



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E BIOCÊNCIAS

Fernando Hartmann Barazzetti

**Avaliação de SNPs em genes relacionados à resistência a fluoroquinolonas (*parC* e *gyrA*) e macrolídeos (23S rRNA) e caracterização da microbiota associada, em amostras clínicas positivas para *Mycoplasma genitalium*.**

FLORIANÓPOLIS  
2023

Fernando Hartmann Barazzetti

**Avaliação de SNPs em genes relacionados à resistência a fluoroquinolonas (*parC* e *gyrA*) e macrolídeos (23S rRNA) e caracterização da microbiota associada, em amostras clínicas positivas para *Mycoplasma genitalium***

Dissertação de Mestrado submetido ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para obtenção do grau de mestre.

Orientador: Prof.º Dr Glauber Wagner  
Co-orientadora: Prof.ª Dr.ª Maria Luiza Bazzo

FLORIANÓPOLIS  
2023

Hartmann Barazzetti, Fernando

Avaliação de SNPs em genes relacionados à resistência a fluoroquinolonas (parC e gyrA) e macrolídeos (23S rRNA) e caracterização da microbiota associada, em amostras clínicas positivas para Mycoplasma genitalium / Fernando Hartmann Barazzetti ; orientador, Dr. Glauber Wagner, coorientador, Dra. Maria Luiza Bazzo, 2023.

74 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Mycoplasma genitalium . 3. resistência antimicrobiana. 4. SNPs. 5. microbiota. I. Wagner, Dr. Glauber . II. Luiza Bazzo, Dra. Maria. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. IV. Título.

Fernando Hartmann Barazzetti

**Avaliação de SNPs em genes relacionados à resistência a fluoroquinolonas (*parC* e *gyrA*) e macrolídeos (23S rRNA) e caracterização da microbiota associada, em amostras clínicas positivas para *Mycoplasma genitalium*.**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr<sup>a</sup>. Jussara Kasuko Palmeiro  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr<sup>a</sup>. Fabienne Antunes Ferreira  
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão **original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Biotecnologia e Biociências.

---

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

---

Prof. Dr. Glauber Wagner  
Orientador

Florianópolis, 2023

Dedico esse trabalho a todos os profissionais de saúde, que direta ou indiretamente trabalham para uma sociedade melhor. Principalmente para aqueles que atuaram na pandemia, nas mais diversas frentes de trabalho.

## AGRADECIMENTOS

São muitos agradecimentos, espero que não tenha esquecido ninguém, mas por mais que eu me esforce, isso sempre acaba acontecendo. Não pela falta de memória, mas sim porque minha trajetória até foi longa, e muitas pessoas fazem ou fizeram parte dela.

Gostaria de agradecer meus professores, todos eles, desde o ensino fundamental, até os da universidade. Agradeço à Professora Dra. Maria Luiza Bazzo, pela oportunidade que tenho de trabalhar com ela e no LBMMS, pelos ensinamentos e aprendizados. Ao Professor Dr. Glauber Wagner que me aceitou como orientando, pelos ensinamentos.

Também quero agradecer a todo pessoal do LBMMS, pela parceria, pelas brincadeiras e pelo café, é claro. Especialmente àqueles que estão diariamente trabalhando junto comigo, seja nas mais diversas atividades, desde manipular um equipamento único no Brasil, até a simples troca de uma lâmpada. Fizemos muitas coisas e aprendemos muito um com o outro também.

A turma do LABINFO, sempre tristes e imbatíveis. Obrigado por me receberem tão bem, pela parceria, pela ajuda. Obrigado Vilmar, Éric e Tati pela ajuda, vcs são Top!

Agradeço a oportunidade de contribuir um pouco para a sociedade com meu trabalho, foi um momento muito difícil e ficou marcado na história. Nunca imaginei trabalhar em uma pandemia, isso era coisa do cinema e naquele momento, Eu, agora formado, trabalhando na força tarefa contra Covid 19, juntamente com professoras e colegas de faculdade. Foram tempos difíceis, de muito esforço e aprendizado. Desde o primeiro dia, junto com a Professora Luiza, Marcos e colegas do LBMMS, discutindo e tentando achar uma maneira de ajudar. Logo vieram muitos outros que estavam dispostos a ajudar se formando uma grande equipe que desenvolveu um trabalho incrível. Essa foi uma experiência que ficou marcada profundamente na minha vida. Agradeço a TODOS os profissionais da saúde que lutaram na pandemia, que não mediram esforços para combater o vírus e ajudar o próximo.

Ao HU e equipe das análises clínicas, com agradecimento especial à Cida, pela pessoa maravilhosa que é, sempre ajudando e mais importante ainda pelo primeiro café da manhã, feito sempre com muito carinho. Obrigado pelas coletas de *swab*, e por me ensinar a coletar também.

Ao meu amigo Marcos, que me ajudou muito nesse trabalho. Companheiro de Lab. Uma pessoa que está sempre disposta a ajudar e tem um conhecimento enorme. Muito obrigado Marcos.

Agradeço a minha esposa Viviane, pela parceria nesses anos todos, pela compreensão e pelo incentivo a continuar meus estudos. Não esquecendo do Frederico, *gato peste*, que chegou na pandemia e fez companhia pra Vivi enquanto eu estava fora o dia inteiro.

Também quero agradecer ao pessoal do Ministério da Saúde, foram muitos aprendizados, muitas reuniões, muitos projetos.

Por fim, agradeço à Universidade Federal de Santa Catarina, à Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências e à agência financiadora UNIEDU por parte do suporte financeiro.

“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes”  
Isaac Newton



## RESUMO

Pertencente à classe Mollicutes, *Mycoplasma genitalium* é uma bactéria fastidiosa e de crescimento lento. Possui um genoma com cerca de 580 kb, sendo o menor genoma bacteriano conhecido. É causadora de Infecções Sexualmente Transmissíveis - ISTs, acometendo em homens e mulheres. É encontrada na uretra, vagina, colo do útero, reto e também na orofaringe. *M. genitalium* não tem parede bacteriana, o que a torna naturalmente resistente a antimicrobianos que atuam na parede bacteriana, como os Beta-lactâmicos e vem apresentando resistência a alguns antimicrobianos utilizados para seu tratamento. Resistência que é deduzida pela constatação de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) nos genes *parC*, *gyrA* e na subunidade do 23S rRNA. Resistência que causa grande preocupação, pois a infecção por esta bactéria pode se tornar intratável. A detecção desse patógeno se dá principalmente por meio de testes moleculares, porém em muitos casos, pela falta de testes, não é detectada levando a uma abordagem e tratamento sintomáticos. O presente estudo investigou o genoma de *M. genitalium* obtidos de amostras clínicas oriundas das cinco grandes regiões brasileiras. Para isso, foram utilizadas metodologias de sequenciamento para pesquisar, principalmente, as mutações que sugerem resistência aos antimicrobianos das classes macrolídeos e fluoroquinolonas e a microbiota associada com a presença deste patógeno. Foram realizadas PCRs convencionais dos alvos de interesse, seguidas de sequenciamento Sanger. As amostras de secreção uretral masculinas foram submetidas a sequenciamento metagenômico. Com este estudo apresentamos os primeiros dados sobre a resistência de *M. genitalium* no Brasil, incluindo amostras de todas as regiões brasileiras. Mutações associadas à resistência a macrolídeos foram encontradas em 40,5% das amostras estudadas. Já para resistência a fluoroquinolonas foram encontradas mutações relacionadas à resistência em apenas seis amostras. A caracterização da microbiota, em amostras detectadas para *M. genitalium*, mostrou alguns desafios em seu estudo, principalmente na questão do material genético do hospedeiro presente nas amostras. Os resultados gerados podem fornecer dados de genômica epidemiológica sobre *M. genitalium* no Brasil, assim como fornecer dados para o Ministério da Saúde e comunidade científica para auxiliar na tomada de decisões e adoção de medidas públicas de saúde.

Palavras-chave: *Mycoplasma genitalium*, resistência, metagenoma, polimorfismos de nucleotídeo único

## ABSTRACT

Belonging to the Mollicutes class, *Mycoplasma genitalium* is a fastidious, slow-growing bacterium. It has a genome of around 580 kb, making it the smallest known bacterial genome. It causes Sexually Transmitted Infections - STIs, affecting men and women. It is found in the urethra, vagina, cervix, rectum and also in the oropharynx. *M. genitalium* does not have a bacterial wall, or it becomes naturally resistant to antimicrobials that act on the bacterial wall, such as beta-lactams, and has shown resistance to some antimicrobials used for its treatment. Resistance is deduced by the finding of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *parC*, *gyrA* genes, and in the 23S rRNA subunit. Resistance causes great concern, as infection with this bacteria can become untreatable. The detection of this pathogen occurs mainly through molecular tests, but in many cases, due to the lack of testicles, it is not detected, leading to a syndromic approach and treatment. The present study investigated the genome of *M. genitalium* obtained from clinical samples from the five major Brazilian regions. To this end, sequencing methodologies were used to mainly research changes that suggest resistance to antimicrobials from the macrolide and fluoroquinolone classes and the microbiota associated with the presence of this pathogen. Conventional PCRs of the targets of interest were performed, followed by Sanger sequencing. Male urethral colony samples were subjected to metagenomic sequencing. This study presented the first data on the resistance of *M. genitalium* in Brazil, including samples from all Brazilian regions. Mutations related to macrolide resistance were found in 40.5% of the samples studied. Regarding resistance to fluoroquinolones, resistance-related injuries occurred in only six samples. The characterization of the microbiota, in samples blocked for *M. genitalium*, showed some challenges in its study, mainly regarding the issue of the host's genetic material present in the samples. The results generated can provide epidemiological genomic data on *M. genitalium* in Brazil, as well as provide data for the Ministry of Health and the scientific community to assist in decision-making and the adoption of public health measures.

Keywords: *Mycoplasma genitalium*, resistance, metagenomics, single nucleotide polymorphisms

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Relação filogenética entre espécies do gênero <i>Mycoplasma</i>	17
Figura 2. Microscopia eletrônica de <i>Mycoplasma genitalium</i> (bar: 200 nm).	19
Figura 3. Esquema de sequências homólogas mgpar no genoma de <i>Mycoplasma genitalium</i>	20
Figura 4. Estimativa de novas ISTs no mundo.	21
Figura 5: Porcentagem do total de amostras incluídas no estudo por região brasileira.	42
Figura 6. GEL de agarose com os produtos da PCR do alvo 23S rRNA.	43
Figura 7. Cladograma com presença e ausência dos SNPs, ano de coleta, tipo de amostra.	46
Figura 8. Número de amostras com sequenciamento bem sucedido e com mutação detectada por região.	48
Figura 9. Resultados múltiplos da qualidade do sequenciamento WGS.	49
Figura 10. Distribuição taxonômica dos 30 gêneros mais abundantes de bactérias presente nas amostras clínicas, sem o DNA do hospedeiro.	52
Figura 11. Distribuição taxonômica dos 30 gêneros mais abundantes de bactérias presente nas amostras clínicas, com o DNA do hospedeiro.	52
Figura 12. Distribuição taxonômica dos 50 gêneros mais abundantes de bactérias presente nas amostras clínicas.	53
Figura 13. Porcentagem de resistência a classes de antimicrobianos, encontradas em cinco amostras clínicas, utilizando o banco de dados CARD.	54
Figura 14. Genes de resistência encontrados nas amostras clínicas por WGS, pesquisadas no banco de dados CARD.	55

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1. Esquema das recomendações para tratamento de uretrites - PCDT

25

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Amostras de secreção uretral masculina, patógenos identificados e regiões de origem	34
Tabela 2. Amostras de <i>swab</i> vaginal, patógenos identificados e regiões de origem	35
Tabela 3. Descrição dos alvos e sequência de iniciadores utilizados para amplificação e sequenciamento.	36
Tabela 4. Amostras de secreção uretral masculina, patógenos identificados e regiões de origem.	39
Tabela 5. Mutações que conferem resistência aos antimicrobianos macrolídeos e fluoroquinolonas	43
Tabela 6. SNPs encontrados na subunidade 23S rRNA.	44
Tabela 7. SNPs encontrados no gene <i>parC</i> .	44
Tabela 8. Processamento do resultado das amostras clínicas.	49

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP - Trifosfato de adenosina

CARD - *The Comprehensive Antibiotic Resistance Database*

CCS - Centro de Ciências da Saúde

CDC - Centro de Controle e Prevenção de Doenças (do inglês *Centers for Disease Control and Prevention*)

DNA - Ácido Desoxirribonucleico (do inglês, *Deoxyribonucleic Acid*)

DPO - *Dual Priming Oligonucleotide*

HSH - Homens que fazem sexo com homens

HSM - Homens que fazem sexo com mulheres

HIV - Vírus da imunodeficiência humana ( do inglês *human immunodeficiency virus*)

HU- Hospital Universitário

IST - Infecção Sexualmente Transmissível

LBMMS - Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia

kb - Kilobases (1.000 pares de base)

MAG - Montagem de genoma pelo metagenoma (do inglês, *metagenome-assembled genome*)

MgPar - regiões homólogas no genoma

MuDT - *Multiple Detection Temperature*

NAAT - Teste de Amplificação de Ácido Nucleico (do inglês, *Nucleic Acid Amplification Test*)

OMS - Organização Mundial da Saúde

PCDT - Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Atenção Integral às Pessoas com Infecções Sexualmente Transmissíveis

IM - Intramuscular

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*)

RNA - Ácido Ribonucleico (do inglês, *Ribonucleic Acid*)

SNP - Polimorfismo de Nucleotídeo Único (do inglês, *Single-Nucleotide Polymorphism*)

TMA - Amplificação Mediada por Transcrição (do inglês, *Transcription-mediated amplification*)

TOCE - *Tagging Oligonucleotide Cleavage and Extension*

UNG - Uretrite não Gonocócica

UTM - Meio de transporte Universal (do inglês *Universal Transport Medium*)

UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina

VO - Via oral

WGS - Sequenciamento de Genoma Completo (do inglês, *Whole Genome Sequencing*)

WHO - Organização Mundial da Saúde (do inglês *World Health Organization*)

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>16</b>
1.1 <i>MYCOPLASMA GENITALIUM</i>	16
1.2 <i>M. GENITALIUM</i> AGENTE DE INFECÇÕES SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEIS	19
1.3 SINTOMAS E COMPLICAÇÕES	20
1.4 EPIDEMIOLOGIA	21
1.5 <i>MYCOPLASMA GENITALIUM</i> E ASSOCIAÇÃO COM OUTROS PATÓGENOS	21
1.6 DIAGNÓSTICO	22
<b>4 OBJETIVOS</b>	<b>31</b>
4.1 OBJETIVO GERAL	31
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>32</b>
5.1 LOCAL DE ESTUDO E AMOSTRAGEM	32
5.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO DAS AMOSTRAS.	32
<b>5.2.1 Amostras para pesquisa dos alvos de interesse (23S rRNA, parC e gyrA)</b>	<b>32</b>
<b>5.2.2 Extração do material genético para sequenciamento dos alvos de interesse</b>	<b>36</b>
<b>5.2.3 Amplificação dos alvos de interesse</b>	<b>36</b>
<b>5.2.4 Sequenciamento Sanger</b>	<b>38</b>
<b>5.2.5 Análise do sequenciamento Sanger</b>	<b>38</b>
5.3 AMOSTRAS PARA SEQUENCIAMENTO DO GENOMA TOTAL	38
<b>5.3.1 Extração do material genético para WGS</b>	<b>39</b>
<b>5.3.2 Sequenciamento do metagenoma das amostras clínicas</b>	<b>39</b>
<b>5.3.3 Metagenoma</b>	<b>40</b>
<b>6 RESULTADOS</b>	<b>41</b>
6.1 NÚMEROS DE AMOSTRAS POR REGIÃO BRASILEIRA	41
6.2 SEQUENCIAMENTO SANGER	41
6.3 COMPARAÇÃO DAS MUTAÇÕES ENCONTRADAS EM SV E SU.	43
6.4 SEQUENCIAMENTO WGS	47
<b>6.4.1 Qualidade do Sequenciamento metagenoma</b>	<b>47</b>
<b>6.4.2 Filtragem das leituras</b>	<b>48</b>
<b>6.4.3 Identificação e confirmação de <i>M. genitalium</i> nas amostras clínicas através de WGS</b>	<b>50</b>



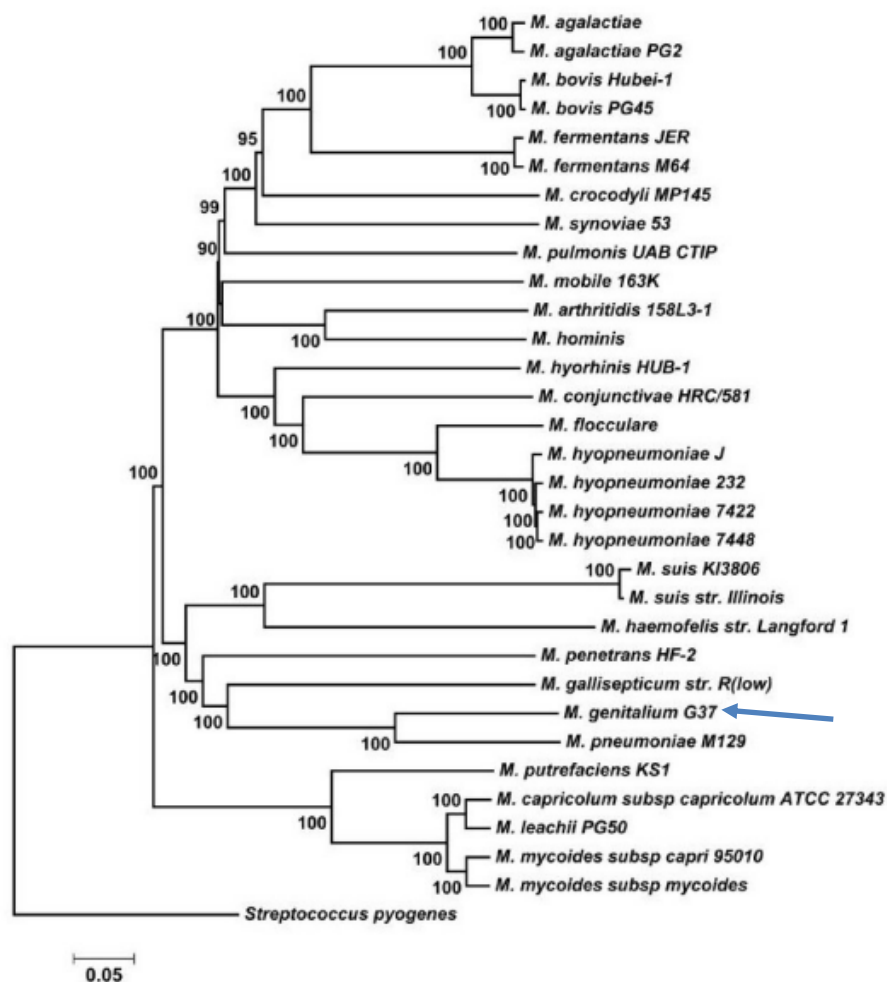
6.4.4 Caracterização da microbiota associada com <i>M. genitalium</i>	50
6.4.5 Resistoma das amostras clínicas	52
7 DISCUSSÃO	55
8. CONCLUSÃO	61
9 PERSPECTIVAS	62
REFERÊNCIAS	63

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 MYCOPLASMA GENITALIUM

Mycoplasmas são procariontes pertencentes à família *Mycoplasmataceae* da ordem *Mycoplasmatales*. Os gêneros *Mycoplasma* e *Ureaplasma* pertencem à classe Mollicutes, que abrange bactérias sem parede celular. O gênero *Mycoplasma* contém mais de 100 espécies, das quais 13 estão presentes como flora humana (LE ROX; HOOSEN, 2010). (Figura 1). Estas espécies podem ser encontradas no sistema respiratório superior, trato geniturinário de animais e são causadoras de diversas doenças (FRASER et al., 1995; TAYLOR-ROBINSON, 1996). Micoplasmas têm como principal característica o genoma reduzido, tamanho diminuto e ausência de parede celular, sendo esta última a principal característica usada para a classificação taxonômica (RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998).

