DESENVOLVIMENTO DE *PRIMERS* E OTIMIZAÇÃO DE PROTOCOLOS PARA DETECÇÃO DE GENES *bla*SPM DE RESISTÊNCIA A CARBAPENÊMICOS EM ISOLADOS CLÍNICOS.

Ana Clara Miranda Tovar (PIC/UEM), Luiz Ricardo Olchanheski, Sheila Alexandra Belini Nishiyama (Orientadora). E-mail: sabnishiyama@uem.br

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento: Microbiologia/Microbiologia aplicada

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*, gene bla_{SPM-1}, polimorfismo de nucleotídeo único.

RESUMO

O uso excessivo de antibacterianos tem impulsionado a resistência antimicrobiana, comprometendo até a prescrição de carbapenêmicos, última linha de defesa contra bactérias Gram-negativas. No Brasil, a disseminação de *Pseudomonas aeruginosa* resistente a carbapenêmicos (CR-PA) está associada ao gene bla_{SPM-1} e ao clone ST277, e os testes moleculares atuais para detecção de CR-PA podem ter sua especificidade comprometida por polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) nas sequências dos *primers* usados em PCR (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*). Assim, este trabalho teve como objetivo desenvolver *primers* a partir de sequências do NCBI para monitorar variantes e otimizar a PCR para detecção rápida de CR-PA. Genomas brasileiros do *GenBank* foram analisados por BLASTn com o gene bla_{SPM-1} como referência e alinhados no *software* MAFFT, gerando uma sequência consenso da qual o *software Primer3* desenhou *primers* nas regiões flanqueadoras, com especificidade validada *in silico*. A triagem de 55.899 genomas identificou 517 isolados brasileiros, dos quais 82 apresentaram o gene bla_{SPM-1} com 100% de conservação, reforçando a disseminação clonal no país. Foi selecionado um par de *primers* (≅Tm 60 °C; 55% de GC) que gera um *amplicon* de 1.019 pb, com especificidade superior à do BLAST original. Conclui-se que o par de primers selecionado é ferramenta promissora para detecção molecular, análise de SNPs e sequenciamento, com relevância direta para otimizar a PCR para detecção rápida de CR-PA e, consequentemente, o manejo clínico de infecções associadas e para a vigilância epidemiológica da multirresistência.

INTRODUÇÃO

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria Gram-negativa, aeróbia e em forma de bastonete, reconhecida como patógeno oportunista relevante em ambiente hospitalar devido à sua capacidade de desenvolver resistência a múltiplas classes de antibacterianos, o que torna indispensáveis a detecção rápida e o monitoramento epidemiológico cuidadoso (WILSON; PANDEY, 2023). No Brasil, a disseminação de

isolados de *P. aeruginosa* resistentes a carbapenêmicos (CR-PA, do inglês Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*) está fortemente associada à presença do gene *bla*$_{SPM-1}$, que codifica a metalo-betalactamase de São Paulo (SPM, do inglês, São Paulo *Metallo-β-lactamase*), intrinsecamente vinculado à expansão do clone ST277, uma linhagem de alto risco e endêmica no país (DOS SANTOS *et al.,* 2023). Embora outras variantes enzimáticas também sejam identificadas em isolados nacionais, a combinação *bla*$_{SPM-1}$/ST277 permanece a principal responsável pela perda de sensibilidade aos carbapenêmicos no Brasil.
Atualmente, a detecção de CR-PA é realizada principalmente por testes moleculares baseados em PCR, que constituem a base para a identificação rápida da resistência nesses isolados. Contudo, apesar da rapidez, da alta sensibilidade e da especificidade desses ensaios, a ocorrência de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs, do inglês *Single Nucleotide Polymorphisms*) nas regiões-alvo pode comprometer o anelamento e a especificidade dos *primers* utilizados, levando a resultados falso-negativos. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver *primers* a partir da análise de sequências depositadas no banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) para monitorar variantes e otimizar a PCR para detecção rápida de CR-PA.

MATERIAIS E MÉTODOS

Inicialmente, foram coletados genomas de *P. aeruginosa* isolados nacionais a partir de sequências depositadas no *GenBank.* Em seguida, realizou-se uma busca por similaridade local via BLASTn, como referência foi utilizada a sequência do gene *bla*$_{SPM-1}$ (GU831565.1), o que permitiu extrair as regiões genômicas positivas acrescidas de 300 pares de bases flanqueantes em cada extremidade.
As sequências obtidas foram alinhadas com o *software MAFFT* para análise da variabilidade genética e geração de uma sequência consenso. Com base nessa matriz, foi utilizado o *software Primer3* para desenhar os *primers* ancorados exclusivamente nas regiões flanqueadoras, visando *amplicons* de 900 a 1.300 pares de base (pb), com temperatura de anelamento (Tm, do inglês *Melt Temperature)* entre 57 e 63 °C e teor de guanina-citosina (%GC) entre 40% e 60%. Por fim, a especificidade *in silico* do par de *primers* selecionado foi confirmada por meio de um novo BLASTn, garantindo anelamento exclusivo e elevada identidade nos *loci*-alvo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As infecções associadas à CR-PA apresentam elevada complexidade terapêutica em razão da coexistência de múltiplos mecanismos de resistência, incluindo mutações em proteínas de membrana externa, superexpressão de bombas de efluxo, produção de betalactamases e alta capacidade de formação de biofilme (PANG *et al.,* 2019). Esse cenário se agravou durante a pandemia de COVID-19, impulsionado pela superlotação hospitalar, pela sobrecarga das equipes médicas e pelo uso intensivo de antimicrobianos (RUSIC *et al.,* 2021).

