

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

BIANCA SANTOS DA COSTA

**Resistência Às Polimixinas Em Espécies Do Complexo *Enterobacter cloacae*
E *Klebsiella aerogenes* No Brasil: Caracterização Fenotípica E Molecular**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como
parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em
Biologia Celular e Molecular

Orientador (es): Dra. Ana Paula D'Alincourt Carvalho Assef

RIO DE JANEIRO

2021

da Costa, Bianca Santos .

Resistência Às Polimixinas Em Espécies Do Complexo *Enterobacter cloacae* E *Klebsiella aerogenes* No Brasil: Caracterização Fenotípica E Molecular / Bianca Santos da Costa. - Rio de Janeiro, 2021.

xv, 70f f.; il.

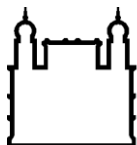
Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2021.

Orientadora: Ana Paula D'Alincourt Carvalho Assef.

Bibliografia: f. 59-70

1. Resistência à polimixina. 2. Complexo *Enterobacter cloacae*. 3. *Klebsiella aerogenes*. 4. Carbapenemases . I. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/Icict/Fiocruz com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Igor Falce Dias de Lima - CRB-7/6930.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

BIANCA SANTOS DA COSTA

**Resistência Às Polimixinas Em Espécies Do Complexo *Enterobacter cloacae*
E *Klebsiella aerogenes* No Brasil: Caracterização Fenotípica E Molecular**

ORIENTADOR (ES): Dra. Ana Paula D'Alincourt Carvalho Assef

Aprovada em: 26/03/2021

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Viviane Zahner – Presidente – Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)

Prof. Dr. Mara Lucia Penna Queiroz – Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ)

Prof. Dr. Robson de Souza Leão – Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ)

Prof. Dr. Elizabeth de Andrade Marques (suplente) – Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ)

Prof. Dr. Teca Calcagno Galvão (suplente) – Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)

Rio de Janeiro, 26 de Março de 2021

Dedico essa dissertação de mestrado à minha família.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus e aos Orixás por terem me guiado até aqui, dando sabedoria na caminhada e força nas dificuldades.

Aos meus pais e ao meu irmão que são minha base, que acreditaram e investiram em mim mesmo com poucas condições. Os que mesmo sem entender minhas ansiedades quanto aos prazos, a vida acadêmica de modo geral, me apoiaram e estiveram sempre ao meu lado. A eles sou eternamente grata.

Aos meus amigos que estiveram comigo nos choros ao achar que os experimentos não dariam certo. Que me levaram para distrair minha mente.

A minha orientadora Dra. Ana Paula D'Alincourt Carvalho Assef que me deu a oportunidade de participar do laboratório quando a procurei e sempre esteve presente quando precisei ao longo das necessidades do projeto.

Aos meus amigos do LAPIH: Claudio, Leilane e Thamirys que sempre estiveram dispostos a me ajudar quando precisei, a me explicar alguns protocolos e me passar conhecimentos. Aprendi muito com vocês.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do IOC pelo apoio e pela secretária Julimar, sempre competente e disposta a ajudar, mesmo a gente perguntando 50 vezes a mesma coisa.

A todos que de alguma forma fizeram parte de todo esse processo até aqui.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

"A vida é igual a um livro. Só depois de ter lido é que sabemos o que encerra. E nós quando estamos no fim da vida é que sabemos como a nossa vida decorreu. A minha até aqui, tem sido preta. Preta é a minha pele. Preto é o lugar onde eu moro"