Figura 1. Relação filogenética entre algumas das espécies do gênero *Mycoplasma*

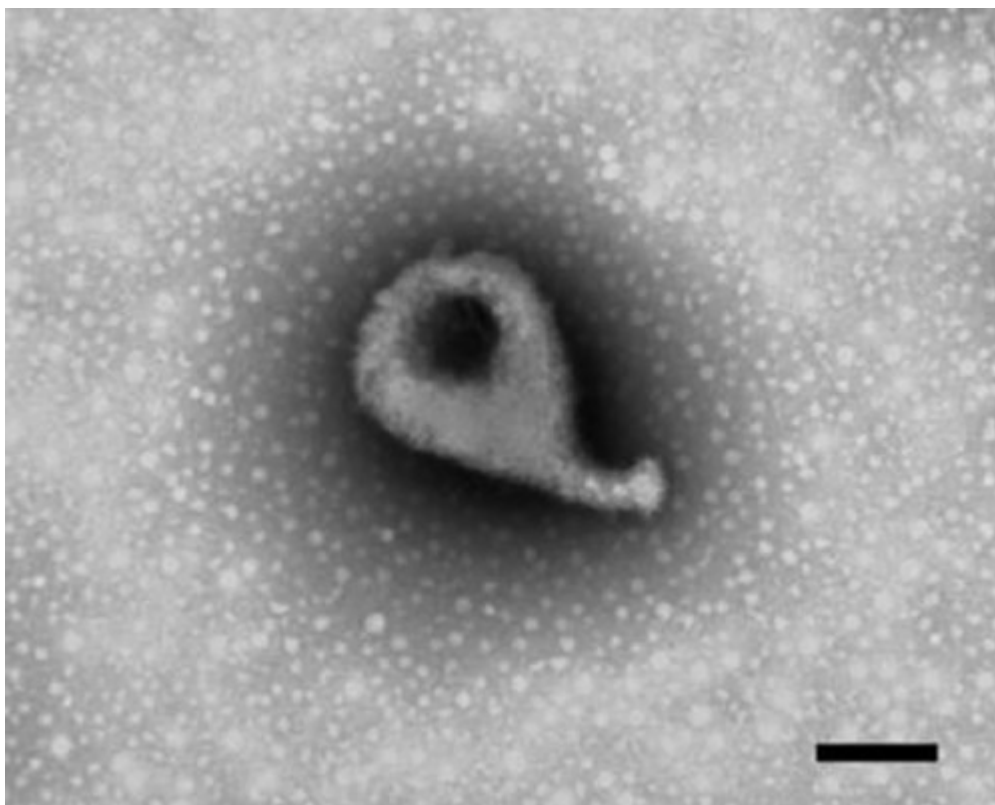


Fonte: Adaptado de Siqueira et al, 2013

*Mycoplasma genitalium* é uma bactéria fastidiosa e de crescimento lento. Foi identificada em 1970, isolada da secreção uretral de dois homens durante estudos de uretrite não gonocócica (UNG), de um total 13 isolados de secreção uretral masculina, que possuíam características de fermentadores de glicose, e com perfil sorológico diferente dos demais micoplasmas, sendo então proposta uma nova classificação - *Mycoplasma genitalium* (TULLY et al., 1981). A morfologia típica desta bactéria é em formato de garrafa com uma estrutura em forma de "haste" (Figura 2), possui uma proteína de fixação, uma adesina que confere aderência em superfícies de plástico, vidro e a diversas células humanas, consegue invadir células epiteliais e tem motilidade do tipo deslizante (TAYLOR-ROBINSON et al., 1981). *M. genitalium* é um parasita obrigatório, ou seja, depende de seu hospedeiro para a obtenção de nutrientes, sendo muito exigente para o crescimento (TAYLOR-ROBINSON; JENSEN, 2011).

*M. genitalium* utiliza a glicose como substrato para garantir sua sobrevivência, através da fosforilação mediada pela enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, resultando na produção de trifosfato de adenosina (ATP) (MURRY; BASEMAN, 2006). Essa bactéria é capaz de invadir as células humanas, persistindo e se multiplicando por longos períodos - de horas a dias, usando algumas estratégias como a fixação por meio de proteínas de reconhecimento de adesinas e proteínas acessórias de citoaderência (BLAYLOCK et al., 2004). Também, através da variação antigênica, consegue evadir do sistema imunológico (RAZIN; YOGEV; NAOT, 1998). A patogênese das infecções genitais é facilitada por múltiplos fatores de virulência presentes nesse organismo. A adesão é mediada por duas proteínas, MgPa e P32 (MG318), que estão ligadas à membrana celular terminal (REDDY; RASMUSSEN; BASEMAN, 1995). A atividade enzimática da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase auxilia na adesão à mucosa vaginal e cervical, enquanto a enzima metionina sulfóxido redutase consegue aumentar a virulência (DHANDAYUTHAPANI et al., 2001; SETHI; ZAMAN; JAIN, 2017). Para evadir o sistema imunológico, *M. genitalium* utiliza a variação antigênica das proteínas de sua membrana, limitando a resposta imune humoral do hospedeiro (TAYLOR-ROBINSON; JENSEN, 2011; ARBER, 2000). Além disso, as duas proteínas constituintes de MgPa, P110 e P140, apresentam variação genética, gerando novas proteínas que não são reconhecidas pelo sistema imunológico (ZAMAN; JAIN, 2017).

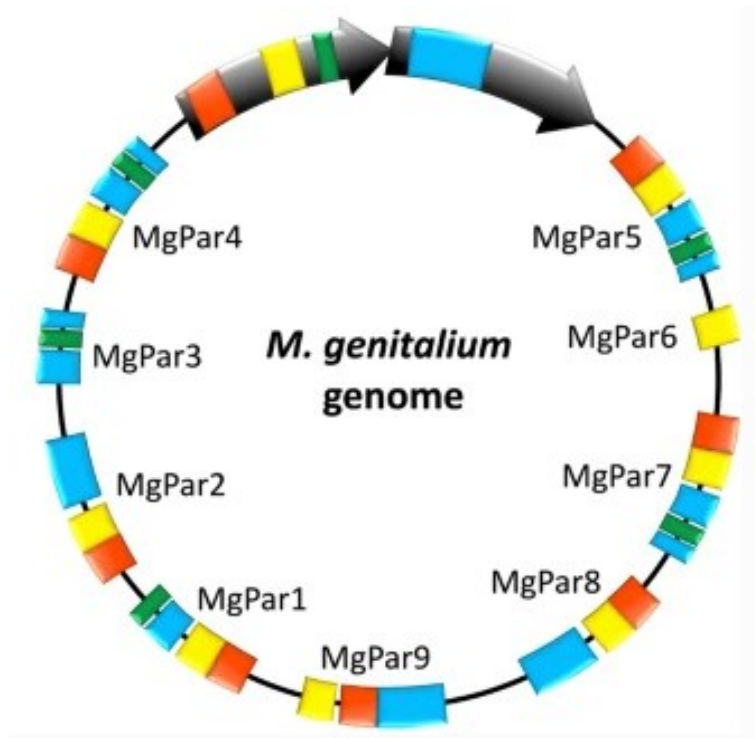
Figura 2. Microscopia eletrônica de *Mycoplasma genitalium* (bar: 200 nm).



Fonte: GNANADURAI; FIFER, 2020

*M. genitalium* teve seu primeiro genoma sequenciado em sua totalidade em 1995, com um tamanho próximo a 580 kb, o qual codifica cerca de 500 genes (FRASER et al., 1995a), sendo o menor genoma bacteriano de replicação independente conhecido (TAYLOR-ROBINSON; JENSEN, 2011). O genoma de *M. genitalium* apresenta como características: ausência de sistemas regulatórios; baixo número de sistemas de transportes e a presença de repetições cromossômicas chamadas de MgPar (Figura 3), as quais estão envolvidas na variação antigênica (FRASER et al., 1995b; MA et al., 2010).

Figura 3. Esquema de sequências homólogas mgpar no genoma de *Mycoplasma genitalium*

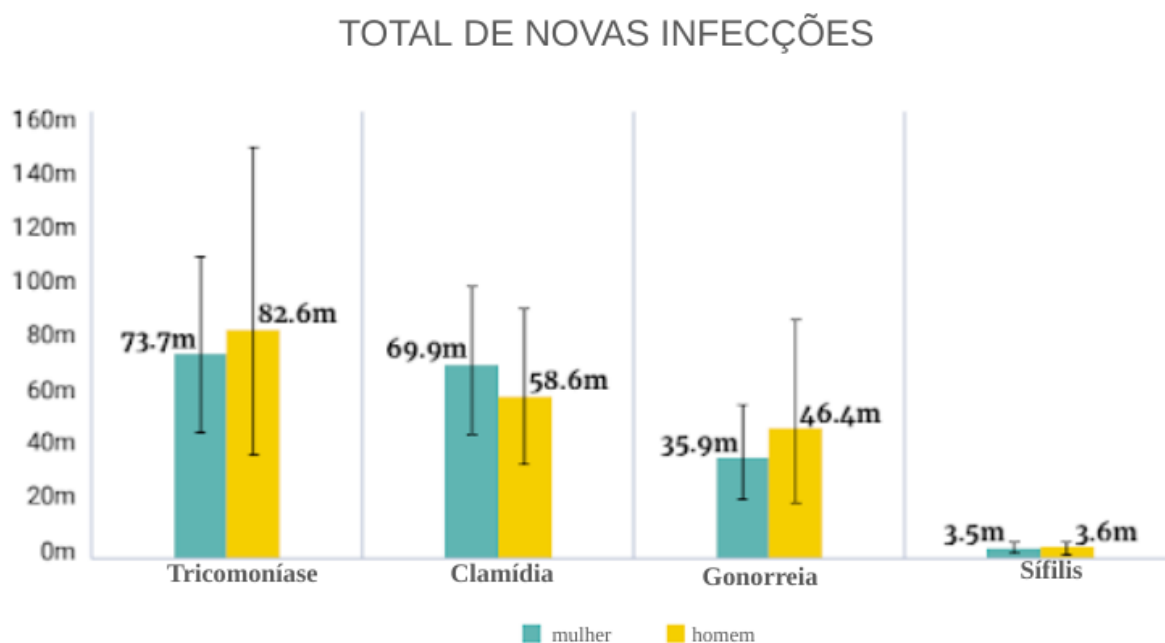


Fonte: GNANADURAI; FIFER, 2020

### 1.2 *M. GENITALIUM* AGENTE DE INFECÇÕES SEXUALMENTE TRANSMISSÍVEIS

As Infecções Sexualmente Transmissíveis (ISTs) são uma preocupação global de saúde pública, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que, anualmente, ocorram cerca de 357 milhões de novos casos de ISTs curáveis no mundo (Figura 4), porém ISTs causadas por *M. genitalium* não fazem parte desta estatística (UNEMO; JENSEN, 2017; WHO 2021). Sendo agente etiológico causador de ISTs, *M. genitalium* afeta mulheres e homens e, além da uretra, vagina e colo do útero, também é encontrado no reto e na orofaringe (JENSEN et al., 1996). Quando descoberto e isolado do trato urogenital de homens, *M. genitalium* passou a ser reconhecido, junto com *Ureaplasma urealyticum* e *Mycoplasma hominis* (quando estes causam UNG), como um microrganismo causador de uretrite não gonocócica (UNG) (CORDOVA; CUNHA, 2002). Desde então, tem sido evidenciada uma associação parasitária de *M. genitalium* com células ciliadas epiteliais dos tratos respiratório e genital (FRASER et al., 1995).

Figura 4. Estimativa de novas ISTs no mundo.



Fonte: WHO 2021.

### 1.3 SINTOMAS E COMPLICAÇÕES

Em homens a infecção por *M. genitalium* pode ser assintomática em 70% dos casos, sendo os sintomas encontrados: dor ao urinar (aguda, persistente e recorrente), desconforto, disúria, corrimento uretral, proctite, balanopostite. Pode também haver complicações, como: artrite reativa adquirida sexualmente, epididimite e, em alguns casos, conjuntivite (CORDOVA; CUNHA, 2002; SETHI et al., 2017). No sexo feminino, pode-se encontrar cerca de 40% a 75% de infecções assintomáticas, quando há sintomas pode ocorrer: corrimento vaginal aumentado ou alterado, disúria, sangramento intermenstrual ou sangramento após prática sexual, e dor abdominal inferior. Também pode ocorrer complicações, como: doença inflamatória pélvica, endometrite, salpingite, infertilidade tubária, artrite reativa adquirida sexualmente, parto prematuro, aborto espontâneo (SETHI et al., 2017). Algumas infecções sexualmente transmissíveis causadas por microrganismos se disseminam de maneira direta através da invasão do trato genital feminino até alcançar as trompas de falópio (SVENSTRUP et al., 2003). De forma alternativa, os espermatozoides têm sido propostos como possíveis meios de disseminação bacteriana. Alguns experimentos realizados *in vitro* demonstraram que *Chlamydia trachomatis*, *Escherichia coli*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Ureaplasma urealyticum* e *Mycoplasma hominis* têm afinidade pelos espermatozoides humanos e estudos preliminares encontraram *M. genitalium* associados a espermatozoides (SVENSTRUP et al., 2003).

Também, desde a década de 1960, tem havido suspeitas de uma possível associação entre câncer e infecção causada por micoplasmas (CIMOLAI, 2001; KLEIN et al., 2020).

#### 1.4 EPIDEMIOLOGIA

Os dados epidemiológicos sobre ISTs causadas por *M. genitalium* são escassos, o que causa grande preocupação, pois a bactéria vem desenvolvendo resistência a classes de antimicrobianos usados atualmente no seu tratamento (JENSEN; BRADSHAW, 2015; LEÓN et al., 2023; MACHALEK et al., 2020). A prevalência da infecção por *M. genitalium* varia entre diferentes grupos populacionais. Em populações com comportamento sexual de baixo risco, a taxa de infecção é aproximadamente de 1%, enquanto em grupos com comportamento sexual de alto risco, a taxa aumenta para cerca de 7% (CINA et al., 2019). No grupo de UNG, a taxa de infecção varia de 6% a 50%, dependendo da região geográfica e do período analisado (SHAHMANESH, 2008). A infecção por *M. genitalium* em homens está fortemente associada à UNG e à UNG não causada por clamídia, com prevalência de 7,3% em homens que fazem sexo com homens (HSH) sintomáticos e assintomáticos de alto risco (ONG et al., 2021). A prevalência da infecção por *M. genitalium* em homens com UNG varia de aproximadamente 10% a 25%. Em homens com UNG persistente ou recorrente e crônica (duração dos sintomas >30 dias), a positividade da infecção por *M. genitalium* foi relatada em cerca de 41% a 50%, respectivamente (SETHI et al., 2017). Nas mulheres, a associação entre *M. genitalium* e sinais e sintomas clínicos parece ser menos forte do que nos homens, com prevalência de 20 - 40% em mulheres com infecções sexualmente transmissíveis (LIS; ROWHANI-RAHBAR; MANHART, 2015; DE CARVALHO et al., 2020).

#### 1.5 MYCOPLASMA GENITALIUM E OUTROS MICRORGANISMOS CAUSADORES DE UNG

Já se sabe da associação de outros microrganismos, além de *Chlamydia trachomatis* (CT) e *M. genitalium*, com a UNG em homens que fazem sexo com homens (HSH) e homens que fazem sexo com mulheres (HSM). A UNG é uma síndrome do trato genital masculino caracterizada pelos sintomas descritos anteriormente e a ausência de *Neisseria gonorrhoeae* (SRINIVASAN, Sujatha et al., 2021). Os organismos associados à UNG são normalmente transmitidos sexualmente, representando um risco para as parcerias, especialmente para as mulheres, cuja transmissão pode resultar em complicações (MANHART, Lisa E. et al; JENSEN et al., 1996). Apesar de *C. trachomatis* ser o agente mais comum de UNG, seguida

por *M. genitalium* (RANE, Vinita S. et al, 2014), outros patógenos menos comuns como *Trichomonas vaginalis* (TV), vírus herpes simplex (HSV) e adenovírus (BRADSHAW et al., 2006; SCHWEBKE et al., 2011) também foram reportados como agentes etiológicos da UNG.

Estudos recentes sugerem diferenças na etiologia entre HSH e HSM (MANHART et al., 2013). Diversos estudos avaliaram o papel do *Ureaplasma urealyticum* na UNG, mas os resultados foram inconsistentes (MANHART et al., 2013). Além disso, a hipótese de que comunidades bacterianas, em vez de espécies individuais, possam contribuir para a UNG idiopática foi examinada, mas um estudo não encontrou uma separação consistente de comunidades bacterianas entre casos e controles (SRINIVASAN et al., 2021). Também observa-se um risco maior de infecção por HIV quando associado à infecção por *M. genitalium* (GAYDOS et al., 2019), a qual também pode causar uma infecção oportunista em pessoas infectadas pelo HIV, também, a resposta do organismo gerada pela infecção desta bactéria pode aumentar a susceptibilidade e transmissão do HIV (MAVEDZENGE; WEISS, 2009).

## 1.6 DIAGNÓSTICO

Após o isolamento inicial, na década de 70, ocorreu um intervalo de 10 anos até o desenvolvimento de técnicas de detecção confiáveis para *M. genitalium* que pudessem associá-la como agente causador de infecções. Nesse período, várias tentativas foram realizadas por pesquisadores para rastreio de *M. genitalium*, mas sem êxito devido às dificuldades de cultivar o microrganismo (TULLY et al, 1981; HYMAN et al., 1987; SAMRA et al., 1988). O tamanho de *M. genitalium* está no limiar da microscopia óptica, por não possuir parede os métodos de coloração, como o de Gram, são ineficientes, entretanto é possível ver corpos cocóides por reações de imunofluorescência, microscopia de contraste de fase e óptica de campo escuro (SVENSTRUP et al., 2003).

Estudos adicionais só foram possíveis após o desenvolvimento de técnicas de amplificação de ácidos nucleicos (NAATs, do inglês *Nucleic Acid Amplification Techniques*) como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*) (TULLY et al, 1981; HYMAN et al 1987). Outro método utilizado é a amplificação mediada por transcrição (TMA - do inglês *Transcription-Mediated Amplification*) que visa especificamente o rRNA, molécula presente em múltiplas cópias por célula. Essa abordagem tem o potencial de aumentar significativamente a sensibilidade da detecção em comparação com os ensaios de PCR, os quais direcionam genes de cópia única, além disso, a TMA utiliza tecnologia de captura de alvo para isolar o RNA desejado e eliminar interferentes



(WROBLEWSKI et al., 2006). Esses métodos de diagnóstico são sensíveis e específicos para identificar infecções por *M. genitalium* (DEGUCHI et al., 2002; HAMASUNA; OSADA; JENSEN, 2007; JENSEN et al., 2016).

