for bacterial virulence factors. Nucleic Acids Res. 2022;50 D1:D912–7.

133. Weiser R, Green AE, Bull MJ, Cunningham-Oakes E, Jolley KA, Maiden MC, et al. Not all *Pseudomonas aeruginosa* are equal: strains from industrial sources possess uniquely large multireplicon genomes. Microb Genom. 2019;5(7):e000276.

134. Kiyaga S, Kyany'a C, Muraya AW, Smith HJ, Mills EG, Kibet C, et al. Genetic diversity, distribution, and genomic characterization of antibiotic resistance and virulence of clinical *Pseudomonas aeruginosa* strains in Kenya. Front Microbiol. 2022;13:835403.

135. Stiernagle T. Maintenance of *C. elegans*. In: WormBook: the online review of *C. elegans* biology. The *C. elegans* Research Community, editor. Pasadena (CA): WormBook; 2006. p. 2005-18.

136. Powell JR, Ausubel FM. Models of *Caenorhabditis elegans* infection by bacterial and fungal pathogens. Methods Mol Biol. 2008;415:403–27.

137. Wareham DW, Papakonstantinopoulou A, Curtis MA. The *Pseudomonas aeruginosa* PA14 type III secretion system is expressed but not essential to virulence in the *Caenorhabditis elegans-P. aeruginosa* pathogenicity model. FEMS Microbiol Lett. 2005;242(2):209–16.

138. Green MR, Sambrook J. Total RNA extraction from Caenorhabditis elegans. Cold Spring Harb Protoc. 2020;2020(9):101683.

139. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods. 2001;25(4):402–8.

140. O'Toole GA. Microtiter dish biofilm formation assay. J Vis Exp. 2011;(47):2437.

141. Chimi LY, Noubom M, Bisso BN, Singor Njateng GS, Dzoyem JP. Biofilm formation, pyocyanin production, and antibiotic resistance profile of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from wounds. Int J Microbiol. 2024;2024(1):1207536.

142. Kırmusaoğlu S, Kaşıkçı H. Identification of ica-dependent biofilm production by Staphylococcus aureus clinical isolates and antibiofilm effects of ascorbic acid against biofilm production. J Clin Pathol. 2020;73(5):261–6.

143. Sales RO, Leaden L, Migliorini LB, Severino P. A comprehensive genomic analysis of the emergent *Klebsiella pneumoniae* ST16 lineage: virulence, antimicrobial resistance and a comparison with the clinically relevant ST11 strain. Pathogens. 2022;11(12):1394.

144. Migliorini LB, Leaden L, Sales RO, Correa NP, Marins MM, Koga PC, et al. The gastrointestinal load of carbapenem-resistant enterobacteriacea is associated with the transition from colonization to infection by *Klebsiella pneumoniae* isolates harboring the bla_{KPC} gene. Front Cell Infect Microbiol. 2022;12:928578.

145. Silva M, Machado MP, Silva DN, Rossi M, Moran-Gilad J, Santos S, et al. chewBBACA: a complete suite for gene-by-gene schema creation and strain identification. Microb Genom. 2018;4(3):e000166.

146. Miro E, Rossen JW, Chlebowicz MA, Harmsen D, Brisse S, Passet V, et al. Core/whole genome multilocus sequence typing and core genome SNP-based typing of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from Spain. Front Microbiol. 2020;10:2961.

147. Kluytmans-van den Bergh MF, Rossen JW, Bruijning-Verhagen PC, Bonten MJ, Friedrich AW, Vandenbroucke-Grauls CM, et al. Whole-genome multilocus sequence typing of extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol. 2016;54(12):2919-27.

148. Brüggemann H, Migliorini LB, Sales RO, Koga PC, Souza AV, Jensen A, et al. Comparative genomics of nonoutbreak *Pseudomonas aeruginosa* strains underlines genome plasticity and geographic relatedness of the global clone ST235. Genome Biol Evol. 2018;10(7):1852–7.

149. Wang B, Lin YC, Vasquez-Rifo A, Jo J, Price-Whelan A, McDonald ST, et al. *Pseudomonas aeruginosa* PA14 produces R-bodies, extendable protein polymers with roles in host colonization and virulence. Nat Commun. 2021;12(1):4613.