Carolina Maria de Jesus

LISTA DE ABREVIATURAS

AK	Amicacina
ATM	Aztreonam
BGN-NF	Bacilos Gram-Negativo Não Fermentador
C	Cloranfenicol
CAMHB	<i>Cation Adjusted Mueller-Hinton Broth</i>
CAZ	Ceftazidima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIP	Ciprofloxacina
CLSI	<i>Clinical And Laboratory Standards Institute</i>
CN	Gentamicina
EDTA	Do Inglês <i>Ethylenediamine Tetraacetic Acid</i> , Traduzido Para Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EMB	<i>Eosin Methylene Blue</i>
ERT	Ertapenem
ESBL	Betalactamases De Espectro Estendido
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
FEP	Cefepima
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
IMI	Imipenem-Hydrolyzing- β -Lactamase
IMP	Imipenem
IRAS	Infecções Relacionadas À Assistência À Saúde
KPC	<i>Klebsiella Pneumoniae</i> Carbapenemase
L-Ara4N	4-Amino-4-Deoxy-L-Arabinose
LPS	Lipopolissacarídeo
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry</i>
MEM	Meropenem
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
NDM	New Delhi Metallo-B-Lactamase
OMS	Organização Mundial De Saúde
OXA	Oxacilina
PCR	Do Inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i> , Traduzido Para Reação Em Cadeia Da Polimerase

PEtN	Fosfoetanolamina
PFGE	<i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i>
PROVEAN	<i>Protein Variation Effect Analyser</i>
SIM	Ágar Indol Sulfeto Motilidade
SXT	Sulfametoxazol-Trimetoprim
TBE	Tris Borate Edta Buffer
TGC	Tigeciclina
TOB	Tobramicina
TSI	<i>Triple Sugar Iron</i>
TZP	Piperacilina-Tazobactam
VIM	Verona Integron-Encoded Metallo-B-Lactamase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Sistema de dois componentes PhoP/PhoQ e PmrA/PmrB associado à resistência a polimixina em bactérias Gram negativas. Fonte: OLAITAN et al. (2014).	10
Figura 3.1: Esquema de preparo das soluções de uso para microdiluição	15
Figura 3.2: Esquema da organização da placa de 96 poços	16
Figura 4.1: Árvore Neighbor-joining construída com a análise parcial do gene <i>hsp60</i> das 19 amostras selecionadas e identificadas como complexo <i>E. cloacae</i> . A árvore foi construída baseada no método estatístico Neighbor-joining, com 100 replicatas Bootstrap.....	32
Figura 4.2: Dendrograma mostrando os perfis de fragmentação do DNA encontrados entre as 19 amostras do complexo <i>E. cloacae</i> resistentes a colistina.	43
Figura 4.3: Dendrograma mostrando os perfis de fragmentação do DNA encontrados entre 4 amostras de <i>K. aerogenes</i> resistentes a colistina.	44
Figura 4.4 Full Minimum Spanning Tree (Full-MST) Parcial obtida através do software PHYLOViZ. Complexos clonais em <i>E. cloacae</i> . Os STs com círculos vermelhos tracejados foram os encontrados no presente estudo.....	46
Figura 4.5: Full Minimum Spanning Tree (Full-MST) Parcial obtida através do software PHYLOViZ. Complexos clonais <i>K. aerogenes</i> . Os STs com círculos vermelhos tracejados foram os encontrados no presente estudo.....	47