O diagnóstico de *M. genitalium* é atualmente limitado devido à indisponibilidade de um teste diagnóstico adequado, ou estrutura laboratorial. Visto que o cultivo de *M. genitalium* é desafiador devido à sua natureza fastidiosa e ao crescimento lento, os NAATs são as ferramentas de diagnóstico mais amplamente utilizadas. Devido à baixa carga bacteriana em alguns pacientes (MAVEDZENGE; WEISS, 2009; JENSEN et al., 2004), é importante ter um limite de detecção extremamente sensível, além de uma especificidade superior a 99% (TULLY et al, 1981).

## 1.7 TRATAMENTO

*M. genitalium* pode apresentar sensibilidade aos macrolídeos, fluoroquinolonas e tetraciclina *in vitro*, porém o tratamento com tetraciclina possui altas taxas de falha (BJÖRNELIUS et al., 2008; TOUATI et al., 2014). A ausência de peptidoglicano em *M. genitalium* impede a ação de antimicrobianos direcionados à parede celular (TULLY et al., 1981). Como alternativa, outras categorias de antimicrobianos, incluindo macrolídeos e quinolonas, têm sido empregadas para tratar a infecção por esta bactéria (KIKUCHI et al., 2014). No entanto, o uso variado de dosagens e regimes terapêuticos ao redor do mundo têm levado a um aumento da resistência aos antimicrobianos, especialmente no caso de macrolídeos e fluoroquinolonas (MACHALEK et al., 2022; TAGG et al., 2013; FERNÁNDEZ-HUERTA et al., 2020). A utilização de abordagem síndrômica (manejo exclusivamente clínico) no tratamento de casos suspeitos de ISTs é outro fator de extrema importância quando se trata de *M. genitalium*. No Brasil, era recomendado para tratamento de homens com UNG, azitromicina 1g em dose única ou doxiciclina 100 mg duas vezes ao dia por um período de sete dias (BRASIL, 2020). No ano de 2022, o Ministério da Saúde do Brasil, atualizou o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Atenção Integral às Pessoas com ISTs - PCDT (Quadro 1), e passou a recomendar o uso de azitromicina 500mg, 2 comprimidos por via oral em dose única, e incluiu tratamento quando *M. genitalium* é identificado como agente etiológico. (BRASIL, 2022).

As diretrizes do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC - do inglês *Centers for Disease Control and Prevention*) recomendam para o tratamento de UNG doxiciclina 100 mg por via oral 2 vezes ao dia por um período de sete dias, ou azitromicina 500 mg via oral,

dose inicial seguida por 250 mg por via oral durante quatro dias. Se estiverem disponíveis meios para testar a resistência de *M. genitalium*, sendo sensível aos macrolídeos, é recomendado uso de doxiciclina 100 mg por via oral, duas vezes por dia em um período de sete dias, seguido de uma dose de azitromicina 1 g por via oral e 500 mg por via oral diariamente por três dias. Se for resistente aos macrolídeos, se recomenda o uso de doxiciclina 100 mg via oral, duas vezes ao dia por sete dias, seguido do uso de moxifloxacina 400 mg por via oral, uma vez ao dia por sete dias. Agora, se não houver meios para testar a resistência, e *M. genitalium* for detectado por NAATs, é recomendado o uso de doxiciclina 100 mg por via oral duas vezes por dia, seguido pelo uso de moxifloxacina 400 mg por via oral uma vez ao dia por sete dias. (CDC., 2021).

O Quadro 01, mostra as recomendações do MS no Protocolos Clínicos e Diretrizes de Tratamento - PCDT de ISTs para o tratamento das uretrites quando se tem identificação do agente etiológico, como NG, CT, TV, e também quando não se conhece o agente etiológico. Destaca-se que neste PCDT, foi incluída a recomendação para tratamento quando o agente for *M. genitalium* sugerindo o uso de macrolídeo.

Quadro 1. Esquema das recomendações para tratamento de uretrites - PCDT

<b>Infeção</b>	<b>primeira opção</b>	<b>Tratamento segunda opção</b>
Uretrite sem identificação do agente etiológico	Ceftriaxona 500mg, IM, dose única MAIS Azitromicina 500mg, 2 comprimidos, VO, dose única	Ceftriaxona 500mg, IM, dose única MAIS Doxiciclina 100mg, 1 comprimido, VO, 2x/ dia, por 7 dias
Uretrite gonocócica e demais infecções gonocócicas NÃO complicadas (uretra, colo do útero, reto e faringe)	Ceftriaxona 500mg, IM, dose única MAIS Azitromicina 500mg, 2 comprimidos, VO, dose única	-
Uretrite não gonocócica	Azitromicina 500mg, 2 comprimidos, VO, dose única	Doxiciclina 100mg, 1 comprimido, VO, 2x/ dia, por 7 dias
Uretrite por clamídia	Azitromicina 500mg, 2 comprimidos, VO, dose única	Doxiciclina 100mg, 1 comprimido, VO, 2x/ dia, por 7 dias
Retratamento de infecções gonocócicas	Ceftriaxona 500mg, IM, dose única MAIS Azitromicina 500mg, 4 comprimidos, VO, dose única	Gentamicina 240mg, IM MAIS Azitromicina 500mg, 4 comprimidos, VO, dose única
Uretrite por <i>Mycoplasma genitalium</i>	Azitromicina 500mg, 2 comprimidos, VO, dose única	
Uretrite por <i>Trichomonas vaginalis</i>	Metronidazol 250mg, 2 comprimidos VO, 2x/dia, por 7 dias	Clindamicina 300mg, VO, 2x/dia, por 7 dias
Infecção gonocócica disseminada (exceto meningite e endocardite)	Ceftriaxona 1g IM ou IV ao dia, completando ao menos 7 dias de tratamento MAIS Azitromicina 500mg, 2 comprimidos, VO, dose única	-
Conjuntivite gonocócica no adulto	Ceftriaxona 1g, IM, dose única	-

Legenda: VO: via oral; IM: intramuscular. Fonte: Adaptado de Brasil 2023

## 1.8 RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

Atualmente, a resistência bacteriana aos antimicrobianos é um dos problemas de saúde pública mais significativos em termos globais (LEUNG et al., 2011). Diversas bactérias, que eram sensíveis aos antimicrobianos comumente utilizados deixaram de responder a esses tratamentos (LEUNG et al., 2011). O desenvolvimento/seleção de resistência é um fenômeno natural acelerado pela pressão seletiva provocada pelo uso de antimicrobianos, porém tem se expandido rapidamente devido ao uso inadequado desses medicamentos. Existe uma clara correlação entre um maior consumo de antimicrobianos e níveis mais altos de resistência microbiana (LOUREIRO, 2016). A resistência aos antimicrobianos, pode se dar por mais de uma maneira: i) por característica intrínseca de algumas espécies de bactérias, que possuem a capacidade de resistir a um determinado antimicrobiano, devido a especificidades estruturais ou funcionais próprias da espécie (WAGLECHNER; WRIGHT et al., 2015); ii) por meio de aquisição, através de mutações que podem ocorrer durante a replicação celular ou via indução por agentes mutagênicos, tais como radiações ionizantes e não ionizantes, agentes alquilantes ou espécies reativas de oxigênio (Baptista, 2013); iii) pela incorporação de material genético exógeno de outros microrganismos que contenham genes de resistência, que são transmitidos por meio de mecanismos de transferência genética horizontal (FREIRES; JUNIOR, 2022; COSTA, 2016).

Em bactérias causadoras de ISTs, o problema da resistência aos antimicrobianos utilizados no tratamento demanda grande atenção, visto a crescente gama de espécies que estão desenvolvendo algum tipo de resistência (CDC., 2019). Por exemplo, a bactéria *N. gonorrhoeae*, uma preocupação de longa data, foi novamente destacada como uma ameaça urgente, enquanto *M. genitalium* foi incluído na nova categoria da Lista de Observação, pois existe grande preocupação com a rápida progressão de *M. genitalium* para uma infecção intratável (MANHART; JENSEN, 2020).

A resistência de *M. genitalium* aos antimicrobianos recomendados para seu tratamento, está aumentando e vem se tornando um desafio crescente no tratamento, sendo que em muitas regiões, a resistência aos macrolídeos ultrapassa os 50% (MANHART; JENSEN, 2020), enquanto a resistência às fluoroquinolonas atinge 20% (MACHALEK, et al., 2020), e há um aumento nos relatos de resistência às fluoroquinolonas (LI et al., 2017). Embora outros antimicrobianos, como a pristinamicina, tenham mostrado menor eficácia em seu uso generalizado (READ et al., 2018) em comparação com estudos observacionais iniciais (BISSESSOR et al., 2015), a verdadeira resistência não foi documentada *in vitro* e, ainda que

o organismo pareça ser suscetível às tetraciclinas *in vitro*, a eficácia clínica varia apenas entre 30% e 40% (MANHART; JENSEN, 2020; JENSEN; WAITES, 2017).

Também são preocupantes as crescentes taxas de resistência a outros antimicrobianos usados para tratar infecções por *M. genitalium* como, por exemplo, moxifloxacino (GAYDOS et al., 2019).

A resistência de *M. genitalium* é raramente detectada fenotipicamente, mas é deduzida pela constatação de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs - do inglês, *single nucleotide polymorphisms*), nos genes *parC* e *gyrA* para resistência a fluoroquinolonas e na subunidade 23S do rRNA para resistência a macrolídeos (PITT et al., 2018). As mutações estão associadas às posições 2058 e 2059 na região V no 23S rRNA, às posições S83 e D87 na topoisomerase IV *parC*, como também em alterações na subunidade *gyrA* da DNA girase (MONDEJA et al., 2016; TAGG et al., 2013; HAMASUNA et al., 2018). Bactérias resistentes a antimicrobianos são uma ameaça mundial e muitas infecções bacterianas, que anteriormente eram tratáveis, estão se tornando difíceis de tratar com os antimicrobianos conhecidos (FALK; ENGER, 2015; GETMAN et al., 2016; POND et al., 2014). Resistência em *M. genitalium* tem surgido em um ritmo relativamente rápido, contrastando com seu tamanho diminuto, possivelmente devido à falta de sistemas de reparo de DNA que facilita o desenvolvimento de mutações de resistência, ao contrário de outros patógenos de IST, como *Neisseria gonorrhoeae* (UNEMO, JENSEN, 2017).

## 1.9 SEQUENCIAMENTO

Para o uso de testes moleculares em diagnóstico, se faz necessário o conhecimento do genoma do patógeno alvo. Uma maneira é o sequenciamento direto de um gene ou região de interesse, utilizando o sequenciamento Sanger, por exemplo, técnica que permite a investigação de SNPs (SANGER et al., 1977). Assim, compreender a sequência genômica do organismo facilita essa investigação, tendo aplicabilidade na identificação de mecanismos de resistência a antimicrobianos, estudos de epidemiologia molecular, filogenética, dinâmica de transmissão e estimativa da taxa de mutação (HERNÁNDEZ et al., 2020; HASMAN et al., 2014).

Outras técnicas de sequenciamento vem sendo aplicadas em diversos estudos, sendo que o sequenciamento de genoma completo (WGS, do inglês *Whole Genome Sequencing*) revolucionou os estudos na genômica microbiana, em especial para organismos fastidiosos (BATOOL; PENA, 2023; DULANTO CHIANG; DEKKER, 2020). O WGS tornou-se o método para investigação de diversos patógenos tendo grande importância em pormenorizar e

melhorar a compreensão sobre a evolução microbiana, eventos de transmissão, surtos e vigilância de resistência a antimicrobianos (BACHMANN et al., 2018).

Uma das aplicações do WGS é o sequenciamento do material genético de todos os microrganismos presentes em uma amostra clínica sem a necessidade da realização de cultura, a partir de análises de metagenômica, o que levou a caracterização e identificação de agentes infecciosos emergentes (GOLDBERG et al., 2015). A metagenômica está se tornando rapidamente uma ferramenta poderosa tanto para pesquisas em microbiologia quanto para aplicações clínicas, devido à vasta quantidade de informações que pode fornecer (CHO; BLASER, 2012). No passado, o volume de sequenciamento de DNA necessário para analisar completamente uma amostra, como o microbioma intestinal humano, tornava inviável a utilização rotineira da metagenômica, especialmente para diagnósticos (GOLDBERG et al., 2015). No entanto, o aumento no volume de sequenciamento e a queda nos preços para realizar esta abordagem, estão permitindo que a metagenômica se torne cada vez mais acessível aos estudos clínicos. Um dos aspectos interessantes da metagenômica é sua natureza não direcionada de sequenciamento, pois uma vez obtida, a sequência de DNA pode ser explorada para responder a várias questões de interesse, como a presença de patógenos, vias metabólicas, genes de resistência antimicrobiana, interações entre microrganismos e composição geral da comunidade microbiana (MULCAHY-O'GRADY; WORKENTINE, 2016). Atualmente, o WGS pode ser utilizado para deduzir a resistência antimicrobiana e possui potencial para fornecer dados rápidos, consistentes e precisos de cada fenótipo de resistência conhecido para um determinado microrganismo (GOLDBERG et al., 2015).

Ainda, é importante destacar o papel da análise bioinformática especializada caso a metagenômica seja utilizada no contexto clínico, isso envolve não apenas o desenvolvimento de novas ferramentas e algoritmos, mas também a aplicação adequada dessas ferramentas e a interpretação dos resultados (PEREIRA; OLIVEIRA; SOUSA, 2020). À medida que a tecnologia de sequenciamento continua a evoluir rapidamente, o maior desafio para a metagenômica não será mais o sequenciamento em si, mas sim a necessidade de analistas qualificados para analisar os dados e extrair informações clinicamente relevantes. Por outro lado, a metagenômica representa o material genético coletivo de todos os genomas presentes na amostra e fornece uma visão do potencial funcional da população microbiana (GOLDBERG et al., 2015; HERNÁNDEZ et al., 2020).

Devido à escassez de estudos de genômica epidemiológica no Brasil sobre *M. genitalium*, pouco se conhece sobre os genomas das bactérias circulantes no país.

Principalmente devido às características desse patógeno, seu difícil cultivo, e muitas vezes diagnóstico, e a abordagem sindrômica adotada em muitos casos de ISTs, faz-se necessário estudos que permitam a visão do perfil de resistência em todas as regiões do país de forma que as recomendações de tratamento possam ser baseadas em dados epidemiológicos nacionais. Além disso, de acordo com o perfil de resistência observado, pode ser necessário recomendar a testagem para *M. genitalium*, minimamente nos casos de recorrência de sintomas após tratamento da uretrite para *N. gonorrhoeae* e *Chlamydia trachomatis*. O tratamento baseado nos sintomas com ceftriaxona e azitromicina, preconizado universalmente no país para síndrome do corrimento uretral pode não cobrir os casos de infecção por *M. genitalium* resistentes à azitromicina. Além disso, o presente estudo teve como ponto de partida o crescente número de *M. genitalium* identificados em estudos realizados no Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia (LBMMS/HU/CCS/UFSC) oriundos de dois estudos de nacionais que demandaram a necessidade de se investigar o fenômeno de resistência relatado internacionalmente.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar geneticamente os isolados de *M. genitalium* e possíveis coinfeções em amostras clínicas, provenientes das cinco de regiões brasileiras

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em genes de interesse, comparando com genomas de referência de *M. genitalium*;
- Sequenciar por meio de metagenoma amostras clínicas detectadas para *M. genitalium* de cinco diferentes regiões do Brasil;
- Avaliar a comunidade de microrganismos presentes em amostras de secreção uretral em pacientes com infecção por *M. genitalium*;



## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 LOCAL DE ESTUDO E AMOSTRAGEM

O estudo foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia (LBMMS/HU/CCS/UFSC) e no Laboratório de Bioinformática (LB/CCB/MIP/UFSC). O LBMMS possui um banco de amostras clínicas (*swab* de secreção uretral masculino e *swab* vaginal de gestantes) oriundas de dois projetos de âmbito nacional: “Infecções de transmissão sexual: Vigilância no Brasil da Etiologia das Uretrites e das Úlceras Genitais e Análise da Resistência aos Antimicrobianos” (CAAE: 83053818.4.0000.0121) e “Implantação piloto da rede de serviços para acesso a testes de biologia molecular para detecção de CT/NG/MG/TV em gestantes” (CAAE: 52622421.5.0000.012). Desses projetos, foram selecionadas 50 amostras de secreção uretral masculina e 68 amostras de *swab* vaginal de gestantes, coletadas entre 2018 e 2023 nas quais *M. genitalium* foram detectados. As amostras de *swabs* masculino estão armazenadas em meio de transporte universal UTM-RT, Copan<sup>®</sup>, a -80°C. As amostras de *swab* feminino estão armazenadas em meio de transporte HOLOGIC<sup>®</sup>, a -80°C. Todas as amostras foram codificadas e desvinculadas de qualquer identificação do paciente.

### 5.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO DAS AMOSTRAS.

#### 5.2.1 Amostras para pesquisa dos alvos de interesse (23S rRNA, *parC* e *gyrA*)

Foram selecionadas amostras de secreção vaginal de gestantes detectadas para *M. genitalium*, independente da presença de coinfeção e que abrangessem as cinco grandes regiões brasileiras. Estas amostras foram submetidas previamente aos exames de biologia molecular Aptima Combo 2, Aptima MG e Aptima TV (HOLOGIC<sup>®</sup>, San Diego, EUA) para detecção de *Chlamydia trachomatis/Neisseria gonorrhoeae*, *Mycoplasma genitalium* e *Trichomonas vaginalis*, respectivamente. Os testes baseiam-se na amplificação mediada por transcrição (TMA), a qual amplifica, de maneira isotérmica, alvos de RNA ribossômico baseados na atividade enzimática da transcriptase reversa e da RNA polimerase dependente de DNA e, na capacidade de oligonucleotídeos de DNA complementares por hibridização específica para detectar a presença ou ausência dos alvos, por meio da plataforma automatizada Panther (HOLOGIC<sup>®</sup>, San Diego, EUA). O mesmo critério foi utilizado para as amostras de *swab* uretral masculino. Nestas, a detecção do patógeno foi realizada por PCR em tempo real

utilizando kit Allplex™ STI Essential Assay (Seegene, Seul, Coreia do Sul). Este detecta simultaneamente sete patógenos (*Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*, *Ureaplasma parvum*, *Ureaplasma urealyticum*) incluindo *M. genitalium*. Utilizando para a tecnologia DPO (do inglês- *Dual Priming Oligonucleotide*), TOCE (do inglês- *Tagging Oligonucleotide Cleavage and Extension*) e MuDT (do inglês- *Multiple Detection Temperature*), possibilitando a detecção de vários alvos em um mesmo canal.

Amostras de secreção uretral masculina selecionadas de acordo com os critérios para pesquisa dos genes de resistência estão descritas nas tabelas 1 e 2. Amostras de *swab* vaginal de gestantes selecionadas de acordo com os critérios para pesquisa dos genes de resistência estão descritas nas tabelas 2.