150. Grace A, Sahu R, Owen DR, Dennis VA. *Pseudomonas aeruginosa* reference strains PAO1 and PA14: a genomic, phenotypic, and therapeutic review. Front Microbiol. 2022;13:1023523.

151. Scott E, Holden-Dye L, O'Connor V, Wand ME. Intra strain variation of the effects of gram-negative ESKAPE pathogens on intestinal colonization, host viability, and host response in the model organism Caenorhabditis elegans. Front Microbiol. 2020;10:3113.

152. van Tilburg Bernardes E, Charron-Mazenod L, Reading DJ, Reckseidler-Zenteno SL, Lewenza S. Exopolysaccharide-repressing small molecules with antibiofilm and antivirulence activity against *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 2017;61(5):e01997-16.

153. Bartell JA, Blazier AS, Yen P, Thøgersen JC, Jelsbak L, Goldberg JB, et al. Reconstruction of the metabolic network of *Pseudomonas aeruginosa* to interrogate virulence factor synthesis. Nat Commun. 2017;8(1):14631.

154. Faure LM, Garvis S, de Bentzmann S, Bigot S. Characterization of a novel two-partner secretion system implicated in the virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology (Reading). 2014;160(Pt 9):1940–52.

155. Marogi JG, Murphy CT, Myhrvold C, Gitai Z. *Pseudomonas aeruginosa* modulates both Caenorhabditis elegans attraction and pathogenesis by regulating nitrogen assimilation. Nat Commun. 2024;15(1):7927.

156. Abeyrathne PD, Daniels C, Poon KK, Matewish MJ, Lam JS. Functional characterization of WaaL, a ligase associated with linking O-antigen polysaccharide to the core of *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide. J Bacteriol. 2005;187(9):3002–12.

157. Holt KE, Wertheim H, Zadoks RN, Baker S, Whitehouse CA, Dance D, et al. Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. Proc Natl Acad Sci USA. 2015;112(27):E3574–81.

158. Vornhagen J, Roberts EK, Unverdorben L, Mason S, Patel A, Crawford R, et al. Combined comparative genomics and clinical modeling reveals plasmid-encoded genes are independently associated with Klebsiella infection. Nat Commun. 2022;13(1):4459.

159. Blanc DS, Magalhães B, Koenig I, Senn L, Grandbastien B. Comparison of whole genome (wg-) and core genome (cg-) MLST (BioNumericsTM) versus SNP variant calling for epidemiological investigation of *Pseudomonas aeruginosa*. Front Microbiol. 2020;11:1729.

160. Curran B, Jonas D, Grundmann H, Pitt T, Dowson CG. Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. J Clin Microbiol. 2004;42(12):5644–9.

161. Pirnay JP, Bilocq F, Pot B, Cornelis P, Zizi M, Van Eldere J, et al. *Pseudomonas aeruginosa* population structure revisited. PLoS One. 2009;4(11):e7740.

162. Flores-Vega VR, Partida-Sanchez S, Ares MA, Ortiz-Navarrete V, Rosales-Reyes R. High-risk *Pseudomonas aeruginosa* clones harboring β-lactamases: 2024 update. Heliyon. 2024;11(1):e41540.

163. Zurita J, Sevillano G, Solís MB, Paz Y Miño A, Alves BR, Changuan J, et al. *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clones and their association with multidrug-resistant. J Glob Antimicrob Resist. 2024;38:332–8.

164. Oliver A, Mulet X, López-Causapé C, Juan C. The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. Drug Resist Updat. 2015;21:41-59.

165. Mues N, Chu HW. Out-smarting the host: bacteria maneuvering the immune response to favor their survival. Front Immunol. 2020;11:819.

166. DeBritto S, Gajbar TD, Satapute P, Sundaram L, Lakshmikantha RY, Jogaiah S, et al. Isolation and characterization of nutrient dependent pyocyanin from *Pseudomonas aeruginosa* and its dye and agrochemical properties. Sci Rep. 2020;10(1):1542.

167. Bradbury RS, Roddam LF, Merritt A, Reid DW, Champion AC. Virulence gene distribution in clinical, nosocomial and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. J Med Microbiol. 2010;59(Pt 8):881–90.