LISTA DE TABELAS

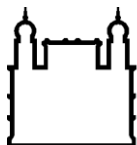
Tabela 3.1 Informações das sequencias referências selecionadas para análise dos resultados do sequenciamento do gene <i>hsp60</i>	18
Tabela 3.2: Lista dos antimicrobianos utilizados no presente estudo para determinar o perfil de resistência entre as amostras de <i>K. aerogenes</i> e do complexo <i>E. cloacae</i>	19
Tabela 3.3 Iniciadores para detecção de genes codificadores de carbapenemases.....	22
Tabela 3.4 Iniciadores para detecção dos genes plasmidiais de resistência a polimixina	22
Tabela 3.5 Sequência de iniciadores para amplificação e sequenciamento dos genes associados a resistência à polimixina para as espécies do complexo <i>E. cloacae</i>	24
Tabela 3.6: Sequências das amostras tipo das amostras identificadas no complexo <i>E. cloacae</i> ..	24
Tabela 3.7: Iniciadores para MLST (PCR e sequenciamento)	27
Tabela 4.1 Resultado da seleção de amostras para o estudo após triagem no meio seletivo e microdiluição em caldo.	30
Tabela 4.2: Espécimes clínicos de origem das 23 amostras de Complexo <i>E. cloacae</i> e <i>K. aerogenes</i> resistentes à colistina.	30
Tabela 4.3: Estados de origem das 23 amostras de Complexo <i>E. cloacae</i> e <i>K. aerogenes</i> resistentes à colistina.	31
Tabela 4.4: Características de origem de isolamento dos Clusters identificados entre as amostras do complexo <i>E. cloacae</i>	33
Tabela 4.5: Perfil de susceptibilidade das 23 amostras de Complexo <i>E. cloacae</i> e <i>K. aerogenes</i> resistentes à colistina.	34
Tabela 4.6: Perfil de susceptibilidade das diferentes espécies do complexo	37
Tabela 4.7: Característica das amostras produtoras de carbapenemases.....	38
Tabela 4.8: Modificações encontradas nas proteínas dos sistemas de dois componentes relacionadas a resistência a polimixina entre as espécies do complexo <i>E. cloacae</i>	41
Tabela 4.9: Características fenotípicas das amostras de <i>E. cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i> pertencentes ao clone EcD	43
Tabela 4.10 Relação entre os clones identificados por PFGE e os ST encontrados entre as amostras do complexo <i>E. cloacae</i>	45
Tabela 4.11: Relação entre os clones identificados por PFGE e os ST encontrados entre as amostras de <i>K. aerogenes</i>	47

LISTA DE GRÁFICO

Gráfico 4.1: Variação entre as CIM das amostras do complexo <i>E. cloacae</i> e <i>K. aerogenes</i> resistentes à colistina.	29
Gráfico 4.2: Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das amostras do complexo <i>E. cloacae</i> e <i>K. aerogenes</i>	34
Gráfico 4.3: Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dentre as amostras resistentes à colistina produtoras e não produtoras de carbapenemases	39
Gráfico 4.4: Comparação das concentrações inibitórias mínimas de colistina entre as amostras produtoras e não produtoras de carbapenemases resistentes à colistina.....	39

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. GÊNERO <i>ENTEROBACTER</i>	2
1.2. A RESISTÊNCIA AOS BETALACTÂMICOS	5
1.3. POLIMIXINAS	7
1.4. NOVAS OPÇÕES TERAPÊUTICAS	12
1.5. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA	12
2. OBJETIVOS.....	13
2.1. OBJETIVO GERAL.....	13
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1. SELEÇÃO DE AMOSTRAS.....	14
3.2. DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES INIBITÓRIAS MÍNIMAS (CIMS) PARA COLISTINA .	14
3.3. CONFIRMAÇÃO DAS ESPÉCIES	17
3.4. TESTES DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS.....	19
3.5. BLUE-CARBA	20
3.6. DETECÇÃO DOS GENES PLASMIDIAIS DE RESISTÊNCIA AOS CARBAPENEMAS (<i>BLA_{KPC}</i> , <i>BLA_{NDM}</i> E <i>BLA_{OXA-48}</i>) E POLIMIXINA (<i>MCR-1</i> AO <i>MCR-9</i>).....	21
3.7. ANÁLISE DE MUTAÇÕES NOS GENES <i>PHOP</i> , <i>PHOQ</i> , <i>PMRA</i> , <i>PMRB</i>	23
3.8. DETERMINAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA	25
4. RESULTADOS.....	29
4.1. SELEÇÃO DE AMOSTRAS.....	29
4.2. IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DO COMPLEXO <i>E. CLOACAE</i>	31
4.3. DETERMINAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS	33
4.4. CONFIRMAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CARBAPENEMASES.....	35
4.5. DETECÇÃO DO GENE <i>MCR</i> (VARIANTES DE 1-9)	40
4.6. ANÁLISE DE MUTAÇÕES NOS GENES <i>PHOPQ</i> E <i>PMRAB</i> DE COMPLEXO <i>E. CLOACAE</i>	40
4.7. AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA	42
5. DISCUSSÃO.....	48
6. CONCLUSÃO	56
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