Tabela 1. Amostras de *swab* uretral masculina, patógenos identificados e regiões de origem

Identificação da amostra	Ano da coleta	Patógenos detectados	Identificação da amostra	Ano da coleta	Patógenos detectados
BH 16	2019	UU, NG, MG, CT	MA 88	2019	MG, UP
BH 42	2019	MG	MA 90	2019	MG
BH 69	2019	NG, MG	POA 17	2019	MG
BH 70	2019	NG, MG	POA 23	2019	MG
BH 78	2019	MG	POA 28	2019	MG
CTB 11	2019	MG	POA 32	2019	MG
CTB 15	2019	NG, MG	POA 35	2019	UU, MG
CTB 35	2019	NG, MG	REC 21	2019	NG, MH, MG, CT
DF 19	2019	UU, NG, MG, CT	REC 59	2019	MG
DF 47	2019	UU, MG	RIP 27	2019	NG, MG
DF 50	2019	MG	RIP 37	2019	NG, MG
FL 06	2019	MG	RIP 50	2019	NG, MG
FL 07	2019	MG	RIP 74	2019	MG
FL 29	2020	UU, MG	SAL 09	2019	MG, UP
FL 32	2020	MG	SAL 33	2019	MG
FL 39	2020	MG, CT	SAL 39	2019	MG
FL 280	2023	MG	SAL 48	2019	MG
FL 284	2023	UU, NG, MG	SAL 68	2019	MG
FL 259	2023	MG	SAL 80	2019	MG, CT
FL 4063	2023	MG, CT	SAL 97	2019	MG
MA 46	2019	NG, MG	SAO 42	2019	MG
MA 47	2019	NG, MG	SJC 04	2018	MG
MA 49	2019	MG	SJC 08	2018	MG
MA 78	2019	MG, CT	SJC 19	2019	MG, CT
MA 79	2019	MG, NG	SJC 30	2019	MG, CT

**Patógenos identificados:** CT *Chlamydia trachomatis*, MG *Mycoplasma genitalium*, MH *Mycoplasma hominis*, NG *Neisseria gonorrhoeae*, UP *Ureaplasma parvum*, UU *Ureaplasma urealyticum*. SU: secreção uretral. BH Belo Horizonte, CTB Curitiba, DF Distrito Federal, FL Florianópolis, MA Manaus, POA Porto Alegre, REC Recife, RIP Ribeirão Preto, SAL Salvador, SAO São Paulo, SJC São José dos Campos.

Tabela 2. Amostras de *swab* vaginal de gestantes, patógenos identificados e regiões de origem

Identificação da amostra	Ano da coleta	Patógenos detectados	Identificação da amostra	Ano da coleta	Patógenos detectados
BSB 01	2021	MG, CT	GRU 12251	2021	MG
BSB 08	2021	MG	GRU 13166	2022	MG
BSB 09	2021	MG, CT	GRU 13169	2022	MG
BSB 12	2021	MG	GRU 13174	2022	MG
BSB 70	2021	MG, CT	PEL 59	2022	MG
BSB 73	2021	MG, CT	PEL 102	2021	MG
BSB 117	2022	MG	PEL 107	2021	MG
BSB 137	2022	MG, TV	PEL 123	2021	MG
BSB 143	2022	MG	PEL 139	2021	MG, CT
CON 002	2021	MG, TV	PEL 149	2021	MG
CON 12	2022	MG, CT	RBN 16	2021	MG
CON 110	2022	MG	RBN 33	2021	NG, MG
CON 126	2022	MG	RBN 73	2021	MG
CUR 83	2022	MG, CT	RBN 85	2021	MG, TV
CUR 120	2021	MG, TV	RBN 100	2021	MG, TV, CT
CUR 88	2022	MG, CT	RBN 115	2021	MG, TV, CT
CUR 147	2021	MG, CT	RBN 118	2021	MG, TV
CUR 178	2021	MG, CT	RBN 139	2021	MG, TV
FL 16	2022	MG	RBN 160	2021	MG, TV
FL 32	2022	MG	REC 28	2021	MG
FOR 48	2021	MG, TV, CT	REC 38	2022	MG, TV
FOR 115	2022	MG	REC 71	2021	MG
FOR 117	2022	MG, TV	REC 84	2021	MG
FOR 121	2022	NG, MG	REC 134	2021	MG
FOR 133	2022	MG	REC 193	2022	MG, TV
FOR 140	2022	MG, TV	VIT 43	2022	MG
GRU 2013	2021	MG	VIT 52	2022	MG, TV
GRU 2020	2021	MG	VIT 88	2022	MG
GRU 2021	2021	MG, TV	VIT 96	2022	MG, CT
GRU 2024	2021	MG, TV	VIT 97	2022	MG, CT
GRU 3027	2021	MG	VIT 100	2022	MG, CT
GRU 6072	2021	MG, TV	VIT 104	2022	MG, TV
GRU 6075	2021	MG, CT	VIT 124	2022	MG, CT
GRU 9116	2021	MG, CT	VIT 164	2022	MG, CT

**Patógenos identificados:** CT *Chlamydia trachomatis*, MG *Mycoplasma genitalium*, NG *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*. SV swab vaginal. BSB Brasília, CON Contagem, CUR Curitiba, FL Florianópolis, GRU Guarulhos, PEL Pelotas, RBN Ribeirão das Neves, REC Recife, VIT Vitória

### 5.2.2 Extração do material genético para sequenciamento dos alvos de interesse

As amostras, de *swab* vaginal em meio HOLOGIC® e secreção uretral masculina em meio UTM-RT, Copan®, foram descongeladas, agitadas em vortex por um minuto antes da extração do material genético. Para a extração foi utilizado o Kit de extração ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System (Promega, Madison, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

### 5.2.3 Amplificação dos alvos de interesse

Para pesquisar SNPs com associação à resistência antimicrobiana a macrolídeos e fluoroquinolonas, foram realizadas PCRs convencionais e do tipo *NESTED*, para amplificação dos três alvos (*gyrA*, *parC* e 23S rRNA) conforme PITT e colaboradores (2018). A sequência dos iniciadores para os três alvos, e o tamanho dos produtos gerados, estão descritos na Tabela 3. A visualização dos produtos da PCR foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio, e os produtos foram visualizados no transiluminador ImageQuant™ LAS 500 (GE Healthcare Bio-Sciences AB). As amostras em que não foi possível a visualização dos produtos, foram submetidas a uma segunda reação (*NESTED*) e novamente visualizadas por eletroforese em gel de agarose conforme descrito previamente.

Tabela 3. Descrição dos alvos e sequência de iniciadores utilizados para amplificação e sequenciamento.

Alvos	Iniciadores	Descrição	Sequência 5'–3'	Tamanho dos produtos (bp)
23S rRNA	23S F	23S rRNA F	AGTGAACGAGTGATCAAGTAGC	785
	23S R	23S rRNA R	TCTAAATACGATTTCCAACCG	
	F1-Mg	23S rRNA nested F	GAAGGAGGTTAGCAATTTATTGC	266
	R1-Mg	23S rRNA nested R	TTCTCTACATGGTGGTGTTTTG	
<i>gyrA</i>	GyrA F	<i>gyrA</i> F	GCTAGAGATGGACTTAAACCAG	251
	GyrA R	<i>gyrA</i> R	TGTGCAGCAGGTCTATCACC	
	GyrA F	<i>gyrA</i> nested F	TATGGTGCTTATATTGGTGGC	151
	GyrA R	<i>gyrA</i> nested R	ATCTTAATGAAAAGTCTTGAGCC	
<i>parC</i>	ParC F	<i>parC</i> F	CTTTACCTGATCTAAGAGATGGG	251
	ParC R	<i>parC</i> R	ATTATCCCCATCCACTGAACC	
	ParC F	<i>parC</i> nested F	GCTTAAAACCCACCACTCC	139
	ParC R	<i>parC</i> nested R	GTTGTTTCAGTTGTTCTTTCAGC	

Fonte: Adaptado de PITT e colaboradores., 2018.

As reações foram adaptadas de PITT e colaboradores (2018). A primeira PCR para o 23S rRNA foi padronizada usando master mix com 0,4  $\mu$ M de cada iniciador, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, tampão Green GoTaq® Flexi 1X, 200  $\mu$ M cada de dATP, dTTP, dCTP e dGTP, 5 U de GoTaq® G2 Hot Start Taq Polymerase (Promega, Madison, EUA) e 5  $\mu$ L do material genético extraído. A mistura foi homogeneizada suavemente, centrifugada brevemente e incubada em termociclador Applied Biosystems™ 2720 (Thermo Fisher Scientific®) nos seguintes ciclos de temperaturas: 94°C por 10 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C por 30s, 72°C por 1 min, e um ciclo final de 72°C por 10 min.

A primeira PCR para os genes *gyrA* e *parC* foi padronizada usando 0,4  $\mu$ M de cada iniciador, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, tampão Green GoTaq® Flexi 1X, 200  $\mu$ M cada de dATP, dTTP, dCTP e dGTP, 2,5 U de GoTaq® G2 Hot Start Taq Polymerase (Promega®) 5  $\mu$ L do material genético extraído. A mistura foi homogeneizada suavemente, centrifugada brevemente e incubada em termociclador Applied Biosystems™ 2720 (Thermo Fisher Scientific®) nos seguintes ciclos de temperaturas: 94°C por 10 min, seguido de 40 ciclos de 94°C por 30s, 57°C por 30s, 72°C por 1 min, e um ciclo final de 72°C por 10 min.

A segunda PCR para o 23S rRNA foi padronizada usando 0,4  $\mu$ M de cada iniciador, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, tampão Green GoTaq® Flexi 1X, 200  $\mu$ M cada de dATP, dTTP, dCTP e dGTP, 5 U de GoTaq® G2 Hot Start Taq Polymerase (Promega, Madison, EUA) e 1  $\mu$ L do produto da primeira PCR. A mistura foi homogeneizada suavemente, centrifugada brevemente e incubada em termociclador Applied Biosystems™ 2720 (Thermo Fisher Scientific®) nos seguintes ciclos de temperaturas: 94°C por 10 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 min, 55°C por 30s, 72°C por 1 min, e um ciclo final de 72°C por 10 min.

A segunda PCR para os genes *gyrA* e *parC* foi padronizada usando 0,4  $\mu$ M de cada iniciador, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, tampão Green GoTaq® Flexi 1X, 200  $\mu$ M cada de dATP, dTTP, dCTP e dGTP, 2,5 U de GoTaq® G2 Hot Start Taq Polymerase (Promega, Madison, EUA) e 1  $\mu$ L de produto da primeira PCR. A mistura foi homogeneizada suavemente, centrifugada brevemente e incubada em termociclador Applied Biosystems™ 2720 (Thermo Fisher Scientific®) nos seguintes ciclos de temperaturas: 94°C por 1 min, seguido de 40 ciclos de 94°C por 30s, 57°C por 30s, 72°C por 1 min, e um ciclo final de 72°C por 10 min.

### 5.2.4 Sequenciamento Sanger

Os produtos de PCR dos três alvos (23S rRNA, *parC* e *gyrA*) foram purificados utilizando o kit *High Pure Product Purification Kit* (Roche, Basileia, Suíça) conforme instruções do fabricante e quantificados no equipamento NanoVue Plus™ (Biochrom). Em cada poço de uma placa de 96 poços, foram pipetados de 30 a 100 ng do produto amplificado com 2,5 pmol de iniciador senso ou antissenso. As placas foram devidamente seladas e acondicionadas para o transporte. O sequenciamento foi realizado por meio da plataforma ABI 3.500 (Applied Biosystems) pela empresa ACTGene Análises Moleculares (Rio Grande do Sul - Brasil).

### 5.2.5 Análise do sequenciamento Sanger

Os eletroferogramas das sequências obtidas foram visualizados no programa Chromas (Technelysium; disponível em <http://technelysium.com.au/wp/chromas/>). As sequências foram filtradas e aparadas (no início e no final de cada sequência) para excluir bases com qualidade Phred menor de 20. A montagem dos fragmentos foi realizada utilizando o programa CAP3 (disponível online: <http://doua.prabi.fr/software/cap3>). O alinhamento com a cepa referência de *M. genitalium* G37 (GenBank: L43967.2), foi realizado utilizando o programa MEGA 10.2 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) (TAMURA et al., 2021), e foi realizada a inspeção visual das mutações encontradas.

## 5.3 AMOSTRAS PARA SEQUENCIAMENTO DO GENOMA TOTAL

Foram selecionadas 29 amostras de *swab* uretral masculino detectadas para *M. genitalium* que abrangessem as cinco grandes regiões brasileiras, preferencialmente sem outro patógeno detectado e com valores de CT (CT do inglês *Cycle Threshold*) menores para *M. genitalium* (Tabela 5). As amostras estão armazenadas em meio de transporte universal UTM-RT, Copan®, em ultra-freezer a -80°C. E a detecção prévia do patógeno foi realizada também por PCR em tempo real utilizando kit *Allplex™ STI Essential Assay* (Seegene, Seul, Coreia do Sul). A tabela 4 representa as amostras de *swab* uretral masculino, selecionadas de acordo com os critérios, para sequenciamento metagenômico.

Tabela 4. Amostras de secreção uretral masculina, patógenos identificados e regiões de origem.

Identificação da amostra	Ano da coleta	Patógenos detectados	Identificação da amostra	Ano da coleta	Patógenos detectados
POA 64	2019	MG	NAT 16	2019	MG, UP
BH 78	2019	MG	NAT 17	2020	MG
CTB 66	2020	NG, MG	POA 39	2019	MG
DF 64	2019	NG, MG	REC 21	2019	MG
FL 06	2019	MG	RIP 89	2019	MG
FL 07	2019	MG	SAL 39	2019	MG
FL 36	2020	NG, MG	SAO 51	2019	UU, MG
FL 39	2020	NG, MG	SAO 76	2019	NG, MH, MG, CT
MAN 77	2019	UU, NG, MG, CT	SAO 94	2019	MG
NAT 01	2019	MG	SJC 29	2019	MG

Legenda: CT *Chlamydia trachomatis*, MG *Mycoplasma genitalium*, NG *Neisseria gonorrhoeae*, UP *Ureaplasma parvum*, UU *Ureaplasma urealyticum*. SU: secreção uretral. BH Belo Horizonte, CTB Curitiba, DF, Distrito Federal, FL Florianópolis, MAN Manaus, NAT Natal, POA Porto Alegre, REC Recife, SAL Salvador, SAO São Paulo, SJC São José dos Campos.

### 5.3.1 Extração do material genético para metagenoma

As amostras de *swab* uretral masculino, armazenadas em UTM-RT, Copan<sup>®</sup>, foram descongeladas e agitadas em vortex por um minuto antes da extração do material genético. A extração foi realizada com o Kit de extração *HostZERO Microbial DNA Kit* (Zymo, Orange, EUA) para reduzir a quantidade de DNA do hospedeiro (*Homo sapiens*). O protocolo de extração foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. Após extração, o material genético foi quantificado no equipamento NanoVue Plus<sup>™</sup> (Biochrom) e preparado para o envio até a empresa prestadora do serviço conforme orientações por ela recomendadas.

### 5.3.2 Sequenciamento metagenoma das amostras clínicas

O sequenciamento das amostras clínicas de *swab* uretral masculino, foi realizado na empresa NGS Soluções Genômicas (São Paulo, Brasil). As bibliotecas foram montadas com o kit *Illumina DNAPrep Kit*. As bibliotecas foram sequenciadas no NextSeq 2000 em corridas 2x100 pb com média de 16 milhões de leituras pareadas.



### 5.3.3 Metagenoma

Após a obtenção dos dados brutos do sequenciamento, foi verificada a qualidade das leituras por meio do programa FastQC versão 0.11.9 e agregados utilizando o programa MultiQC versão 1.16 (EWELS et al., 2016). Os adaptadores e as leituras com baixa qualidade foram removidos utilizando Trimmomatic versão 0.40 (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014) e a filtragem do DNA do hospedeiro, *Homo sapiens*, por meio do programa Bowtie2 versão v2.5.1 (LANGMEAD; SALZBERG, 2012), utilizando o genoma de referência *Homo sapiens* (GRCh38.p14 GenBank: NC\_000001.11). O arquivo gerado, após filtragem das sequências do DNA do hospedeiro, foi modificado de Sequence Alignment/Map (sam) para um arquivo binário (bam). Então, foram separadas as leituras não mapeadas com o DNA do hospedeiro, indexando o arquivo e criando a partir do arquivo indexado, dois novos arquivos fastq utilizando o pacote SAM Tools versão 1.10 para tal.

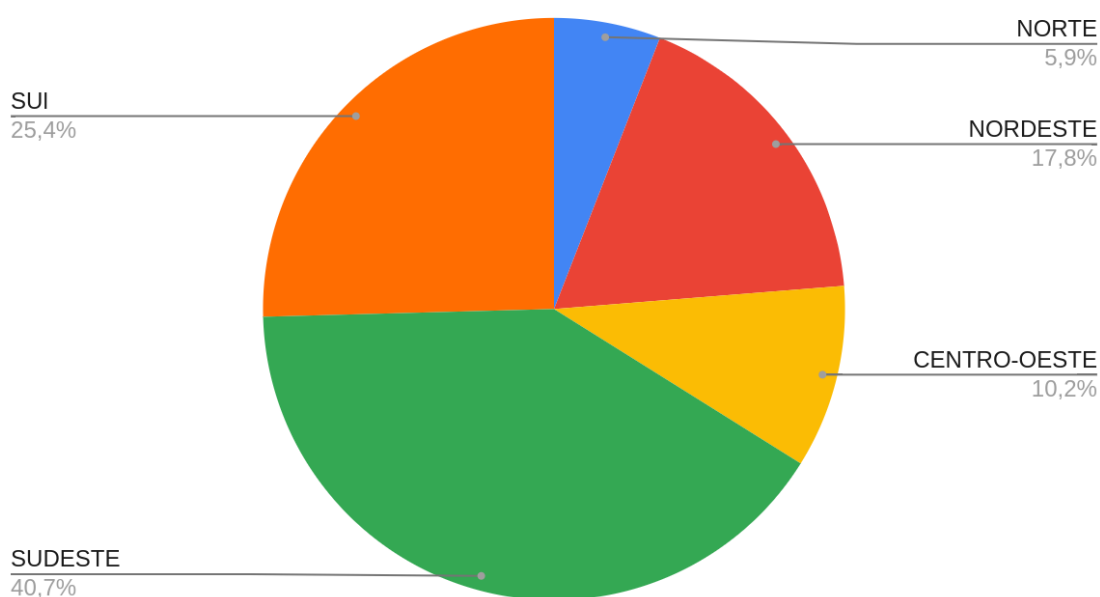
Os arquivos fastq de cada amostra foram submetidos ao programa Kraken2 versão 2.1.2 (WOOD et al., 2019) utilizando o banco de dados k2 standart\_20230605 (disponível em: <https://benlangmead.github.io/aws-indexes/k2>, acesso em 10/08/2023). E a construção dos e visualização dos gráficos de abundância com pacotes do programa estatístico R versão 4.3.1. A montagem das leituras foi realizada utilizando o programa SPAdes versão 3.15.0, com a pipeline metaSPAdes (PRJIBELSKI et al., 2020). Os *scaffolds*, resultantes da montagem metagenoma, foram submetidos ao banco de dados CARD (*The Comprehensive Antimicrobial Resistance Database*) versão 3.1.1 (disponível em: <https://card.mcmaster.ca/>, acesso em 20/08/2023), para pesquisa de genes e mutações relacionadas à resistência microbiana presentes nas amostras clínicas (MCARTHUR et al., 2013).

## 6 RESULTADOS

### 6.1 NÚMEROS DE AMOSTRAS POR REGIÃO BRASILEIRA

O sequenciamento incluiu amostras oriundas das cinco regiões brasileiras: Sul, Sudeste, Centro-Oeste, Nordeste e Norte. Dois tipos de amostras, secreção uretral e *swab* vaginal, foram incluídas no estudo para pesquisa dos alvos de interesse: 30 (25,4%) amostras da região Sul, 48 (40,7%) amostras da região Sudeste, 21 (10,2%) amostras da região Centro-oeste, 21 (17,8%) amostras da região Nordeste e 7 (5,9%) amostras da região Norte (Figura 5). Sendo a região Sudeste com maior número de amostras incluídas no estudo e a região Norte com o menor número de amostras.