168. Veetilvalappil VV, Manuel A, Aranjani JM, Tawale R, Koteshwara A. Pathogenic arsenal of *Pseudomonas aeruginosa*: an update on virulence factors. Future Microbiol. 2022;17(6):465–81.

169. Gellatly SL, Hancock RE. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. Pathog Dis. 2013;67(3):159–73.

170. Thi MT, Wibowo D, Rehm BH. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. Int J Mol Sci. 2020;21(22):8671.

171. Partridge SR, Kwong SM, Firth N, Jensen SO. Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. Clin Microbiol Rev. 2018;31(4):e00088-17.

172. Rickard H, Cloutman-Green E, Ciric L. A microbiological survey approach to understanding the virulence factors of Pseudomonas species in healthcare sinks. J Hosp Infect. 2024;151:84–91.

173. Aroca Molina KJ, Gutiérrez SJ, Benítez-Campo N, Correa A. Genomic differences associated with resistance and virulence in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from clinical and environmental sites. Microorganisms. 2024;12(6):1116.

174. Javanmardi F, Emami A, Pirbonyeh N, Keshavarzi A, Rajaee M. A systematic review and meta-analysis on exo-toxins prevalence in hospital acquired *Pseudomonas aeruginosa* isolates. Infect Genet Evol. 2019;75:104037.

175. Bardoel BW, van Kessel KP, van Strijp JA, Milder FJ. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* virulence: characterization of the AprA-AprI interface and species selectivity. J Mol Biol. 2012;415(3):573–83.

176. Tan MW, Rahme LG, Sternberg JA, Tompkins RG, Ausubel FM. Pseudomonas aeruginosa killing of Caenorhabditis elegans used to identify *P. aeruginosa* virulence factors. Proc Natl Acad Sci USA. 1999;96(5):2408–13.

177. Kang D, Revtovich AV, Chen Q, Shah KN, Cannon CL, Kirienko NV. Pyoverdine-dependent virulence of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. Front Microbiol. 2019;10:2048.

178. Meyer JM, Neely A, Stintzi A, Georges C, Holder IA. Pyoverdin is essential for virulence of Pseudomonas aeruginosa. Infect Immun. 1996;64(2):518–23.

179. Kirienko NV, Kirienko DR, Larkins-Ford J, Wählby C, Ruvkun G, Ausubel FM. *Pseudomonas aeruginosa* disrupts Caenorhabditis elegans iron homeostasis, causing a hypoxic response and death. Cell Host Microbe. 2013;13(4):406–16.

180. Maldonado RF, Sá-Correia I, Valvano MA. Lipopolysaccharide modification in Gram-negative bacteria during chronic infection. FEMS Microbiol Rev. 2016;40(4):480–93.

181. Feldman M, Bryan R, Rajan S, Scheffler L, Brunnert S, Tang H, et al. Role of flagella in pathogenesis of Pseudomonas aeruginosa pulmonary infection. Infect Immun. 1998;66(1):43–51.

182. Kondakova T, D'Heygère F, Feuilloley MJ, Orange N, Heipieper HJ, Duclairoir Poc C. Glycerophospholipid synthesis and functions in Pseudomonas. Chem Phys Lipids. 2015;190:27–42.

183. Fernández L, Breidenstein EB, Song D, Hancock RE. Role of intracellular proteases in the antibiotic resistance, motility, and biofilm formation of Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother. 2012;56(2):1128–32.

184. Zheng J, Wu Y, Lin Z, Wang G, Jiang S, Sun X, et al. ClpP participates in stress tolerance, biofilm formation, antimicrobial tolerance, and virulence of Enterococcus faecalis. BMC Microbiol. 2020;20(1):30.

185. Derakhshan S, Najar Peerayeh S, Bakhshi B. Association between presence of virulence genes and antibiotic resistance in clinical Klebsiella Pneumoniae Isolates. Lab Med. 2016;47(4):306–11.

186. Letizia M, Diggle SP, Whiteley M. *Pseudomonas aeruginosa*: ecology, evolution, pathogenesis and antimicrobial susceptibility. Nat Rev Microbiol. 2025; 23:701-17.