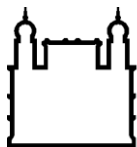
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Resistência Às Polimixinas Em Espécies Do Complexo *Enterobacter cloacae* E *Klebsiella aerogenes* No Brasil: Caracterização Fenotípica E Molecular

RESUMO - DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Bianca Santos da Costa

A produção de carbapenemases por enterobactérias é um problema de saúde pública global, uma vez que reduz as opções terapêuticas para tratamento das infecções causadas por essas bactérias, sendo necessário utilizar compostos de polimixinas como uma das últimas opções disponíveis. Nós investigamos a frequência e os mecanismos relacionados à resistência às polimixinas em amostras do complexo *Enterobacter cloacae* e *Klebsiella aerogenes* encaminhadas ao Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar (LAPIH/FIOCRUZ) no período de 2016 a 2018. A seleção das amostras foi realizada com a semeadura de 124 amostras (94 do complexo *E. cloacae* e 30 *K. aerogenes*) em meio de cultura EMB acrescido de 4 µg/mL de sulfato de colistina e submetidas posteriormente ao teste de microdiluição em caldo para a determinação da concentração mínima inibitória. O perfil de susceptibilidade a 17 antimicrobianos foi realizado através do teste disco difusão em ágar. Foi realizado PCR para detecção dos genes codificadores de carbapenemases (*bla_{KPC}*, *bla_{NDM}* e *bla_{OXA-48}*) e genes plasmidiais de resistência às polimixinas *mcr* (variantes alélicas 1-9). Foi realizado o sequenciamento do gene *hsp60* para identificação das espécies do complexo *E. cloacae* e a determinação da diversidade genética foi realizada por PFGE e MLST. Das 124 amostras, 23 (19%) foram consideradas resistentes à colistina (19/94 complexo *E. cloacae* e 4/30 *K. aerogenes*) após a microdiluição em caldo com CIM variando de 4 a 128 µg/mL. *E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii* foi a espécie mais frequente no complexo, seguido de *E. cloacae* subsp. *cloacae*. Os antimicrobianos com menor taxa de resistência foram gentamicina (22%), amicacina (22%) e tigeciclina (22%). Pelo teste fenotípico BlueCarba foram detectadas 8 amostras produtoras de carbapenemases (serinobetalactamase=6 e metalobetalactamase=2). Através da PCR, essas carbapenemases foram identificadas como *bla_{KPC}* n=6 e *bla_{NDM}* n=2. Apenas em uma amostra foi detectado o gene *mcr-9*. Dentre as modificações encontradas em PmrA, PmrB, PhoP e PhoQ (proteínas do sistema de dois componentes), foi encontrada a substituição S175I em foi considerada deletéria entre as amostras de *E. cloacae* subsp. *cloacae*. Foram identificados 13 perfis por PFGE no complexo *E. cloacae*, sendo o EcD (*E. cloacae* subsp. *cloacae*) o mais frequente. Em *K. aerogenes*, 4 perfis foram identificados. Por MLST, 11 ST's foram identificados (1 novo) em *E. cloacae* e 2 em *K. aerogenes*, sendo 1 novo. A taxa de resistência à polimixina, associada à resistência à maioria dos antimicrobianos testados e à presença de carbapenemases alerta para necessidade de mais estudos com objetivo de elucidar os mecanismos envolvidos com a resistência a polimixina no complexo *E. cloacae* e *K. aerogenes* e desenvolvimento de medidas para controle e prevenção de infecções causadas por bactérias multirresistentes.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Resistência Às Polimixinas Em Espécies Do Complexo *Enterobacter cloacae* E *Klebsiella aerogenes* No Brasil: Caracterização Fenotípica E Molecular