Figura 5: Porcentagem do total de amostras incluídas no estudo por região brasileira.



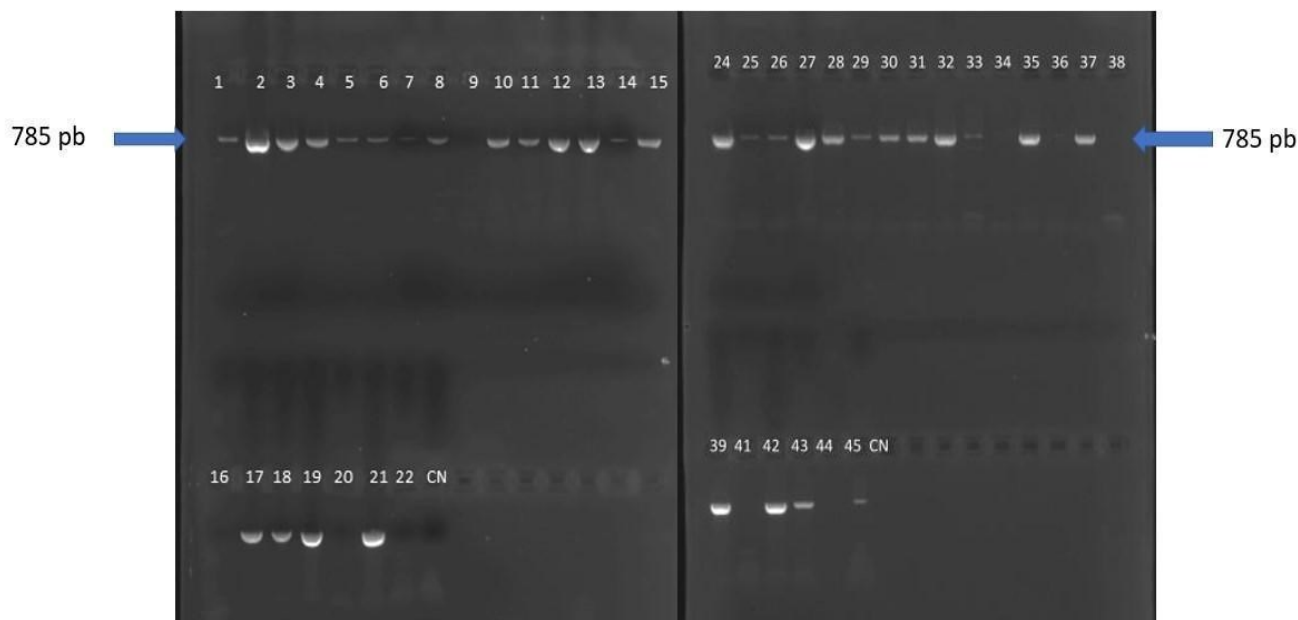
Fonte: autor.

### 6.2 SEQUENCIAMENTO SANGER

Foram utilizadas 118 amostras clínicas positivas para *M. genitalium*, de acordo com os critérios de escolha descritos anteriormente, totalizando 354 reações de PCR para os três alvos de interesse. Nas reações de PCR em que não foi observado o produto em gel de agarose (Figura 6), foi realizada uma segunda reação de PCR (*Nested*) para se ter material genético suficiente para o sequenciamento. Das 118 amostras positivas para *M. genitalium*, foi possível sequenciamento bem-sucedido de 98 amostras em pelo menos um dos três alvos, totalizando

243 alvos, sendo: 79 para 23S rRNA, 82 para *parC* e 82 para *gyrA*. Destas, 42 amostras tiveram os três alvos sequenciados com sucesso. O maior número de amostras sem amplificação dos alvos, foram as de *swab* vaginal, cuja detecção de *M. genitalium* foi realizada por metodologia TMA, a qual tem uma sensibilidade maior para detecção dos patógenos, podendo, por isso, detectar quantidades muito pequenas do patógeno.

Figura 6. GEL de agarose com os produtos da PCR do alvo 23S rRNA.



Fonte: autor.

Foram excluídas do estudo as sequências com baixa qualidade (Phred < 20), ou que na visualização do eletroferograma se observou muitas bases duvidosas ou com qualidade inferior à estabelecida.

Na subunidade ribossomal 23S rRNA, foram encontradas mutações, assim como também foram encontradas no gene *parC*. Já em *gyrA*, nenhuma mutação que confere resistência foi encontrada (Tabela 6). As mutações foram encontradas nos dois tipos de amostras, tanto em secreção uretral masculina quanto nas de *swab* vaginal, sendo mais comumente encontradas nas amostras de secreção uretral masculina.

As mutações associadas à resistência aos macrolídeos nas posições 2058 e 2059 (numeração de *Escherichia coli*) do 23S rRNA foram detectadas em 40,5% (32/79) das amostras, sendo A2058G (14/79), A2059G (14/79) e A2058T (4/79). Mutações associadas à resistência aos macrolídeos foram observadas em todas as regiões brasileiras: Sul (12/20), Sudeste (10/27), Nordeste (5/17), Centro-Oeste (4/8) e Norte (1/7). Também foram observadas

mutações no gene *parC*: G248A (1/82), G259T ou G259A (4/82) (numeração de *M. genitalium*). De todas as amostras, duas possuem mutações em dois alvos, tanto no 23S rRNA (A2058G) quanto no gene *parC* (G259T e G248A). Nenhuma mutação relacionada com resistência foi observada no gene *gyrA*.

Tabela 5. Mutações que conferem resistência aos antimicrobianos macrolídeos e fluoroquinolonas

Alvo	Mutação	Troca de aminoácido	Tipo de amostra	Total
rRNA 23S	A2058G ( <i>E.c.</i> )	-	SV e SU	14
	A2058T9 ( <i>E.c.</i> )	-	SV e SU	4
	A2059G ( <i>E.c.</i> )	-	SV e SU	14
<i>parC</i>	C234T	Pro62 - Ser	SV e SU	8
	A247C	Ser83 - Arg	SV	1
	G248A	Ser83 - Asn	SU	1
	G259A	Asp87 - Asn	SV e SU	2
	G259T	Asp87 - Tyr	SU	2
<i>gyrA</i>	G237T	-	-	-
	C270T	-	-	-
	G285A	-	-	-
	G285C	-	-	-

Legenda: SV: *swab* vaginal, SU: Secreção uretral. *E.c.*: *Escherichia coli*

### 6.3 COMPARAÇÃO DAS MUTAÇÕES ENCONTRADAS EM SV E SU.

Foram encontradas mutações que conferem resistência aos macrolídeos e às fluoroquinolonas nas amostras oriundas dos dois sítios anatômicos de coleta. Em amostras de *swab* uretral masculino foram encontradas mutações que conferem resistência a macrolídeos e fluoroquinolonas, com SNPs na subunidade ribossomal 23S rRNA e no gene *parC*. Estas também foram encontradas nas amostras de *swab* vaginal, porém menos frequentes, conforme descrito nas tabelas 6 e 7. Em nenhum dos dois tipos de amostras foram encontradas mutações no gene *gyrA* que conferem resistência.

Tabela 6. SNPs encontrados na subunidade 23S rRNA.

	SU		SV		Total SU e SV	
	Total 43		Total 37		Total 79	
<b>Selvagem</b>	20	46 %	28	75,6%	48	60,7%
<b>A2058G</b>	9	20,9 %	5	13,5%	14	17,7%
<b>A2059G</b>	12	27,9 %	2	5,4%	14	17,7%
<b>A2058T</b>	2	4,6%	2	5,4%	4	5%

Legenda: SNP Polimorfismo de Nucleotídeo Único; SU secreção uretral; SV *swab* vaginal.

Tabela 7. SNPs encontrados no gene *parC*.

	SU		SV		Total SU e SV	
	Total 50		Total 32		Total 82	
<b>Selvagem</b>	46	92%	30	93,7%	76	92,6%
<b>A247C</b>	-	-	1	3,1%	1	1,2%
<b>G258A</b>	1	2%	0	-	1	1,2%
<b>G259T</b>	2	4%	0	-	2	2,4%
<b>G259A</b>	1	2%	1	3,1%	2	2,4%

Legenda: SNP Polimorfismo de Nucleotídeo Único; SU secreção uretral; SV *swab* vaginal



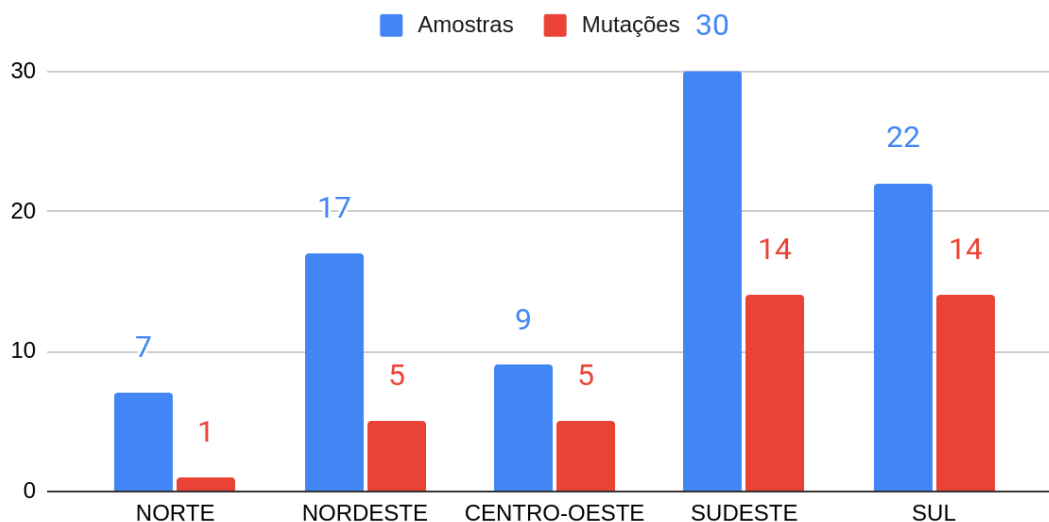
A figura 7 exibe todas as amostras que tiveram pelo menos uma mutação encontrada. Não houve nenhum agrupamento relevante por ano de coleta ou por região. As amostras BH42 e DF47 apresentaram duas mutações, que conferem resistência a macrolídeos e fluoroquinolonas. BH-42 apresentou mutações nas regiões: G259T em *parC* e A258G na subunidade 23S rRNA. Já DF47 apresentou mutações nas regiões: G248A em *parC* e A258G na subunidade 23S rRNA. Ambas as amostras são de *swab* uretral masculino.

As amostras de *swab* vaginal VIT164, REC38, GRU12151 e BSB01 e as amostras de *swab* uretral masculino SAL39, POA-35, SAL09 e FL06 apresentaram mutações no gene *parC* na região C234T, sendo que a amostra FL-06 também apresentou duas mutações, em *parC* na região C234T e na subunidade 23S rRNA na região A259G. A mutação no gene *parC* na região C234T não está relacionada a nenhuma resistência antimicrobiana.

A grande maioria das mutações foram encontradas na subunidade 23S rRNA, sendo: 14 delas na região A258G, 14 na região A259G, 4 na região A258T. Já no gene *parC* encontramos seis (6) mutações que conferem resistência aos antimicrobianos, sendo uma na região A247C, uma na região G248A, duas em G259A e duas na região G259T. A mutação encontrada que não está relacionada com nenhum tipo de resistência na região C234T no gene *parC*, foi encontrada em oito amostras.

Nas amostras com sequenciamento bem-sucedido e com mutações encontradas por região (Figura 8), tivemos: Sul (12/20), Sudeste (10/27), Nordeste (5/17), Centro-Oeste (4/8) e Norte (1/7). Sendo que na região Sul 60% das amostras apresentaram mutação que confere resistência aos antimicrobianos, seguido pelo Sudeste 37%, Centro-oeste 50%, Nordeste 29,5% e Norte com 14,3%.

Figura 8. Número de amostras com sequenciamento bem sucedido e com mutação detectada por região.



Fonte: Autor.

## 6.4 SEQUENCIAMENTO WGS

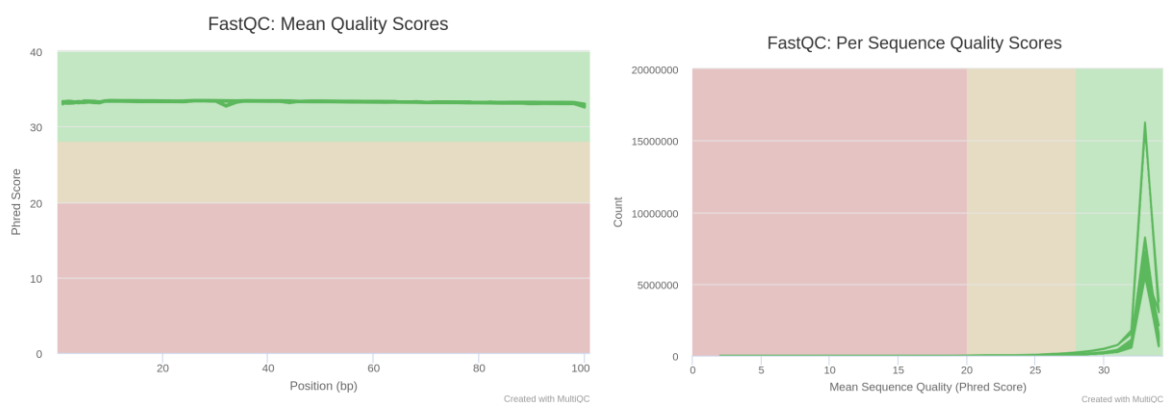
Das 29 amostras clínicas detectadas para *M. genitalium*, enviadas para o sequenciamento completo, em 20 delas foi possível realizar o sequenciamento. As outras nove amostras não passaram no controle de qualidade ou não obtiveram material genético suficiente para preparação da biblioteca, e não foram sequenciadas.

### 6.4.1 Qualidade do Sequenciamento metagenoma

Após a realização da trimagem e remoção dos adaptadores do sequenciamento, as amostras exibiram valores de qualidade Phred acima de 30 (Figura 9), com uma média de qualidade de 32 em toda a extensão dos *reads*. A média do conteúdo de GC foi de 32. A porcentagem de chamadas de base N foi de 32. A avaliação de qualidade foi conduzida pelo programa MultiQC versão 1.16, que agregou os resultados obtidos pelo programa FastQC versão 0.11.9 gerando a média deles.



Figura 9. Resultados múltiplos da qualidade do sequenciamento WGS.



Fonte: autor.

### 6.4.2 Filtragem das leituras

O mapeamento e separação do genoma humano, presente nas leituras, foi realizado com o programa Bowtie2 (versão v2.5.1). A tabela 8 mostra o número de leituras antes e após a remoção do DNA humano, com a porcentagem das leituras para utilização nas próximas etapas.

Tabela 8. Processamento do resultado das amostras clínicas.

<b>Amostras</b>	<b>Total de leituras (reads)</b>	<b>Após filtro<sup>1</sup></b>	<b>Após filtro<sup>1</sup> (%)</b>	<b>Leituras perdidas</b>	<b>Leituras de bactérias</b>	<b>Leituras de bactérias (%)<sup>2</sup></b>
SJC29	8290655	156980	1.8 %	8133675	37074	23.6 %
BH78	7771166	50603	0.6%	7720563	147	0.29 %
CTB66	9211614	97106	1.0%	9114508	14805	0.16 %
DF64	9935527	145669	1.4%	9789858	58073	15.2 %
FL06	8337833	62892	0.75	8274941	1001	1.5 %
FL07	8552292	75381	0.88%	8476911	1998	2.65 %
FL36	7469567	57272	0.76%	7412295	332	0.57 %
FL39	9488984	53582	0.56%	9435402	470	0.87 %
MAN77	8285100	8254216	99.62%	30884	4361949	52.84 %
NAT01	23178098	399121	1.72%	22778977	82677	20.7 %
NAT16	9421203	83217	0.88%	9337986	10684	12.8 %
NAT17	11122471	11113073	99.91%	9398	5341431	48.0 %
SAO76	10416850	10414477	99.97%	2373	4838983	46.4 %
SAO94	8468304	91988	1.1%	8376316	2752	2.99 %
SAO51	8452597	87190	1.0%	8365407	15653	17.9 %
RIP89	8083014	87190	1.1%	7995824	71	0.08 %
REC21	8571271	85258	0.9%	8486013	254	0.29 %
POA39	8866614	66912	0.7%	8799702	5445	8.13 %
POA64	8290655	156980	1.9%	8133675	37074	23.61 %
SAL39	11219739	95210	0.8%	11124529	776	0.8 %

<sup>1</sup> Número de leituras restantes após retirada das leituras alinhadas com o genoma humano.

<sup>2</sup> Porcentagem das sequências mapeadas com genomas de bactérias.

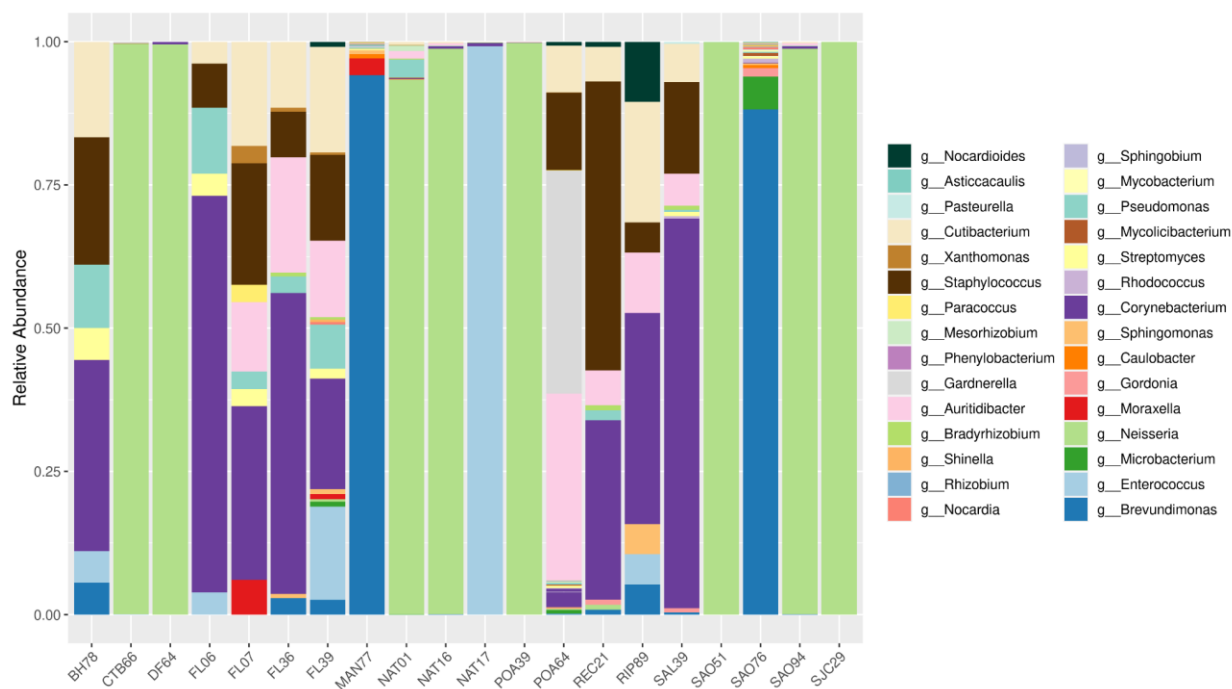
### 6.4.3 Identificação e confirmação de *M. genitalium* nas amostras clínicas através do metagenoma

Das 20 amostras clínicas positivas para *M. genitalium*, apenas em sete amostras (BH78, FL06, FL39, REC21, RIP89, SAL39) foi possível a identificação da bactéria utilizando os dados obtidos com o sequenciamento por metagenoma. A grande maioria dos patógenos identificados previamente juntamente com *M. genitalium* nas amostras, não foram identificados pelo metagenoma. O sequenciamento em que amostras de *M. genitalium* foram identificadas, não gerou dados suficientes para estudos mais aprofundados, como tipagem, SNPs e regiões de repetições. Sendo assim, a montagem do metagenoma de MG (MAG- do inglês *metagenome-assembled genome*) e a montagem de bins (agrupamento) do táxon em questão, não foi possível. Isso, mesmo para as amostras que haviam sido detectadas apenas *M. genitalium*.