Abstract

Introduction: *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* are the main pathogens responsible for healthcare-associated infections. The population structure of these pathogens includes clones that exhibit multidrug-resistant phenotypes and are frequently associated with outbreaks in various geographic regions, known as high-risk clones. **Purpose:** To evaluate the core and accessory genomes of high-risk clones of *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae*, aiming to identify characteristics potentially related to virulence and persistence of these clones in hospital environments, as well as features that facilitate the colonization/infection transition. **Methods:** We analyzed 84 strains of *P. aeruginosa*, including clinical isolates and publicly available genomes, using whole-genome sequencing, phylogenetic analysis, and resistome and virulome profiling. Virulence was investigated through slow-killing assays using *C. elegans* CF1903, and virulence-associated genomic elements were identified using pan-Genome Wide Association Studies. *K. pneumoniae* strains derived from colonization and infection sources were used in an association study to identify genes potentially linked to infection characteristics. **Results:** Interactions between *P. aeruginosa* and *C. elegans* were evaluated in a set of 39 *P. aeruginosa* strains, representing 46.42% of the sequenced strains, which showed varying degrees of virulence with scores ranging from 4 to undefined, with 4 representing the highest level of virulence. Accessory genome association analysis identified known genes that influenced the outcome of *P. aeruginosa* strains against *C. elegans* (*pvdE*, *fpvA*, *pvdD*, *pvdI*, and *pvdJ*), and new genes were associated with virulence, such as *cdsA*, *clpP*, *wecA*, and *gnu*. In *K. pneumoniae*, pan-Genome Wide Association Studies identified between 6 and 25 genes potentially linked to infectious capability, depending on the method used. **Conclusions:** The findings highlight the importance of combining genomic surveillance with functional assays to understand the interplay between resistance and virulence, potentially guiding new therapeutic and infection control strategies.

Keywords: *Caenorhabditis elegans*; Cross infection; Virulence factors; Genome, bacterial; Genes, MDR

Apêndice

Apêndice 1. Listas dos *primers*/genes usados na análise de RT-qPCR para a avaliação da expressão de genes de *P. aeruginosa* durante a infecção do *C. elegans*

Primers	Sequência	ID_Gene_PA14	Produto	Grupo	Funcionou na RT-qPCR
acCoa66-F	GCTTCTACTTCCAGCGCATC	PA14_06600	acil-CoA desidrogenase	Metabolismo	Sim
acCoa66-R	AATCTTCCTCGGCCATCTCC				
ACcoa96-F	TGAAGAGCGATCATCAGGGG	PA14_09660	acyl-CoA sintetase	Metabolismo	Sim
ACcoa96-R	GGTACGCGGAATCTTGAACG				
aCoA-F	ATCAGCATCCACAACATGGC	PA14_54630	acil-CoA desidrogenase	Metabolismo	Sim
aCoA-R	CTCGGTCAGGCAATAGGAGG				
acy3420-F	GAATCTCCGCTTTCGTCGTC	PA14_43420	acil-CoA desidrogenase	Metabolismo	Sim
acy3420-R	TCGTCGAAGATCACGTCACA				
acyCoa58-F	CCCTCGAACTGATGTGCAAG	PA14_31580	acil-CoA desidrogenase	Metabolismo	Sim
acyCoa58-R	ATGTTGATCTCCATCCGCGA				
aroB-F	GGGGTCAACTTCATCCAGGT	PA14_66600	3-desidroquinato sintase	Metabolismo	Sim
aroB-R	TGGTAGAACGCACCGATCAT				
dspI-F	ACAAGCTCACCGTGGAAAAG	PA14_54640	DspI	Virulência	Sim
dspI-R	GGTTGAGGTGCTCGATCAGT				
enCoA-F	TCTTCCTGACCCACTTCGAC	PA14_28310	enoil-CoA hidratase	Metabolismo	Sim
enCoA-R	CTTTCGCTTTCCAGCAGCAG				
exoU-F	ATCGCTGAAAAAGGGCTTGG	PA14_51530	exoU_spcU (cluster de gene)	Virulência	Não
exoU-R	CAATAGGCGTTCTAGGGGCT				
flav-F	TCCCTGATCCTCATGCACAC	PA14_22540	Flavodoxina	Metabolismo	Não
flav-R	GCCGAGGTTGTTGATATCCG				
glusy28-F	ACTGGAGTTCTACCTGCTCG	PA14_72850	Glutamina sintetase	Metabolismo	Não
glusy28-R	AGCTCGTAGACGCCATAGAC				

continua...