ABSTRACT - DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Bianca Santos da Costa

The carbapenemases production by *Enterobacteriaceae* is a global public health problem, since it reduces the therapeutic options for treating infections caused for these bacteria, been necessary to use polymyxin compounds as one of the option available. Here we investigated the colistin resistance rate and mechanisms related to resistance among *Enterobacter cloacae* complex and *Klebsiella aerogenes* isolates. The isolates selection was carried out by screening 124 isolates (94 *E. cloacae* complex and 30 *K. aerogenes*) in EMB agar containing 4µg/mL of colistin sulfate followed by broth microdilution test for determining the Minimum Inhibitory Concentration (MIC). The susceptibility to 17 antimicrobials was performed by disk diffusion test. PCR was performed to detect carbapenemases encoding genes (*bla_{KPC}*, *bla_{NDM}* and *bla_{OXA-48}*) and plasmidial genes for resistance to polymyxins (*mcr1-9*). The *hsp60* gene was sequenced to identify species of the *E. cloacae* complex. Genetic diversity was evaluated by PFGE and MLST. Among 124 isolates evaluated, 23 (19%) were colistin resistant. While 19 of 94 (20%) *E. cloacae* complex isolates were colistin-resistant, only 4 of 30 (13%) *K. aerogenes* isolates showed resistance with MIC ranging from 4 to 128µg / mL. *E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii* was the prevalent species in the complex, followed by *E. cloacae* subsp. *cloacae*. The antimicrobials with the highest susceptibility rate were gentamicin (22%), amikacin (22%) and tigecycline (22%). By Blue Carba were detected 8 isolates positive for carbapenemases. Carbapenemases encoding genes (*bla_{KPC}* n = 6, *bla_{NDM}* n = 2) were detected in 8 isolates and *mcr-9* in one. Among the modifications found in PmrA, PmrB, PhoP e PhoQ (two-component regulatory system), only the S175I substitution in PmrB found in *E. cloacae* subsp. *cloacae* isolates was considered deleterious. By PFGE, 13 profiles were found among *E. cloacae* complex isolates, with EcD the most frequent. In *K. aerogenes*, 4 profiles were identified. By MLST, 11 ST's were identified (1 new ST) in *E. cloacae* and 2 in *K. aerogenes* (1 new ST). The polymyxin-resistance rate, associated with resistance to most of antimicrobials tested and the presence of carbapenemases, warns of need to elucidate the mechanisms involved in the resistance to polymyxin in the *E. cloacae* complex and *K. aerogene* for development measures to control and prevent infections caused by these multiresistant bacteria.

1. INTRODUÇÃO

As Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) são reconhecidas como um problema de saúde pública mundial por crescer aos números de letalidade hospitalar, duração da internação e custos financeiros (1). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), centenas de milhões de pessoas são afetadas a cada ano em todo mundo e cerca de 10% dos pacientes hospitalizados em países em desenvolvimento irão adquirir IRAS (1). Vários fatores estão associados às IRAS, como imunossupressão, o uso prolongado de antibióticos e aumento da resistência a antimicrobianos, assim como fatores relacionados à infraestrutura e condições higiênicas, representando um alto custo financeiro adicional para saúde pública e para os pacientes (1).

A resistência é um fenômeno natural, entretanto o uso em excesso e muitas vezes inadequado dos antimicrobianos tem acelerado esse fenômeno. Os antimicrobianos geram uma pressão seletiva sobre as bactérias, selecionando aquelas que conseguem sobreviver aos seus efeitos (2). Dados da OMS indicam que esse fenômeno é responsável por 700 mil mortes por ano, com uma projeção de atingir 10 milhões até 2050 a menos que medidas efetivas de prevenção sejam implementadas imediatamente (3).