### 6.4.4 Caracterização da microbiota associada com *M. genitalium*

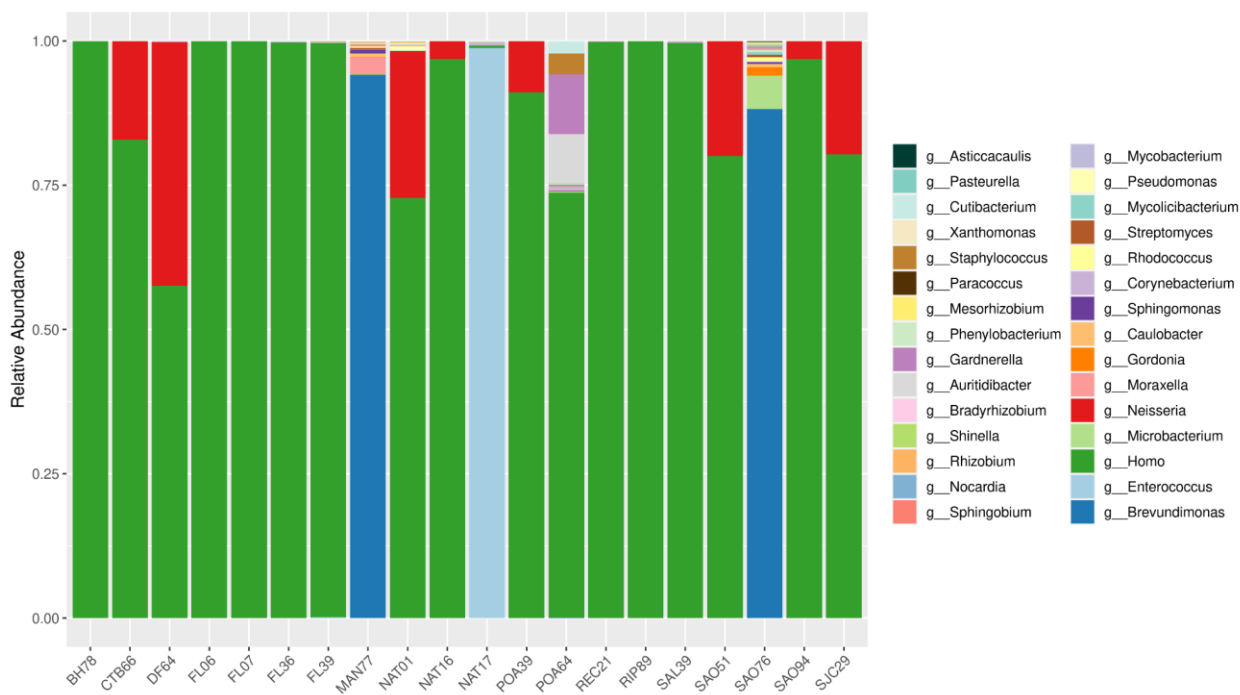
Após a etapa de retirada das leituras do DNA do hospedeiro, as leituras restantes foram submetidas ao programa Kraken2 para atribuição taxonômica. Kraken2 usa um algoritmo para associar *substrings* genômicas curtas (*k*-mers) com os táxons do ancestral comum (LCA) para realizar a classificação. Após, o resultado do Kraken2 de cada amostra individual foi compilado em um arquivo *.tsv* com todas os resultados e realizado gráfico de abundância relativa utilizando programa R. Gêneros das 30 bactérias mais abundantes, sem o DNA do hospedeiro, estão descritos na figura 10. Já na figura 11, estão descritos os 30 gêneros mais abundantes com o DNA do hospedeiro. Nesta última se observa a grande quantidade de leituras do hospedeiro, mesmo após a retirada delas com o programa Bowtie2. Na figura 12 estão descritos os 50 gêneros de bactérias mais abundantes sem o DNA do hospedeiro, nesta é possível observar *M. genitalium* em algumas amostras. Dos demais agentes etiológicos presentes nas amostras que foram detectados por NAATS, somente pode-se observar a bactéria *Neisseria gonorrhoeae*. Leituras de vírus também foram encontradas. Na amostra SAL39 teve 2%, do total de leituras, do gênero *Mastadenovirus*.

Figura 10. Distribuição taxonômica dos 30 gêneros mais abundantes de bactérias presente nas amostras clínicas, sem o DNA do hospedeiro.



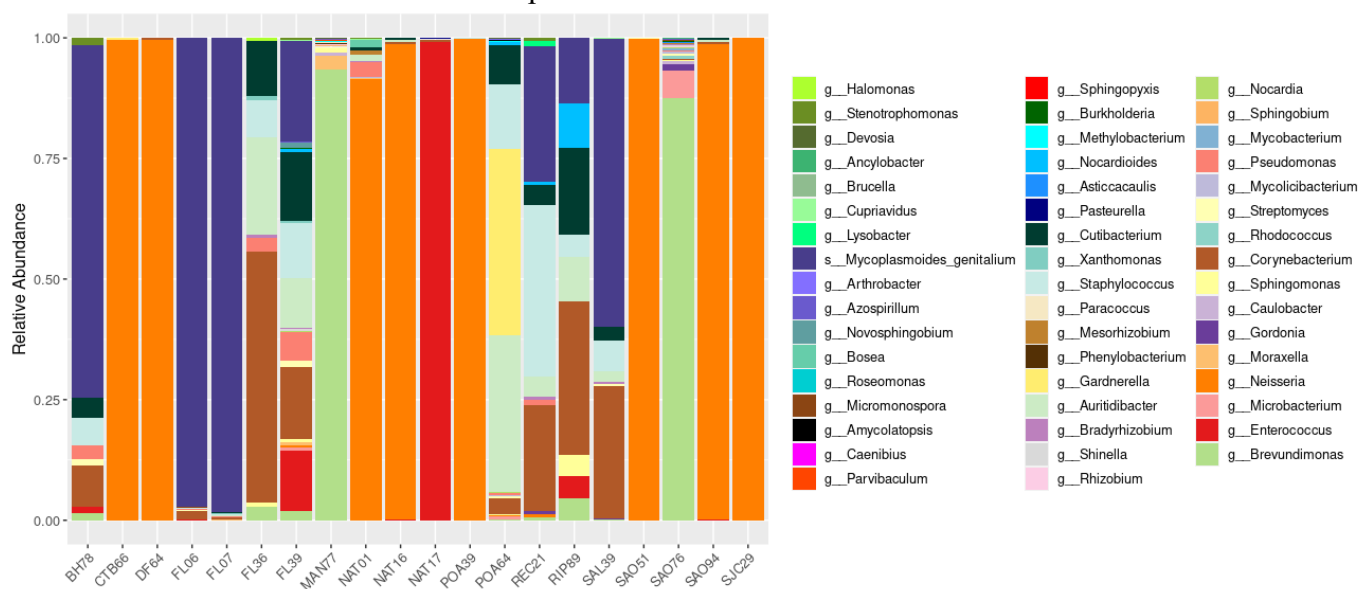
Fonte: Autor.

Figura 11. Distribuição taxonômica dos 30 gêneros mais abundantes de bactérias presente nas amostras clínicas, com o DNA do hospedeiro.



Fonte: Autor.

Figura 12. Distribuição taxonômica dos 50 gêneros mais abundantes de bactérias presente nas amostras clínicas sem o DNA do hospedeiro.



Fonte: Autor.

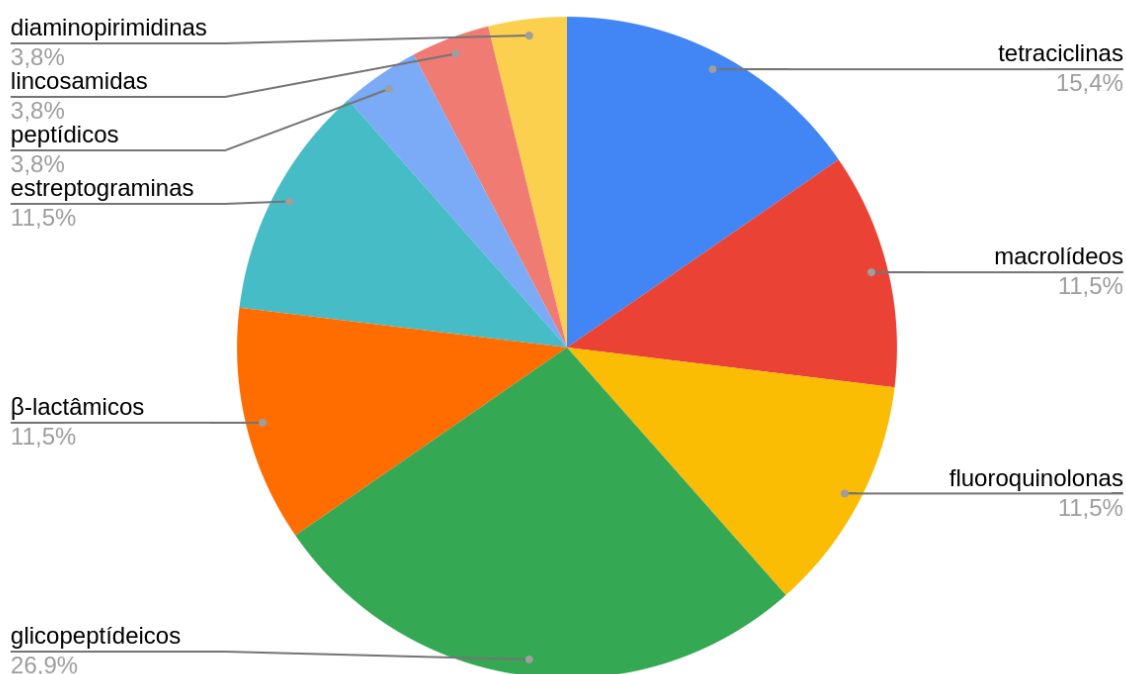
#### 6.4.5 Resistoma das amostras clínicas

Uma das etapas da descrição da microbiota presente nas amostras de secreção uretral masculina, foi a identificação de genes de resistência. Para isto as sequências foram submetidas ao banco de dados *Comprehensive Antibiotic Resistance Database* ("CARD"), o qual fornece dados, modelos e algoritmos relacionados à base molecular da resistência antimicrobiana. O CARD fornece sequências de referência selecionadas e SNPs organizados por meio da Ontologia de Resistência Antibiótica ("ARO"). Esses dados podem ser navegados no site ou baixados em vários formatos. Esses dados são adicionalmente associados a modelos de detecção, na forma de cortes de homologia selecionados e mapas SNP, para previsão de resistoma a partir de sequências moleculares. Esses modelos podem ser baixados ou usados para análise de sequências genômicas usando o Resistance Gene Identifier ("RGI"), on-line ou como uma ferramenta autônoma.

As sequências de metagenoma foram submetidas ao banco de dados CARD, para rastreio de genes e mecanismos que conferem resistência aos antimicrobianos. Das 20 amostras clínicas de *swab* uretral submetidas, cinco apresentaram algum mecanismo que confere resistência a diversas classes de antimicrobianos. Foram: NAT17, MAN77, NAT01, DF64 e SÄO76. Algumas apresentaram mecanismos de resistência a macrolídeos e fluoroquinolonas, classes de antimicrobianos também utilizados para tratamento de infecções causadas por *M.*

*genitalium*. No entanto, nenhum mecanismo relacionado com resistência de *M. genitalium* foi encontrado. Foram identificadas resistências a algumas classes de antimicrobianos (Figura 13): lincosamida, estreptogramina, estreptogramina A, estreptogramina B, pleuromutilina, glicopeptídeo, tetraciclina, fluoroquinolona, macrolídeo, cefalosporina, cefamicina, peptídico. Os mecanismos de ação encontrados foram: proteção do alvo, bomba de efluxo e SNPs.

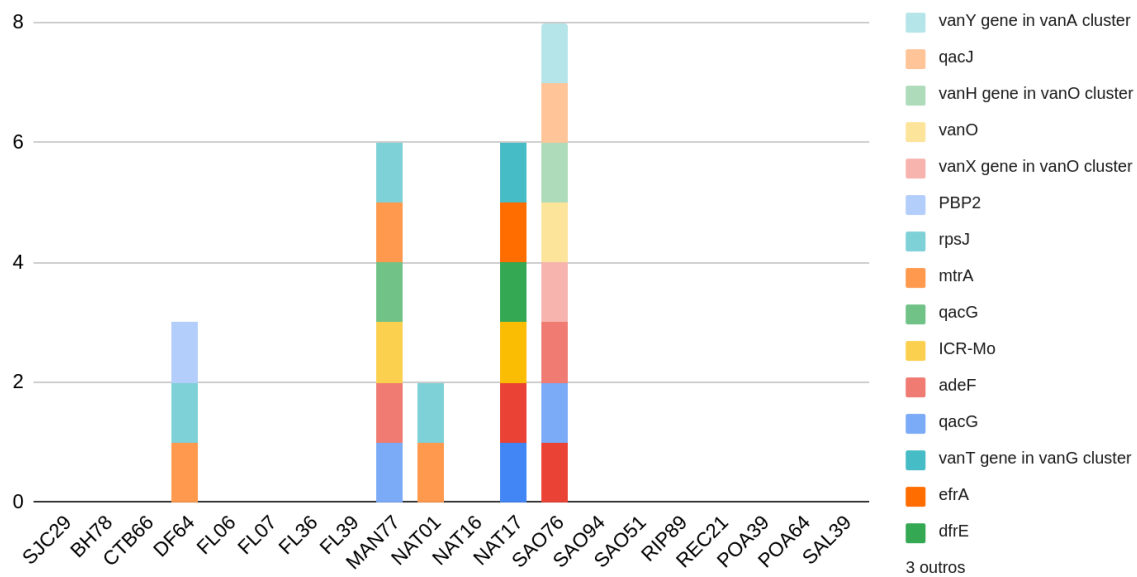
Figura 13. Porcentagem de resistência a classes de antimicrobianos, encontradas em cinco amostras clínicas, utilizando o banco de dados CARD.



Fonte: Autor.

Em relação aos SNPs, não foi encontrado nenhum relacionado à resistência em *M. genitalium*, mas foram identificados SNPs nas amostras NAT01: V57M no gene *rpsJ*, como na amostra DF64, que além do mencionado, teve as mutações V57M, F504L, A510V, A516G, também identificadas (Figura 14).

Figura 14. Genes de resistência encontrados nas amostras clínicas por WGS, pesquisadas no banco de dados CARD.



Fonte: Autor.

## 7 DISCUSSÃO

O cenário para diagnóstico da infecção por *M. genitalium*, no Brasil, começou a ficar mais favorável em torno de 2017/2018 com a disponibilidade de diagnósticos moleculares, mas ainda não estão disponíveis na rede pública. Entretanto, o LBMMS vem fazendo alguns estudos para identificação desta bactéria em amostras de secreção uretral masculina e *swab* vaginal. O estudo em secreção uretral masculina não foi desenhado para determinar a prevalência, mas apontou um número importante de casos (artigo submetido). Entre as amostras de *swab* vaginal, um estudo com gestantes determinou a prevalência (artigo submetido) e outro estudo que não determinou a prevalência, feito com mulheres vivendo com HIV (WACHTER et al., 2023), também mostraram a importância dessa bactéria na população. Paralelamente a esses achados e considerando os dados internacionais (HAMASUNA et al., 2018; GETMAN; COHEN; JIANG, 2023; MAHLANGU et al., 2018), a indústria vem disponibilizando testes moleculares para detecção simultânea de *M. genitalium* e outros patógenos relacionados a ISTs (como *N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis* e *T. vaginalis*) além da detecção de mutações associadas a sua resistência aos antimicrobianos, principalmente a classe dos macrolídeos, os quais também não estão disponíveis na rede pública (SANDRI et al., 2023; NGOBESE et al., 2022; BERTI et al., 2022; PERIS, 2023 ).

O presente estudo foi a primeira oportunidade brasileira de investigar o perfil de resistência de *M. genitalium* nas cinco regiões brasileiras para ter o panorama atual da resistência da bactéria e verificar a indicação de tratamento no país. Alguns trabalhos incluíram nos seus estudos *M. genitalium* viáveis para o cultivo, assim podendo determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) *in vitro* (HAMASUNA et al., 2018; PITT et al., 2022). Outros trabalhos relataram a falha no tratamento com pacientes, e assim relacionam as mutações encontradas com o desfecho clínico obtido (TAGG et al., 2013; BERTI et al., 2023; MURRAY et al., 2023). No presente estudo trabalhamos com amostras clínicas oriundas de dois projetos desenvolvidos no LBMMS. O principal objetivo foi fornecer os primeiros dados nacionais sobre a resistência de *M. genitalium* aos macrolídeos e fluoroquinolonas. Nosso estudo utilizou amostras clínicas, de homens e mulheres, coletadas nas cinco regiões do Brasil. Com este estudo, foi possível dar um panorama das características genéticas que conferem resistência aos antimicrobianos de *M. genitalium* circulantes no Brasil, e assim incentivar novos estudos.

Nos últimos 10 anos, o tratamento de infecções causadas por *M. genitalium* tornou-se cada vez mais difícil. Os macrolídeos não são mais recomendados como tratamento de primeira



linha em alguns locais sem a realização de testes que detectam mutações que causam resistência a essa classe de antimicrobianos, uma vez que a prevalência da resistência é próxima de 50% (GAYDOS et al., 2019; MANHART, JENSEN, 2020), dado muito próximo aos achados neste estudo o qual apresentou 40,5 %.

Quando se fala do sequenciamento bem-sucedido das amostras, nosso estudo também não se difere dos resultados encontrados na literatura. Isso se deve ao tipo de amostra clínica, baixa carga bacteriana e também ao fato da própria característica desta bactéria (LE ROY et al. 2016). Seu genoma é o menor de todas as bactérias conhecidas, isso pode ser fator muito relevante para realizar estudos relacionados ao seu genoma. Os estudos conduzidos pela maioria dos autores que aplicaram essa mesma técnica para estudar as mutações referentes à resistência antimicrobiana de *M. genitalium*, também tiveram resultados similares. O principal desafio, é a questão do cultivo da bactéria, que leva muito tempo e demanda grande aporte laboratorial (FRASER et al., 1995; MA et al., 2010; MANHART; JENSEN, 2017; MURRAY et al., 2017).