...continuação

glusy67-F	GGAATTCTTCGTCTTCGCCC	PA14_20670	Glutamina sintetase	Metabolismo	Sim
glusy67-R	GTTGTTGGAAGACACGCTGA				
glusy-F	TCAAGGAACATCCCGAGGTC	PA14_03860	Glutamina sintetase	Metabolismo	Sim
glusy-R	CAGACTGTTGCGTTCGATCC				
gtdA-F	CAAGGATCTGTTCGTCGTGC	PA14_32690	Gentisato 1,2-dioxigenase	Metabolismo	Não
gtdA-R	ACGGTCGGAGAAACTGAACA				
hp0690-F	TGTTGAACCTCACAGGCAGA	PA14_30690	Proteína hipotética	Metabolismo	Sim
hp0690-R	CAATGCCGCTCCTTTACTGG				
hp4660-F	CCTGAAACTGGTGAACTCGC	PA14_04660	Proteína hipotética	Sem informação	Não
hp4660-R	TCAGGTTGATCACCGAACGA				
hp4710-F	GTGGTCAACCTGCTGTTCTG	PA14_04710	Proteína hipotética	Sem informação	Sim
hp4710-R	GTAGTTGATGCGCTGGGATG				
hp8370-F	TCGATTCGGAACAAGGCATC	PA14_38370	Proteína hipotética	Sem informação	Não
hp8370-R	TCGATGTAGAGCACCGACAG				
ilvB-F	TCAATCTGAACAACGGTGCG	PA14_62160	Subunidade catalítica da acetolactato sintase 3	Metabolismo	Não
ilvB-R	GTAGGAATGCGAATAGCGGC				
ilvD-F	CACGACGGCATGCTCTATTC	PA14_04630	di-hidroxiácido desidratase	Metabolismo	Sim
ilvD-R	GGTGATCTTGTCGCAGTTGG				
leuB-F	GATGAGGCTTCCATGCTGAC	PA14_23790	3-isopropilmalato desidrogenase	Metabolismo	Sim
leuB-R	GGTTCGTACATGCCCTTGTT				
leuC-F	CGACAAACTCTGGGACATGC	PA14_23750	Subunidade grande da isopropilmalato isomerase	Metabolismo	Não
leuC-R	CACTTCGTGCAGGATATGGC				
LysR1-F	GAGTGGACTCCCTGATCACC	PA14_22550	Regulador transcricional da família LysR	Sem informação	Sim
LysR1-R	GATCCGGTCCGAACTACTCA				
phzS-F	AAGACGTGTTGCCGTTCTTC	PA14_09400	Proteína hipotética	Virulência	Sim
phzS-R	TCGGGTACTGCAGGATCAAC				
pmeI-F	TACGTGAACTTCTCCCAGCC	PA14_38395	Lipoproteína de efluxo multidrogas periplásmica	Metabolismo	Não
pmeI-R	ACACCCTTCACCTGGCCTTC				

continua...