Dentro desse cenário, espécies da ordem Enterobacterales possuem grande importância por serem causadoras de infecções sanguíneas, pneumonia e infecções de trato urinário (4). Esses microrganismos são isolados em cerca de 50% dos pacientes com IRAS e compreendem 80% de todos os isolados dentre as bactérias Gram-negativas (5)

Recentemente, um estudo taxonômico avaliou a ordem Enterobacterales propondo outras famílias, além de *Enterobacteriaceae* para essa ordem: *Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., *Morganellaceae* fam. nov. e *Budviciaceae* fam. nov. Assim também como a modificação da nomenclatura da ordem para Enterobacterales, adequando-a as regras Código Internacional de Nomenclatura de Bactérias (International Code of Nomenclature of Bacteria) (6).

Em 2017, a OMS divulgou uma lista de patógenos prioritários para pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos. Nessa lista, dividida em 3 categorias, gêneros da família *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenemas e a terceira geração de cefalosporinas são considerados como prioridade crítica, incluindo *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Enterobacter* spp. (7).

O gênero *Enterobacter* pertence ao grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter spp*), no qual estão as principais espécies causadoras de infecções clínicas. (8–10).

1.1. Gênero *Enterobacter*

As espécies do gênero *Enterobacter* são bacilos Gram negativos que pertencem a Ordem Enterobacterales, família *Enterobacteriaceae*, anaeróbicos facultativos, não formadores de esporos, móveis pela presença de flagelos peritríquios (8), catalase positivos, oxidase e DNase negativos, não pigmentados (11). São encontrados em diferentes habitats, como solo e água, algumas espécies deste gênero são fitopatógenos (12) e comensais na microbiota intestinal (11).

Desde a descrição do gênero proposto por Hormaeche e Edwards em 1960, alterações taxonômicas tem sido observadas, a exemplo da espécie *Enterobacter sazakii* transferida para o gênero *Cronobacter*, *Enterobacter agglomerans* transferida para o gênero *Pantoea* (8) e *Enterobacter aerogenes* recentemente renomeado como *Klebsiella aerogenes* (13). Assim como a descrição de novas espécies, como *E. bugandensis* (14) e *E. chengduensis* (15).

Atualmente o gênero é composto de 13 espécies: *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter bugandensis*, *Enterobacter cancerogenus*, *Enterobacter chengduensis*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter hormaechei*, *Enterobacter kobei*, *Enterobacter ludwigii*, *E. mori*, *Enterobacter nimipressuralis*, *Enterobacter roggkampii*, *Enterobacter sichuanensis*, *Enterobacter xiangfangensis* (8,15,16). Seis dessas espécies: *E. cloacae*, *E. asburiae*, *E. hormaechei*, *E. kobei*, *E. ludwigii*, e *E. nimipressuralis* são agrupadas no complexo *E. cloacae* por serem genotipicamente semelhantes com mais de 60% de similaridade com base na hibridização DNA-DNA com *E. cloacae* e compartilham características fenotípicas que dificultam sua identificação na rotina, identificando-as como complexo *E. cloacae* (8).

A similaridade fenotípica entre as espécies do complexo *E. cloacae* dificulta a identificação dessas espécies. Pouco se sabe sobre o perfil de resistência aos antimicrobianos, a prevalência das espécies em IRAS entre as espécies de *Enterobacter spp*, principalmente as incluídas no complexo, apesar da relevância clínica do complexo. A identificação por características fenotípicas não diferencia todas as espécies do complexo (8,11).

A técnica de *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF MS) tem sido aplicada na microbiologia clínica para identificação de microrganismos de importância clínica, substituindo os métodos convencionais de análise

bioquímica e fenotípica, como um método simples e rápido (17–19). Em relação à identificação das espécies do complexo *E. cloacae*, Pavlovic e colaboradores em 2012, avaliando o uso do MALDI-TOF e à PCR em tempo real para identificação das amostras referências das espécies do complexo, encontrou dados em que o uso exclusivo do MALDI-TOF não discriminou corretamente as espécies do complexo, identificando corretamente e distinguindo apenas *E. cloacae* e *E. nimipressuralis* (20).