Também encontramos mutações descritas na literatura, como no gene *parC* (C234T), uma mutação que resulta em uma troca de aminoácido (P62S) mas que não está associada à resistência (MACHALEK, et al., 2020; PITT et al., 2018). Curiosamente no gene pesquisado e mencionado em diversos trabalhos, *gyrA*, não foi encontrada nenhuma mutação que esteja, até então, relacionada com resistência. Isto foi descrito em trabalhos anteriores e nos faz pensar na importância de direcionar esforços para o estudo deste alvo, quando não há mutações no gene *parC* (PITT et al., 2018; MONDEJA et al, 2016; MURRAY et al., 2023). Cabe mencionar ainda, que kits comerciais disponíveis no mercado para a detecção de *M. genitalium* e sua resistência, não trazem o gene *gyrA* como alvo. Mas não podemos descartar totalmente seu estudo, sendo que o mesmo pode potencializar a resistência quando possui mutações juntamente com o gene *parC* (PITT et al., 2018; MURRAY et al., 2017).

Duas amostras chamaram a atenção pela presença de resistência a duas classes de antimicrobianos, fluoroquinolonas e macrolídeos, com mutações encontradas na subunidade ribossomal 23S e no gene *parC*. Glaser e colaboradores (2019) e Brann e colaboradores (2017), também identificaram amostras de *M. genitalium* com mutações que conferem resistência nestas duas regiões.

Como não foi realizada subtipagem de *M. genitalium* presente nas amostras clínicas, não foi possível determinar se as mutações encontradas em 23S rRNA, *parC* e *gyrA* eram o resultado de eventos de mutação *de novo* que foram então selecionados pelo uso de fluoroquinolonas ou eram descendentes de linhagens mutantes clonais. No entanto, a presença

destas mutações em isolados clínicos de *M. genitalium* levanta preocupações sobre o potencial de surgimento de resistência às fluoroquinolonas na comunidade, como acontece em outras partes do mundo (KIKUCHI et al., 2014; MURRAY et al., 2017)

Este é o primeiro estudo de nível nacional do Brasil, no qual foi possível realizar a pesquisa dos alvos de interesse, descritos até então na literatura, que conferem ou estão relacionados com a resistência antimicrobiana de *M. genitalium*. E demonstra que no Brasil a resistência de *M. genitalium* está emergindo, assim como ocorreu em outros países (LE ROY et al. 2016; KIKUCHI et al., 2014; MURRAY et al., 2017). No Brasil há uma falta de estudos relacionados a esse tema. E podemos tomar de exemplo o que ocorre em outras partes do mundo, para se ter mais atenção quando se trata de *M. genitalium*. Muito se fala em NG e outros patógenos causadores de ISTs, e agora evidenciamos que *M. genitalium* deve entrar para esse grupo e ter a atenção e o direcionamento necessários, pois também pode vir a se tornar uma problema grave de saúde pública no Brasil. Encontramos um maior número de resistência a macrolídeos, classe de antimicrobianos que é utilizada para tratamento de infecções causadas por diversos patógenos, principalmente aqueles causadores de ISTs, que estão relacionados com *M. genitalium* (Brasil, 2021). Por isso se faz de extrema importância o diagnóstico do ou dos agentes etiológicos causadores da infecção, pois, como vimos, somente no ano de 2022 o MS publicou diretrizes, através do PCDT, para o tratamento de infecções causadas por *M. genitalium* (Brasil, 2022), quando este patógeno é identificado como causador da infecção. Mas ainda se adota o tratamento sintomático.

Vimos uma diferença na porcentagem de mutações entre as amostras de secreção uretral e *swab* vaginal. Isso é um dado importante e que diz bastante sobre diversos fatores que podem estar associados. Um ponto a ser levado em consideração é o tipo de amostra, pois as amostras de secreção uretral masculina, quando há algum tipo de secreção, normalmente estão acometidas por um agente etiológico. Já as amostras de *swab* vaginal, foram coletadas de gestantes em um dos atendimentos de rotina do pré-natal (SRINIVASAN et al., 2021; BRADSHAW et al., 2006).

Em relação a caracterização da microbiota, presente nas amostras detectadas para *M. genitalium* por metagenoma nas amostras de *swab* masculinas, têm-se alguns desafios a vencer. O DNA do hospedeiro é um deles. Mesmo utilizando um kit de extração de material genético para remover esse DNA, a grande maioria das leituras do sequenciamento foi do hospedeiro. No trabalho de Mostafa e colaboradores (2018) foram removidas leituras humanas, que variaram de 1,3% a até 99,9%, e também encontrando, mesmo após o processo de remoção, cerca de 4,9% de leituras humanas nas análises subsequentes.

Além destes, o tipo de amostra também pode ter influenciado alguns trabalhos trazem urina e uretra como uma região estéril ou quase estéril, tendo ainda a limitação do material genético do microbioma, ocorrendo leituras insuficientes ou até mesmo a falha no sequenciamento (MOSTAFA et al., 2018; DONG et al., 2011).

*M. genitalium*, muitas vezes está associada a outro patógeno causador de IST, como CT, NG, UU, entre outros. Vírus também foram identificados, e entre eles o *Human mastadenovirus*, que pode causar várias doenças em adultos e crianças, como infecção respiratória aguda, gastroenterite e ceratoconjuntivite (CHEN, TIAN., 2018). Hiroi e colaboradores (2020) relataram em seu trabalho uma uretrite sexualmente transmissível causada por um adenovírus. Os *swabs* uretrais coletam amostras robustas de patógenos uretrais e têm sido historicamente utilizados para pesquisas de IST em homens (DONG et al., 2011). Segundo Nelson e colaboradores (2010) a uretra e urina podem conter um microbioma complexo, onde a composição desse microbioma pode ser muito relevante para ISTs e doenças do trato urogenital (MOSTAFA et al., 2018). Dong e colaboradores (2011), realizaram um estudo com 32 amostras de *swab* uretral masculino comparando microbiota de urina e *swab* uretral. As amostras foram submetidas a um teste de diagnóstico comercial que identifica agentes causadores de ISTs seguidas de pirosequenciamento utilizando uma PCR multiplex 16s rRNA. O estudo encontrou no *swab* uretral os gêneros: *Neisseria*, *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Prevotella*, *Ureaplasma*, *Lactobacillus*, *Aerococcus*, *Gemella*, *Veillonella*, *Staphylococcus*, *Propionibacterium*, *Mycoplasma*, *Ralstonia*, *Anaerococcus*. No nosso estudo, apesar de usar o sequenciamento metagenômico, também encontramos alguns dos gêneros descritos no estudo citado. É importante o conhecimento da microbiota presente na urina ou no *swab* uretral, porque *M. genitalium* pode estar presente e não ser a causadora de infecção, assim com o conhecimento do microbioma, outras bactérias podem ser identificadas como agentes causadores de infecção. Em um trabalho de revisão para estudar a microbiota do trato genital masculino, incluindo a uretra, o sulco coronal, a secreção prostática expressa e o sêmen, bem como o impacto desta microbiota na saúde do homem e também na saúde da sua parceira, foram encontradas diversas espécies de *Corynebacterium*, no trato urogenital masculino, encontramos em nosso estudo, e também relata que *Corynebacterium glucuronolyticum*, descoberta primeiro em pacientes com prostatite, foi associada a casos de uretrite (MÄNDAR, 2013; ABDOLRASOULI; ROUSHAN, 2013).

Conforme mencionado, todas as amostras incluídas no estudo eram positivas para *M. genitalium*, porém, não foram observadas leituras deste microrganismo em todas as amostras no sequenciamento metagenômico. Isso demonstra a dificuldade do rastreamento desta bactéria e de

outras semelhantes, quando utilizada a abordagem de metagenoma e os desafios do emprego dessa técnica (GRENINGER, 2018), e embora inúmeros estudos e relatos de casos tenham demonstrado a eficácia do WGS na melhoria do diagnóstico clínico, são evidentes lacunas em relação à sensibilidade, especificidade desta técnica na prática clínica (BATOOL; PENA, 2023; DULANTO CHIANG; DEKKER, 2020). *M. genitalium* é uma bactéria de difícil cultivo, é recomendado para microrganismos com essa característica o uso de técnicas independentes de cultivo para diagnóstico. O estudo de Moustafa e colaboradores (2018), pesquisou o metagenoma microbiano, relacionado com infecção do trato urinário, e a caracterização da microbiota não encontrou *M. genitalium*. O microrganismo mais próximo encontrado foi *Ureaplasma*, ainda este estudo traz na discussão sobre a importância que a técnica de metagenoma detecte agentes etiológicos associados a ISTs, como *Mycoplasma*, *Chlamydia* e outros.

Mesmo com as dificuldades encontradas, consegue-se identificar genes e regiões que possuem mecanismos de resistência. Muitas delas a antimicrobianos, azitromicina e ciprofloxacino, utilizados no tratamento de infecções causadas por *M. genitalium*, o que demonstra que o uso destes, deve ser com cautela, e que a identificação de patógenos envolvidos na infecção é de extrema importância, diferente da abordagem etiológica. Curioso que a mesma mutação relacionada com a resistência a macrolídeos, A2058G, também é encontrada em outros microrganismos, como NG por exemplo (PHAN et al., 2021).

Nosso estudo, primeiro de nível nacional, que buscou identificar mutações que conferem resistência aos antimicrobianos das classes macrolídeos e fluoroquinolonas em *M. genitalium*, demonstraram que os achados aqui do Brasil, não se diferem muito dos demais trabalhos realizados nas diferentes partes do mundo. É necessário dar mais atenção para esse assunto aqui no Brasil, assim como outros países fizeram. ISTs são um problema mundial de saúde pública e alguns agentes etiológicos, como *N. gonorrhoeae*, já apresentam grande resistência aos antimicrobianos utilizados no seu tratamento. O que já vem sendo observado em *M. genitalium*, e uma das maneiras mais assertivas para evitar isso é realizando ações de políticas públicas de saúde, principalmente disponibilizando o diagnóstico para identificar o agente causador da IST e, se possível, identificar também a presença ou não de mutações, genes ou mecanismos que conferem resistências aos antimicrobianos. Já existem técnicas para tal, são ainda onerosas, mas o acesso a essas técnicas vêm se disseminando cada vez mais, com barateamento dos custos, com empresas oferecendo testes variados, rápidos e assertivos.

## 8. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo evidenciaram uma alta porcentagem de resistência de *M. genitalium* aos macrolídeos no Brasil. Uma vez que o país não possui uma rede de testes moleculares no Sistema Único de Saúde para detecção desta bactéria e que na maioria dos casos de infecções é adotada a abordagem sindrômica com a utilização de ceftriaxona 500 mg associada à azitromicina 1 g, uma grande parte de casos de infecção por *M. genitalium* não é tratada de forma adequada. Desta forma, estudos como este são importantes para nortear os protocolos e diretrizes para o tratamento destas infecções. Foi possível analisar os alvos de interesse, e os SNPs encontrados condizem com os que estão descritos na literatura na literatura. Encontramos mutações que conferem resistência em todas as regiões brasileiras, demonstrando que cepas de *M. genitalium* resistentes, circulam por todo território nacional. O estudo da microbiota de *swab* uretral masculino, identificou uma microbiota com alguns agentes etiológicos que causam ISTs, e que a maioria dos patógenos identificados previamente por qPCR, não foram identificados pela metagenoma. Em relação ao resistoma, não conseguimos identificar SNPs de *M. genitalium*, mas foi possível observar outras mutações genes de resistência, inclusive para os antimicrobianos utilizados no tratamento de *M. genitalium*.

Este estudo fornece a primeira estimativa de resistência de *M. genitalium* a classe dos macrolídeos e fluoroquinolonas do Brasil. Resistência essa emergente em diversas partes do mundo, que está se repetindo em nosso país. Diferentes grupos populacionais apresentam diferenças entre si, o que auxilia na tomada de decisões das estratégias públicas de saúde. A análise metagenômica neste tipo de amostra precisa ser aprimorada principalmente sobre o grande número de leituras do DNA do hospedeiro presente nas análises.

## 9 PERSPECTIVAS

I - Incluir mais 100 amostras no estudo de alvos de interesse. Pesquisando nestas amostras os alvos 23S RNAr e *parC* utilizando dois kits comerciais para tal, Allplex™ MG & MoxiR Assay e Allplex™ MG & Azir Assay. Esses resultados serão compilados e incluídos no artigo final.

II – Realizar a tipagem do *M. genitalium* das amostras incluídas neste estudo. Metodologia muito parecida com a pesquisa dos SNPs. Os iniciadores já estão disponíveis no LBMMS para dar prosseguimento e também serão incluídas no artigo final.

III - Trabalhar mais nos resultados do sequenciamento por WGS. Outras ferramentas de bioinformática serão utilizadas para tentar aprimorar a análise das leituras.

IV - Ainda, futuramente o LBMMS possibilitará que seja aplicada a técnica de cultura celular. Isso permitirá o cultivo de *M. genitalium*, e conseqüentemente uma quantidade de material genético adequada para que o sequenciamento do seu genoma seja possível. Como também verificar a CIM das cepas isoladas e cultivadas.

## REFERÊNCIAS

ABDOLRASOULI, A.; ROUSHAN, A. Associated with acute, nongonococcal urethritis. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 40, n. 10, p. 829-831, 2013.

ARBER, W. Genetic variation: molecular mechanisms and impact on microbial evolution. **FEMS microbiology reviews**, v. 24, n. 1, p. 1-7, 2000.

BACHMANN, N. L. et al. Advances in clinical sample preparation for identification and characterization of bacterial pathogens using metagenomics. **Frontiers in Public Health**, v. 6, n. DEC, 2018.

BAPTISTA, M. G. F. M. Mecanismos de Resistência aos Antibióticos, monografia (Dissertação de Mestrado) **Curso de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia**, Lisboa, v. 42, 2013.

BATOOL, Maliha; GALLOWAY-PEÑA, Jessica. Clinical metagenomics—challenges and future prospects. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, 2023

BERÇOT, Béatrice et al. High prevalence and high rate of antibiotic resistance of *Mycoplasma genitalium* infections in men who have sex with men: a substudy of the ANRS IPERGAY pre-exposure prophylaxis trial. **Clinical Infectious Diseases**, v. 73, n. 7, p. e2127-e2133, 2021.

BERTI, V. et al. Infective anoproctitis in men having sex with men: Don't forget *Mycoplasma genitalium*. **Infectious Diseases Now**, v. 53, n. 8, p. 104771, 2023.

BERTI, V. et al. L'ano-rectite à *Mycoplasma genitalium*: une infection sexuellement transmise émergente. **Médecine et Maladies Infectieuses Formation**, v. 1, n. 2, p. S10, 2022.

BERTI, V. et al. L'ano-rectite à *Mycoplasma genitalium*: une infection sexuellement transmise émergente. **Médecine et Maladies Infectieuses Formation**, v. 1, n. 2, p. S10, 2022.

BISSESSOR, M. et al. Macrolide resistance and azithromycin failure in a *Mycoplasma genitalium* infected cohort and response of azithromycin failures to alternative antibiotic regimens. **Clinical infectious diseases**, v. 60, n. 8, p. 1228-1236, 2015.

BJÖRNELIUS, E. et al. Antibiotic treatment of symptomatic *Mycoplasma genitalium* infection in Scandinavia: A controlled clinical trial. **Sexually Transmitted Infections**, v. 84, n. 1, p. 72–76, 2008.

BLAYLOCK, M. W. et al. Determination of Infectious Load of *Mycoplasma genitalium* in Clinical Samples of Human Vaginal Cells. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 746–752, 2004.

BOLGER, ANTHONY M.; LOHSE, MARC; USADEL, BJOERN. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114-2120, 2014.

BRAAM, J. F. et al. Multidrug-resistant *Mycoplasma genitalium* infections in Europe. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 36, p. 1565-1567, 2017.

BRADSHAW, C. S.; JENSEN, J. S.; WAITES, K. B. New horizons in *Mycoplasma genitalium* treatment. *The Journal of infectious diseases*, v. 216, n. suppl\_2, p. S412-S419, 2017.

BRADSHAW, C.S. et al. Etiologies of nongonococcal urethritis: bacteria, viruses, and the association with orogenital exposure. **The Journal of infectious diseases**, v. 193, n. 3, p. 336-345, 2006.

BRASIL. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Atenção às Pessoas com Infecções Sexualmente Transmissíveis (IST). **Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Doenças de Condições Crônicas e Infecções Sexualmente Transmissíveis**, n. 0014125063, p. 1–248, 2020.

CAVARRETTA, I. et al. The Microbiome of the Prostate Tumor Microenvironment. **Eur. Urol.** 2017, 72, 625–631.

CARRASCO, I. R. Z.; LOZANO, J. C.. *Mycoplasma genitalium*: um patógeno emergente de transmissão sexual. **Revista Latinoamericana de Infectología Pediátrica**, v. 31, n. 4, p. 149-151, 2019.

CINA, M. et al. *Mycoplasma genitalium* incidence, persistence, concordance between partners and progression: systematic review and meta-analysis. **Sexually transmitted infections**, v. 95, n. 5, p. 328-335, 2019.

CHEN, Shiyong; TIAN, Xingui. Vaccine development for human mastadenovirus. **Journal of thoracic disease**, v. 10, n. Suppl 19, p. S2280, 2018.

CIMOLAI, N. Do mycoplasmas cause human cancer?. **Canadian journal of microbiology**, v. 47, n. 8, p. 691-697, 2001.

CHIU, Charles Y.; MILLER, Steven A. Clinical metagenomics. **Nature Reviews Genetics**, v. 20, n. 6, p. 341-355, 2019.

CHO, Ilseung; BLASER, Martin J. The human microbiome: at the interface of health and disease. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, n. 4, p. 260-270, 2012.

CHO, Ilseung; BLASER, Martin J. The human microbiome: at the interface of health and disease. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, n. 4, p. 260-270, 2012.

COOLS, Piet; PADALKO, Elizaveta. Emerging macrolide resistance in *Mycoplasma genitalium*. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 20, n. 11, p. 1222-1223, 2020.

CORDOVA, C. M. M. DE; CUNHA, R. A. F. DA. Detecção de *Mycoplasma genitalium*, *M. fermentans* e *M. penetrans* em pacientes com sintomas de uretrite e em indivíduos infectados



pelo HIV-1 no Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 38, n. 2, p. 111–118, 2002.

DEGUCHI, T. et al. Longitudinal quantitative detection by real-time PCR of *Mycoplasma genitalium* in first-pass urine of men with recurrent nongonococcal urethritis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 10, p. 3854–3856, 2002.

DHANDAYUTHAPANI et al. Peptide methionine sulfoxide reductase (MsrA) is a virulence determinant in *Mycoplasma genitalium*. **Journal of bacteriology**. 2001 Oct 1;183(19):5645-50.

DE CARVALHO, N. S.; PALU, G.; WITKIN, S. S. *Mycoplasma genitalium*, um trato reprodutivo feminino furtivo. **Jornal Europeu de Microbiologia Clínica e Doenças Infecciosas**, v. 229-234, 2020.

DE SOUSA, D.; COSTA, J. B. Antimicrobial resistance in sexually transmitted infections beyond gonococcal infection.

DONG, Q. et al. The microbial communities in male first catch urine are highly similar to those in paired urethral swab specimens. **PloS one**, v. 6, n. 5, p. e19709, 2011.

DULANTO CHIANG, A.; DEKKER, J. P. From the pipeline to the bedside: advances and challenges in clinical metagenomics. **The Journal of infectious diseases**, v. 221, n. Supplement\_3, p. S331-S340, 2020.