A elevada diversidade de variantes alélicas que os genes de resistência podem apresentar constitui uma limitação relevante para os ensaios moleculares atualmente disponíveis: o foco em alvos já conhecidos restringe o processamento simultâneo de amostras e a detecção de variantes emergentes, exigindo reformulação constante dos ensaios e reanálise de amostras previamente processadas.
No presente estudo, a triagem de 55.899 genomas de *P. aeruginosa* depositados no *GenBank* identificou 517 isolados brasileiros, dos quais 82 (15,9%) apresentaram o gene *bla*$_{SPM-1}$ com 100% de conservação de sequência. Essa elevada homogeneidade reforça a hipótese de disseminação clonal de poucas linhagens da bactéria no país (DOS SANTOS *et al.,* 2023) e viabilizou o desenho de um par de *primers* universal, conforme ilustrado na Figura 1.



Figura 1. Esquema do par de *primers* universal desenvolvido para detecção do gene *bla*$_{SPM-1}$.
Fonte: elaborado pela autora.

A partir da sequência consenso, o *software Primer3* permitiu selecionar o par de primers de melhor desempenho para a detecção completa do gene *bla*$_{SPM-1}$, cujas características estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Sequência de nucleotídeos e características do par de *primers* selecionado para detecção do gene *bla*$_{SPM-1}$.

Primer	Sequência (5'→3')	Tm	% GC	*Amplicon*
Forward	ACAATGACTCGAACCCCGTC	60,04 °C	55	1019 pb
Reverse	CGTTAAATGCACGGTTGGGG	60,11 °C	55	

O par desenhado amplifica um fragmento que inclui a região codificante completa do gene *bla*$_{SPM-1}$ que contém 831 pb, acrescida das regiões flanqueadoras utilizadas para ancoragem dos *primers*, sem a formação de estruturas secundárias problemáticas. A validação *in silico* confirmou especificidade e sensibilidade analítica superiores às obtidas na busca inicial por BLASTn, tornando o conjunto estratégico para o mapeamento de SNPs por sequenciamento Sanger ou por sequenciamento de nova geração (NGS, do inglês *Next-Generation Sequencing*), ainda que sua validação *in vitro* permaneça necessária.
A partir desse par de *primers*, também é possível conceber uma ferramenta computacional para o monitoramento contínuo de variantes (SNPs) na sequência amplificada. Apesar da elevada homogeneidade do gene *bla*$_{SPM-1}$ observada nos isolados brasileiros, provavelmente resultante de forte pressão seletiva que limita a

fixação de variantes no país, é importante monitorar sua flutuação ao longo do tempo, possibilitando a detecção precoce de variantes que possam comprometer sua identificação por métodos moleculares de rotina.

CONCLUSÕES

A elevada conservação do gene *bla*$_{SPM-1}$ nos isolados brasileiros analisados confirma a disseminação clonal do gene no país e validou o posicionamento dos *primers* nas regiões flanqueadoras, garantindo amplificação completa e sem viés do alvo. Os *primers* desenvolvidos ainda precisam ser validados *in vitro*, mas apresentam-se como uma ferramenta promissora para a detecção molecular, análise de SNPs e sequenciamento. Dessa forma, os resultados obtidos têm relevância direta para o manejo clínico de infecções por CR-PA e para a vigilância epidemiológica da multirresistência no Brasil.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos aos professores, técnicos e alunos do Laboratório de Microbiologia por todo o apoio na execução desse projeto.

REFERÊNCIAS

WILSON, M. G.; PANDEY, S. ***Pseudomonas aeruginosa***. Treasure Island: StatPearls Publishing, 2023. Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557831/. Acesso em: 19 ago. 2026

PANG, Z.; RAUDONIS, R.; GLICK, B. R.; LIN, T.-J.; CHENG, Z. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 1, p. 177-192, 2019. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S074997501830208X. Acesso em: 19 ago. 2026.

DOS SANTOS, P. A. S.; SILVA, M. J. A.; GOUVEIA, M. I. M. *et al.* A prevalência de isolados de *Pseudomonas aeruginosa* produtores de metalo-beta-lactamase (MβL) no Brasil: uma revisão sistemática e meta-análise. **Microorganisms**, v. 11, n. 9, p. 2366, 2023. Disponível em: https://www.mdpi.com/2076-2607/11/9/2366. Acesso em: 19 ago. 2026.

RUSIC, D. et al. Implicações da pandemia de COVID-19 no surgimento da resistência antimicrobiana: ajustando a resposta a futuros surtos. **Life**, v. 11, n. 3, p. 220, 2021. Disponível em: https://doi.org/10.3390/life11030220. Acesso em: 19 ago. 2026.