Por sequenciamento do gene 16S rRNA é possível discriminar algumas espécies de *Enterobacter*. Contudo, não diferencia as espécies agrupadas no complexo *E. cloacae* (8).

Baseado no sequenciamento parcial do gene *hsp60*, também conhecido como *groEL* ou *cpn60* (gene que codifica a proteína de choque térmico) em amostras identificadas como *E. cloacae*, Hoffmann e Roggenkamp (2003) descreveram 12 *clusters* (I – XII), nos quais cada *cluster* corresponde a uma espécie ou subespécie de *Enterobacter* spp: *E. asburiae* (Cluster I), *E. kobei* (Cluster II), *E. cloacae* cluster III, *E. cloacae* cluster IV, *E. ludwigii* (Cluster V), *E. hormaechei* subsp. *oharae* (Cluster VI), *E. hormaechei* subsp. *hormaechei* (Cluster VII), *E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii* (Cluster VIII), *E. cloacae* cluster IX, *E. nimipressuralis* (Cluster X), *E. cloacae* subsp. *cloacae* (Cluster XI) e *E. cloacae* subsp. *dissolvens* (Cluster XII) (8,21).

Desde o estudo de Hoffmann e Roggenkamp (2003), os *clusters* sem uma espécie específica representante (*E. cloacae* cluster III, *E. cloacae* cluster IV, *E. cloacae* cluster IX) foram renomeados conforme as espécies foram identificadas. O cluster III - *E. hormaechei* subsp. *hoffmannii*, Cluster IV - *E. roggkampii* e o Cluster IX - *E. bugandensis* (8,14,22).

A espécie *E. cloacae*, foi descrita em 1890 por Jordan como *Bacillus cloacae* e desde esse momento, outras alterações aconteceram até 1960, quando *E. cloacae* foi proposto junto a definição do gênero *Enterobacter* e é usado até o momento (11,23). Esta espécie é dividida em duas subespécies: *E. cloacae* subsp. *cloacae* e *E. cloacae* subsp. *dissolvens* (8). É um microrganismo ubíquo sendo amplamente encontrado em diferentes ambientes, tanto aquáticos quanto terrestre, considerado patógeno de plantas e insetos, bem como em humanos, sendo responsável por infecções no trato urinário, respiratório, endocardites, pele e tecidos moles (11). Causa frequentemente surtos em unidades neonatais (24,25).

Descrito por Brenner em 1986, *E. asburiae* é uma espécie isolada no ambiente, principalmente no solo. Entretanto, há registros de infecções causadas por essa espécie em pacientes com endocardites e transplante de medula óssea (26–29).

E. hormaechei (1990) é o nome dado em homenagem ao microbiologista Estenio Hormaeche que, junto a Edwards, propôs e definiu o gênero *Enterobacter* em 1960 (11,23). Essa espécie consiste em três subespécies: *E. hormaechei* subsp. *oharae*, *E. hormaechei* subsp. *hormaechei* e *E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii*. Essas correspondem aos clusters VI, VII e VIII descritos por Hoffmann e Roggenkamp (21). Recentemente, foram descritas duas novas subespécies de *E. hormaechei*: *E. hormaechei* subsp. *xiangfangensis* e *E. hormaechei* subsp. *hoffmannii* (22). Seguido de *E. cloacae*, *E. hormaechei* é frequentemente isolado como patógeno em IRAS, principalmente em UTI de neonatos (30–32).

E. kobei foi proposto por Kosako e colaboradores em 1996 em homenagem a cidade de Kobe no Japão, pois seu primeiro relato foi em amostras sanguíneas de um paciente com diabetes na cidade de Kobe (26,33). Há descrições desta espécie causando infecções no trato urinário (8).

Hoffmann *et al* em 2005 propuseram a espécie *E. ludwigii* em homenagem a Wolfgang Ludwig, um microbiologista que contribuiu para compreensão da sistemática bacteriana (34). O primeiro isolado descrito (EN-119T) foi obtido de amostra de urina de um paciente com infecção urinária em um hospital da Alemanha (26).