EWELS, Philip et al. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. **Bioinformatics**, v. 32, n. 19, p. 3047-3048, 2016.

FALK, L.; ENGER, M.; JENSEN, J. S. Time to eradication of *Mycoplasma genitalium* after antibiotic treatment in men and women. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 11, p. 3134–3140, 2015.

FERNÁNDEZ-HUERTA, Miguel et al. *Mycoplasma genitalium* and antimicrobial resistance in Europe: a comprehensive review. **International journal of STD & AIDS**, v. 31, n. 3, p. 190-197, 2020.

FLORENSA, A. F. et al. ResFinder—an open online resource for identification of antimicrobial resistance genes in next-generation sequencing data and prediction of phenotypes from genotypes. **Microbial Genomics**, v. 8, n. 1, 2022.

FRASER, C. M. et al. The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*. **Science**, v. 270, n. 5235, p. 397–403, 1995.

FREIRES, M. S. JUNIOR; RODRIGUES O. M.. Resistência bacteriana pelo uso indiscriminado da azitromicina frente a Covid-19: uma revisão integrativa. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 1, p. e31611125035-e31611125035, 2022.

GAYDOS, C. A. et al. Molecular testing for *Mycoplasma genitalium* in the United States:

- Results from the AMES prospective multicenter clinical study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 57, n. 11, p. 1–12, 2019.
- GETMAN, D.; COHEN, S.; JIANG, A. Distribution of macrolide resistant *Mycoplasma genitalium* in urogenital tract specimens from women enrolled in a US clinical study cohort. **Clinical Infectious Diseases**, v. 76, n. 3, p. e776-e782, 2023.
- GETMAN, D. et al. *Mycoplasma genitalium* prevalence, coinfection, and macrolide antibiotic resistance frequency in a multicenter clinical study cohort in the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 9, p. 2278–2283, 2016.
- GIBSON, D. G. et al. Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. **Science**, v. 329, n. 5987, p. 52–56, 2010.
- GNANADURAI, ROSHINA; FIFER, Helen. *Mycoplasma genitalium*: a review. **Microbiology**, v. 166, n. 1, p. 21-29, 2020.
- GOLDBERG, B. et al. Making the leap from research laboratory to clinic: Challenges and opportunities for next-generation sequencing in infectious disease diagnostics. **mBio**, v. 6, n. 6, p. 1–10, 2015.
- GLASER, A. M. et al. Two cases of multidrug-resistant genitourinary *Mycoplasma genitalium* infection successfully eradicated with minocycline. **International journal of STD & AIDS**, v. 30, n. 5, p. 512-514, 2019.
- GRENINGER, Alexander L. The challenge of diagnostic metagenomics. **Expert review of molecular diagnostics**, v. 18, n. 7, p. 605-615, 2018.
- HALL, T.A. BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, [S.L.], v. 41, n. 01, p. 95-98, 1999.
- HAMASUNA, R.; OSADA, Y.; JENSEN, J. S. Isolation of *Mycoplasma genitalium* from first-void urine specimens by coculture with vero cells. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 847–850, 2007.
- HAMASUNA R, LE PT et al. Mutations in *ParC* and *GyrA* of moxifloxacin-resistant and susceptible *Mycoplasma genitalium* strains. **PLoS One**. 8;13(6):e0198355. Jun 2018.
- HAMASUNA, Ryoichi et al. Mutations in *ParC* and *GyrA* of moxifloxacin-resistant and susceptible *Mycoplasma genitalium* strains. **PLoS One**, v. 13, n. 6, p. e0198355, 2018.
- HERNÁNDEZ, M. et al. Bioinformatics of next generation sequencing in clinical microbiology diagnosis. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 52, n. 2, p. 150–161, 2020.
- HASMAN, H. et al. Rapid whole-genome sequencing for detection and characterization of microorganisms directly from clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 139–146, 2014.

HIROI, Satoshi; KAWAHATA, Takuya; FURUBAYASHI, Keiichi. First isolation of human adenovirus type 85 by molecular analysis of adenoviruses in cases of urethritis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 69, n. 2, p. 265-269, 2020.

HYMAN, H. C.; YOGEV, D.; RAZIN, S. DNA probes for detection and identification of *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, n. 4, p. 726-728, 1987.

IMELFORT, M. et al. GroopM: an automated tool for the recovery of population genomes from related metagenomes. **PeerJ**, v. 2, p. e603, 2014.

JENSEN, J. S. et al. Isolation of *Mycoplasma genitalium* strains from the male urethra. **Journal of clinical microbiology**, v. 34, n. 2, p. 286-291, 1996.

JENSEN, J. S. et al. 2016 European guideline on *Mycoplasma genitalium* infections. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 30, n. 10, p. 1650–1656, 2016.

JENSEN, J. S.; BRADSHAW, C. Management of *Mycoplasma genitalium* infections - can we hit a moving target? **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, p. 1–9, 2015.

JENSEN, J. S. et al. Use of TaqMan 5' nuclease real-time PCR for quantitative detection of *Mycoplasma genitalium* DNA in males with and without urethritis who were attendees at a sexually transmitted disease clinic. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 683-692, 2004.

KIKUCHI M, Ito S, Yasuda M, Tsuchiya T, Hatazaki K, Takanashi M, Ezaki T, Deguchi T. Aumento notável de *Mycoplasma genitalium* resistente a fluoroquinolonas no Japão. **Jornal de Quimioterapia Antimicrobiana**. 1 de setembro de 2014;69(9):2376-82.

KIKUCHI, Mina et al. Aumento notável de *Mycoplasma genitalium* resistente a fluoroquinolonas no Japão. **Revista de Quimioterapia Antimicrobiana**, v. 9, pág. 2376-2382, 2014.

KLEIN, Cameron et al. *Mycoplasma* co-infection is associated with cervical cancer risk. **Cancers**, v. 12, n. 5, p. 1093, 2020.

KLEIN, C. et al. Relationship between the Cervical Microbiome, HIV Status, and Precancerous Lesions. **MBio**, 10, e02785-18. 2019.

KORICH, Faye; REDDY, Neha; TRENT, Maria. *Mycoplasma genitalium* and *Trichomonas vaginalis*: addressing disparities and promoting public health control of two emerging sexually transmitted infections. **Current opinion in pediatrics**, v. 32, n. 4, p. 482, 2020.

LANGMEAD, BEN; SALZBERG, STEVEN L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nature methods**, v. 9, n. 4, p. 357-359, 2012.

LEÓN, C. M.; DE ARTOLA, D. G. M.; PINO-CALM, B. Elevada taxa de resistencia a macrólidos y fluoroquinolonas en *Mycoplasma genitalium* en el área sur de Tenerife. **Revista Española de Quimioterapia**, v. 36, n. 4, p. 416, 2023.

- LEUNG, E. et al. The WHO policy package to combat antimicrobial resistance. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 89, p. 390-392, 2011.
- LE ROY, Chloé et al. Fluoroquinolone-resistant *Mycoplasma genitalium*, southwestern France. **Emerging infectious diseases**, v. 22, n. 9, p. 1677, 2016.
- LE ROUX, M. C.; HOOSEN, A. A. *Mycoplasma genitalium*: a brief review. **Southern African Journal of Epidemiology and Infection**, v. 25, n. 4, p. 7-10, 2010.
- LI, Y. et al. Meta-analysis of the efficacy of moxifloxacin in treating *Mycoplasma genitalium* infection. **International journal of STD & AIDS**, v. 28, n. 11, p. 1106-1114, 2017.
- LIS, R.; ROWHANI-RAHBAR, A.; MANHART, L. E. *Mycoplasma genitalium* infection and female reproductive tract disease: a meta-analysis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 61, n. 3, p. 418-426, 2015.
- LOUREIRO, R. J. et al. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista Portuguesa de saúde pública**, v. 34, n. 1, p. 77-84, 2016.
- MA, L. et al. Genetic variation in the complete MgPa operon and its repetitive chromosomal elements in clinical strains of *Mycoplasma genitalium*. **PLoS ONE**, v. 5, n. 12, 2010.
- MACHALEK, D. A. et al. Prevalence of mutations associated with resistance to macrolides and fluoroquinolones in *Mycoplasma genitalium*: a systematic review and meta-analysis. **The lancet infectious diseases**, v. 20, n. 11, p. 1302-1314, 2020.
- MAHLANGU, M. P. et al. Molecular characterization and detection of macrolide and fluoroquinolone resistance determinants in *Mycoplasma genitalium* in South Africa, 2015 to 2018. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 49, n. 7, p. 511-516, 2022.
- MÄNDAR, Reet. Microbiota of male genital tract: impact on the health of man and his partner. **Pharmacological research**, v. 69, n. 1, p. 32-41, 2013.
- MANHART, L. E.; JENSEN, J. S. Quinolone Resistance–Associated Mutations in *Mycoplasma genitalium*: Not Ready for Prime Time. **Sexually transmitted diseases**, v. 47, n. 3, p. 199, 2020.
- MANHART, L. E. et al. Standard treatment regimens for nongonococcal urethritis have similar but declining cure rates: a randomized controlled trial. **Clinical infectious diseases**, v. 56, n. 7, p. 934-942, 2013.
- MARTEL, C.; FRANCESCHI, S. Infections and cancer: established associations and new hypotheses. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 70, n. 3, p. 183-194, 2009.
- MAVEDZENGE, S. N.; et al. The association between *Mycoplasma genitalium* and HIV-1 acquisition in African women. **AIDS**, v. 26, n. 5, p. 617–624, 4 jan. 2012.

MAVEDZENGE, S. N.; WEISS, H. A. Association of *Mycoplasma genitalium* and HIV infection: A systematic review and meta-analysis. **AIDS**, v. 23, n. 5, p. 611–620, 13 mar. 2009.

MAVEDZENGE, Sue Napierala; WEISS, Helen Anne. Association of *Mycoplasma genitalium* and HIV infection: a systematic review and meta-analysis. **Aids**, v. 23, n. 5, p. 611-620, 2009.

MOUSTAFA, Ahmed et al. Microbial metagenome of urinary tract infection. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 4333, 2018.

MCARTHUR, A. G. et al. The comprehensive antibiotic resistance database. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s.l.], v. 57, no 7, p. 3348–3357, 2013.

MCMURDIE, P. J.; HOLMES, S. phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. **PloS one**, v. 8, n. 4, p. e61217, 2013.

MCGOWIN, Chris L.; ANDERSON-SMITS, Colin. *Mycoplasma genitalium*: an emerging cause of sexually transmitted disease in women. **PLoS pathogens**, v. 7, n. 5, p. e1001324, 2011.

MONDEJA, BA et al. Antimicrobial susceptibility patterns of recent Cuban *Mycoplasma genitalium* isolates determined by a modified cell-culture-based method. **PLoS One**. 2016

MURRAY, G. L. et al. gyrA mutations in *Mycoplasma genitalium* and their contribution to moxifloxacin failure: Time for the next generation of resistance-guided therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 76, n. 12, p. 2187-2195, 2023.

MURRAY, Gerald L. et al. Aumento da resistência a macrolídeos e fluoroquinolonas em *Mycoplasma genitalium*. **Doenças infecciosas emergentes**, v. 23, n. 5, pág. 809, 2017.

MIYAKE, M. et al. *Mycoplasma genitalium* infection and chronic inflammation in human prostate cancer: detection using prostatectomy and needle biopsy specimens. **Cells**, v. 8, n. 3, p. 212, 2019.

MULCAHY-O'GRADY, Heidi; WORKENTINE, Matthew L. The challenge and potential of metagenomics in the clinic. **Frontiers in immunology**, v. 7, p. 29, 2016.

NELSON, David E. et al. Characteristic male urine microbiomes associate with asymptomatic sexually transmitted infection. **PloS one**, v. 5, n. 11, p. e14116, 2010.

NGOBESE, B. et al. Low prevalence of macrolide resistance in *Mycoplasma genitalium* infections in a cohort of pregnant women living with human immunodeficiency virus. **International journal of STD & AIDS**, v. 33, n. 14, p. 1174-1182, 2022.

ONG, J. J. et al. Impact of screening on the prevalence and incidence of *Mycoplasma genitalium* and its macrolide resistance in men who have sex with men living in Australia: a mathematical model. **EClinicalMedicine**, v. 33, 2021.

PERIS, M. P. et al. Retrospective and Comparative Study of Three Molecular Assays for the Macrolide Resistance Detection in *Mycoplasma genitalium* Positive Urogenital Specimens. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 8, p. 7218, 2023.

PEREIRA, Rute; OLIVEIRA, Jorge; SOUSA, Mário. Bioinformatics and computational tools for next-generation sequencing analysis in clinical genetics. **Journal of clinical medicine**, v. 9, n. 1, p. 132, 2020.

PHAM, Cau D. et al. Atypical mutation in *Neisseria gonorrhoeae* 23S rRNA associated with high-level azithromycin resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 65, n. 2, p. 10.1128/aac. 00885-20, 2021.

PITT, R. et al. Detection of markers predictive of macrolide and fluoroquinolone resistance in *Mycoplasma genitalium* from patients attending sexual health services in England. **Sexually transmitted infections**, v. 94, n. 1, p. 9-13, 2018.

PITT, R. et al. Challenges of in vitro propagation and antimicrobial susceptibility testing of *Mycoplasma genitalium*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 77, n. 11, p. 2901-2907, 2020.

POND, M. J. et al. High prevalence of antibiotic-resistant *Mycoplasma genitalium* in nongonococcal urethritis: The need for routine testing and the inadequacy of current treatment options. **Clinical Infectious Diseases**, v. 58, n. 5, p. 631–637, 2014.

PRJIBELSKI, Andrey et al. Using SPAdes de novo assembly. **Current protocols in bioinformatics**, v. 70, n. 1, p. e102, 2020.

RANE S. et al. Characteristics of acute nongonococcal urethritis in men differ by sexual preference. **Journal of clinical microbiology**, v. 52, n. 8, p. 2971-2976, 2014.

RAZIN, S.; YOGEV, D.; NAOT, Y. Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 4, p. 1094 LP – 1156, 1 dez. 1998.

READ, T. RH et al. Use of pristinamycin for macrolide-resistant *Mycoplasma genitalium* infection. **Emerging infectious diseases**, v. 24, n. 2, p. 328, 2018.

REDDY S.P.; R. W.G.; BASEMAN J.B. Molecular cloning and characterization of an adherence-related operon of *Mycoplasma genitalium*. **Journal of bacteriology**. 1995 Oct;177(20):5943-51.

SANDRI, A. et al. *Mycoplasma genitalium* antibiotic resistance-associated mutations in genital and extragenital samples from men-who-have-sex-with-men attending a STI clinic in Verona, Italy. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 13, p. 1155451, 2023.

SANGER, Frederick; NICKLEN, Steven; COULSON, Alan R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SAMRA, Z. et al. Non-occurrence of *Mycoplasma genitalium* in clinical specimens. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 7, n. 1, p. 49-51, 1988

SCHWEBKE, J. R. et al. Re-evaluating the treatment of nongonococcal urethritis: emphasizing emerging pathogens—a randomized clinical trial. **Clinical Infectious Diseases**, v. 52, n. 2, p. 163-170, 2011.

SEEMANN, TORSTEN. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. **Bioinformatics**, v. 30, n. 14, p. 2068-2069, 2014.

SEGATA, NICOLA et al. PhyloPhlAn is a new method for improved phylogenetic and taxonomic placement of microbes. **Nature communications**, v. 4, n. 1, p. 1-11, 2013.

SETHI, S.; ZAMAN, K.; JAIN, N. *Mycoplasma genitalium* infections: current treatment options and resistance issues. **Infection and drug resistance**, p. 283-292, 2017.

SVENSTRUP, Helle Friis et al. *Mycoplasma genitalium* attaches to human spermatozoa. **Human Reproduction**, v. 18, n. 10, p. 2103-2109, 2003.

SHAHMANESH, M. UK National Guideline on the Management of Non-gonococcal Urethritis. 2008.

SIQUEIRA, F. M et al. New insights on the biology of swine respiratory tract mycoplasmas from a comparative genome analysis. **BMC Genomics, BioMed Central**, v. 14, n. 1, p. 175, 2013.

SRINIVASAN, S. et al. Urethral microbiota in men: Association of *Haemophilus influenzae* and *Mycoplasma penetrans* with nongonococcal urethritis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 73, n. 7, p. e1684-e1693, 2021.

SVENSTRUP, H. F. et al. *Mycoplasma genitalium* attaches to human spermatozoa. **Human Reproduction**, v. 18, n. 10, p. 2103-2109, 2003.

STEIN, M. A., and Joel B. B. "The evolving saga of *Mycoplasma genitalium*." **Clinical Microbiology Newsletter** 28, no. 6 (2006): 41-48.

TAGG, KA et al. Fluoroquinolone and macrolide resistance-associated mutations in *Mycoplasma genitalium*. **Journal of clinical microbiology**. Jul 2013.

TAMURA, K.; STECHER, G.; KUMAR, S.. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. **Molecular biology and evolution**, v. 38, n. 7, p. 3022-3027, 2021.

TAYLOR-ROBINSON, D. et al. Urogenital mycoplasma infections of man: a review with observations on a recently discovered mycoplasma. **Israel journal of medical sciences**, v. 17, n. 7, p. 524-530, 1981.

TAYLOR-ROBINSON, D. Infections due to species of *Mycoplasma* and *Ureaplasma*: An update. **Clinical Infectious Diseases**, v. 23, n. 4, p. 671–684, 1996.

TAYLOR-ROBINSON, D.; JENSEN, J. S. *Mycoplasma genitalium*: From chrysalis to multicolored butterfly. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 3, p. 498–514, 2011.

TOUATI, A. et al. Direct detection of macrolide resistance in *Mycoplasma genitalium* isolates from clinical specimens from France by use of real-time PCR and melting curve analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 1529–1555, 2014.

TOH, Evelyn et al. Sexual behavior shapes male genitourinary microbiome composition. **Cell Reports Medicine**, v. 4, n. 3, 2023.

TULLY, J. et al. A newly discovered mycoplasma in the human urogenital tract. **The Lancet**, v. 317, n. 8233, p. 1288-1291, 1981.

TULLY, J. G. et al. *Mycoplasma genitalium*, a new species from the human urogenital tract. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 33, n. 2, p. 387-396, 1983.

UNEMO, M.; JENSEN, J. S. Antimicrobial-resistant sexually transmitted infections: Gonorrhoea and *Mycoplasma genitalium*. **Nature Reviews Urology**, v. 14, n. 3, p. 139–152, 2017.

WAGLECHNER, N.; WRIGHT, G. D. Resistência a antibióticos: é ruim, mas por que não é pior?. **biologia BMC**, v. 15, n. 1, pág. 1-8, 2017.

WOOD, D. Improved metagenomic analysis with Kraken 2. **Genome biology**, v. 20, n. 1, p. 1-13, 2019.

WROBLEWSKI, Jennifer K.H. et al. Comparison of transcription-mediated amplification and PCR assay results for various genital specimen types for detection of *Mycoplasma genitalium*. **Journal of Clinical Microbiology**, [s. l.], v. 44, n. 9, p. 3306–3312, 2006.

WANG, Richard Y.-H. et al. *Mycoplasma genitalium* infection and host antibody immune response in patients infected by HIV, patients attending STD clinics and in healthy blood donors. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 237-245, 1997.

YOW, M.A et al. Characterisation of microbial communities within aggressive prostate cancer tissues. **Infect. Agents Cancer** 2017, 12, 4.