...continuação

rhlI-F	TCTCTGAATCGCTGGAAGGG	PA14_19130	Proteína de síntese autoindutora RhlI	Virulência	Sim
rhlI-R	CTCGATGAAGACTTGATGCCG				
rhlR-F	TCCATGGCACCTATCCCAAG	PA14_19120	Regulador transcricional RhlR	Virulência	Sim
rhlR-R	AGACCACCATTTCCGAGGAG				
srrh-F	CTGACAAGGTCGTTGCTGTC	PA14_30700	Híbrido sensor/regulador de resposta	Metabolismo	Sim
srrh-R	TCATACGACCATCGAGCAGG				
tr8380-F	GGTCTACGGCCACTACAAGA	PA14_38380	Regulador transcricional	Metabolismo	Sim
tr8380-R	CACCCTGGCGTTTTCATCG				
trans-F	AGCGCCTTCATCGAGTCATT	PA14_51540	Transposase	Metabolismo	Não
trans-R	CTCGTTGTAATCCCGCCAAG				
TrkH-F	CCCGGCACATGTATTTCCTG	PA14_40470	Proteína de captação de potássio da família TrkH	Metabolismo	Não
TrkH-R	GAAGAACGCATCGGTGTAGC				
tsi6-F	CGGGAAAGAGTTCGAGGAGA	PA14_01120	Tsi6	Metabolismo	Não
tsi6-R	GTATGCCGACGTAGAATGCG				
isosy2-F	CCATGCAGGAAAACCAGGAC	PA14_48570	2-isopropilmalato sintase	Metabolismo	Sim
isosy2-R	TCTCGAAAGGCGTGAGGAAC				
PA14_16250_F	GACCGAGAATGACAAAGTGGA	PA14_16250	Elastase LasB	Virulência	Sim
PA14_16250_R	ATCAGGTAGGAGACGTTGTAGA				
PA14_20600_F	GGGCTTCATCGGTGACTATT	PA14_20600	Proteína hipotética	Sem informação	Não
PA14_20600_R	TCGATGTAGATCCGCTGGTA				
PA14_22530_F	TACATCCTGGGTGACGAGTT	PA14_22530	Glutationa S-transferase	Metabolismo	Não
PA14_22530_R	TCCATCAATGCTGGGAATGG				
PA14_40290_F	CGTCTATGCCAGCAACATCA	PA14_40290	Protease LasA	Virulência	Não
PA14_40290_R	CGTTGTAGAGCAGCGAGAAA				

Apêndice 2. Característica dos isolados de *P. aeruginosa* avaliados neste estudo

Cepas	Data de isolamento	*C. elegans* (CF1903)	Fonte	PFGE perfil	Cluster	PARC	Fenótipo de resistência	Tipo de sequência (ST)	Classificação do clone	WGS
HIAE_PA01	05/08/2011	Sim	H	Não aplicado	Não aplicado	0	MDR	455	Não	Sim
HIAE_PA02	09/08/2012	Sim	H	Não aplicado	Não aplicado	0	MDR	381	Não	Sim
HIAE_PA05	19/08/2013	Sim	H	Não aplicado	Não aplicado	1	MDR	498	Não	Sim
HIAE_PA06	11/01/2014	Sim	H	Não aplicado	Não aplicado	0	MDR	231	Não	Sim
HIAE_PA07	29/09/2015	Sim	H	Não aplicado	Não aplicado	0	MDR	252	Não	Sim
HIAE_PA08	03/10/2015	Sim	LB	Não aplicado	Não aplicado	0	MDR	Novo	Não	Sim
HIAE_PA09	09/10/2015	Sim	H	Não aplicado	Não aplicado	0	Non-MDR	245	Não	Sim
HIAE_PA10	13/10/2015	Sim	LB	Não aplicado	Não aplicado	0	MDR	2235	Não	Sim
HIAE_PA11	25/10/2015	Sim	LB	Não aplicado	Não aplicado	1	MDR	244	Sim	Sim
HIAE_PA12	26/10/2015	Sim	H	Não aplicado	Não aplicado	0	Non-MDR	10	Não	Sim
HIAE_PA13	28/10/2015	Sim	H	Não aplicado	Não aplicado	0	Non-MDR	244	Sim	Sim
HIAE_PA14	10/11/2015	Sim	LB	Não aplicado	Não aplicado	0	Non-MDR	1290	Não	Sim
HIAE_PA15	03/01/2016	Sim	H	Não aplicado	Não aplicado	0	Non-MDR	1993	Não	Sim
PA101	14/04/2020	Sim	H	39	21	0	Non-MDR	298	Sim	Sim
PA103	28/04/2020	Sim	H	37	19	1	XDR	Novo	Não	Sim
PA105	05/12/2020	Sim	H	6	4	0	Non-MDR	357	Sim	Sim
PA107	20/12/2020	Sim	H	37A	19	0	Non-MDR	782	Não	Sim
PA108	23/12/2020	Sim	H	20	9	1	PDR	233	Sim	Sim
PA109	24/12/2020	Não	H	20	9	1	PDR	233	Sim	Sim
PA110	23/12/2020	Não	H	20A	9	1	PDR	Novo	Não	Sim
PA111	23/01/2021	Não	H	14	-	1	Non-MDR	277	Sim	Sim
PA113	23/02/2021	Sim	H	1	1	0	Non-MDR	Novo	Não	Sim
PA117	09/03/2020	Sim	H	42	23	1	MDR	Novo	Não	Sim
PA118	09/03/2020	Não	H	42	23	1	MDR	564	Não	Sim
PA120	19/03/2020	Sim	H	17	7	1	PDR	235	Sim	Sim
PA122	21/04/2020	Não	H	17A	7	1	XDR	235	Sim	Sim
PA123	07/08/2018	Sim	H	17B	7	1	Non-MDR	Novo	Não	Sim

continua...

...continuação

PA126	20/10/2018	Não	H	46	-	1	MDR	4773	Não	Sim
PA130	31/01/2019	Sim	H	28	15	1	XDR	Novo	Não	Sim
PA135	24/08/2018	Sim	H	29	-	0	Non-MDR	Novo	Não	Sim
PA136	05/10/2018	Não	H	44	-	1	XDR	Novo	Não	Sim
PA137	02/01/2019	Sim	H	39A	21	0	Non-MDR	532	Não	Sim
PA140	03/12/2020	Sim	H	8	5	0	Non-MDR	3302	Não	Sim
PA142	06/12/2020	Não	H	19	8	1	PDR	233	Sim	Sim
PA144	25/12/2020	Não	H	19A	8	1	PDR	Novo	Não	Sim
PA146	07/01/2021	Sim	H	15	6	1	XDR	235	Sim	Sim
PA148	19/02/2021	Não	H	35	-	1	PDR	Novo	Não	Sim
PA149	19/02/2021	Não	H	36	-	1	PDR	233	Sim	Sim
PA151	23/02/2021	Não	H	1A	1	0	Non-MDR	1966	Não	Sim
PA152	18/09/2020	Sim	H	2	2	1	MDR	Novo	Não	Sim
PA153	22/09/2020	Não	H	3	-	0	Non-MDR	309	Não	Sim
PA154	03/10/2020	Não	H	18	8	1	PDR	233	Sim	Sim
PA155	01/10/2020	Não	H	18	8	1	PDR	233	Sim	Sim
PA159	29/05/2021	Não	H	41	-	0	Non-MDR	Novo	Não	Sim
PA160	06/06/2021	Sim	H	10	-	0	MDR	Novo	Não	Sim
PA162	16/06/2021	Não	H	38	20	1	Non-MDR	3535	Não	Sim
PA163	21/06/2021	Não	H	2B	2	0	Non-MDR	2414	Não	Sim
PA164	15/06/2021	Não	H	38A	20	0	Non-MDR	Novo	Não	Sim
PA165	24/06/2021	Não	H	27	-	0	Non-MDR	309	Não	Sim
PA166	22/06/2021	Sim	H	21B	10	0	Non-MDR	308	Sim	Sim
PA168	11/07/2021	Sim	H	7	-	1	MDR	Novo	Não	Sim
PA175	23/07/2021	Não	H	38D	20	1	MDR	3535	Não	Sim
PA176	22/07/2021	Não	H	1B	1	0	Non-MDR	557	Não	Sim
PA179	30/08/2021	Não	H	17C	7	1	MDR	2645	Não	Sim
PA180	02/09/2021	Não	H	25A	13	1	MDR	4229	Não	Sim
PA181	13/09/2021	Sim	H	17D	7	1	MDR	235	Sim	Sim

continua...

...continuação

PA182	13/09/2021	Não	H	26A	14	1	MDR	NT	Não	Sim
PA183	13/09/2021	Não	H	22	-	1	MDR	Novo	Não	Sim
PA185	23/09/2021	Não	H	43	-	1	MDR	Novo	Não	Sim
PA186	29/09/2021	Não	H	21	10	1	MDR	Novo	Não	Sim
PA188	16/10/2021	Não	H	33	18	1	MDR	4228	Não	Sim
PA189	19/10/2021	Não	H	5	3	1	MDR	1122	Não	Sim
PA190	20/10/2021	Não	H	30	-	1	MDR	234	Não	Sim
PA191	21/10/2021	Não	H	40	22	1	MDR	319	Não	Sim
PA192	29/10/2021	Não	H	33A	18	1	MDR	4228	Não	Sim
PA193	29/10/2021	Sim	H	23	11	1	MDR	235	Sim	Sim
PA195	30/10/2021	Não	H	32	17	1	MDR	4228	Não	Sim
PA196	30/10/2021	Não	H	32	17	1	MDR	4228	Não	Sim
PA198	27/11/2021	Não	H	9	-	1	MDR	Novo	Não	Sim
PA199	30/11/2021	Não	H	45	-	1	MDR	480	Não	Sim
PA200	04/12/2021	Sim	H	23B	11	1	MDR	235	Sim	Sim
PA201	05/12/2021	Não	H	32A	17	1	MDR	179	Não	Sim
PA202	05/12/2021	Não	H	4	-	1	MDR	244	Sim	Sim
PA203	18/12/2021	Não	H	24	12	1	PDR	235	Sim	Sim
PA204	18/12/2021	Não	H	24	12	1	PDR	309	Não	Sim
PA210	21/04/2020	Não	H	24A	12	1	XDR	235	Sim	Sim
PA218	24/01/2019	Não	H	21A	10	1	MDR	Novo	Não	Sim
PA230	26/11/2021	Não	H	47	-	1	MDR	319	Não	Sim
PA231	20/12/2021	Não	H	6A	4	1	MDR	Novo	Não	Sim
PSA_67	02/08/2015	Sim	H	Não aplicado	Não aplicado	0	Non-MDR	Novo	Não	Sim
PSA_93	23/07/2016	Sim	H	Não aplicado	Não aplicado	1	XDR	Novo	Não	Sim
PSA_HIAE_10	23/05/2021	Sim	H	Não aplicado	Não aplicado	1	XDR	Novo	Não	Sim
PSA_HIAE_11	26/05/2021	Sim	H	Não aplicado	Não aplicado	0	XDR	Novo	Não	Sim
PSA_HIAE_3	18/02/2021	Sim	H	Não aplicado	Não aplicado	1	PAN	233	Sim	Sim
PA102	14/04/2020	Não	H	16	-	1	XDR	-	-	Não

continua...

...continuação

PA104	28/04/2020	Não	H	37	19	1	XDR	-	-	Não
PA106	12/12/2020	Não	H	13	-	1	PDR	-	-	Não
PA112	18/02/2021	Não	H	20B	9	1	PDR	-	-	Não
PA116	10/03/2020	Não	H	31	16	0	Non-MDR	-	-	Não
PA119	11/03/2020	Não	H	31	16	0	Non-MDR	-	-	Não
PA121	19/03/2020	Não	H	17	7	1	PDR	-	-	Não
PA132	30/01/2019	Não	H	28A	15	1	XDR	-	-	Não
PA141	03/12/2020	Não	H	8A	5	0	Non-MDR	-	-	Não
PA143	23/12/2020	Não	H	19	8	1	PDR	-	-	Não
PA150	18/02/2021	Não	H	18A	8	1	PDR	-	-	Não
PA157	26/05/2021	Não	H	26	14	0	PDR	-	-	Não
PA161	08/06/2021	Não	H	2A	2	1	MDR	-	-	Não
PA174	22/07/2021	Não	H	38C	20	1	MDR	-	-	Não
PA187	05/10/2021	Não	H	34	-	1	XDR	-	-	Não
PA220	07/01/2021	Não	H	15A	6	1	XDR	-	-	Não
PA223	31/01/2021	Não	H	40A	22	1	XDR	-	-	Não
PA224	23/05/2021	Não	H	11	-	1	MDR	-	-	Não
PA228	17/09/2021	Não	H	12	-	1	XDR	-	-	Não
PA229	29/10/2021	Não	H	5A	3	1	XDR	-	-	Não

H: hemocultura; LB: lavado broncoalveolar; não aplicado: não foi submetido aquela análise; -: não possui dados para a análise; non-MDR: não multirresistente; MDR: multirresistente; XDR: extensivamente resistente; PDR: pan-resistente; WGS: sequenciamento de genoma completo.