E. nimipressuralis é frequentemente isolada como patógeno em plantas (35). Foi descrita como *Erwinia nimipressuralis* e reclassificada como *E. nimipressuralis* por Brenner e colaboradores em 1986 baseado em análises de hibridizações DNA-DNA (29). Em 2010, foi reportado um caso de pseudobacteremia causada por um isolado desta espécie (36). Não diferente de outras espécies do gênero, tem sido proposta a reclassificação de *E. nimipressularis* como *Lelliottia nimipressularis* baseado em análise de MLSA (16).

1.1.1. *K. aerogenes* (antigo *Enterobacter aerogenes*)

Antes nomeado como *Aerobacter aerogenes*, a posição taxonômica do atual *K. aerogenes* tem sido discutida desde 1960 quando foi nomeado como *E. aerogenes* por Hormaeche e Edwards (23). Contudo, recentemente, no estudo de Diene e colaboradores em 2013, a análise do sequenciamento de genoma total de amostras clínicas resistentes a múltiplos antimicrobianos sugeriram reclassificar *E. aerogenes* para o gênero *Klebsiella* como *K. aeromobilis* (37).

A dificuldade de classificação desta espécie tem sido atribuída à aquisição sucessiva de genes de outras espécies de Enterobacterales por elementos genéticos móveis que são eficientemente integrados e transcritos (8,37,38). Tindall e colaboradores em 2017,

considerando esses estudos ao longo do tempo sobre a reclassificação de *E. aerogenes* e os requisitos taxonômicos para classificação e nomeação das espécies, discutiram sobre a substituição do epíteto *mobilis* proposto por Bascomb e colaboradores (1971) para *aerogenes*, nomeando a espécie como *K. aerogenes* (13). O CLSI e EUCAST incluíram nos seus documentos essa modificação a partir de 2018. Contudo, até o momento as publicações científicas frequentemente ainda usam o nome *E. aerogenes* ao invés de *K. aerogenes* (8).

Frequentemente nos estudos ao avaliar frequência de resistência aos antimicrobianos, *K. aerogenes* (antes *E. aerogenes*) e o complexo eram agrupados em *Enterobacter* spp o que gera uma dificuldade em avaliar esse fator comparando os dois grupos. Junto ao complexo *E. cloacae*, *K. aerogenes* são frequentemente isolados em IRAS com perfis de resistência a antimicrobianos, chamando atenção aos carbapenemas. Em um boletim da Anvisa em 2017, apesar de inserir *K. aerogenes* dentro de *Enterobacter* spp, apresenta *K. aerogenes* e *E. cloacae* como esse grupo entre os mais isolados em UTIs de Adulto, pediátrico e neonatal com perfis de resistência aos carbapenemas (39).

1.2. A resistência aos betalactâmicos

Os betalactâmicos são os antimicrobianos mais utilizados na prática clínica em todo o mundo. Estes antimicrobianos atuam na síntese da parede celular e tem como característica comum da classe a presença do anel betalactâmico com uma cadeia lateral. As penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e os carbapenemas são representantes dessa classe de antimicrobianos. O mecanismo mais frequente de resistência a esses antimicrobianos é a produção de enzimas chamadas de betalactamases que atuam hidrolisando o anel betalactâmico. Os genes que codificam essas enzimas podem ser cromossômicos ou codificados por elementos genéticos móveis, como plasmídeos, por exemplo. A essa segunda informação é importante ser levado em consideração pela possibilidade de transferência desses genes a outras espécies.

As betalactamases podem ser classificadas de acordo com sua atividade sobre as classes de betalactâmicos e inibidores, como proposto por Bush, Jacob e Medeiros em quatro grupos (1 – 4) ou baseado na estrutura química dessas enzimas, em classes de A – D, como descrito por Ambler em 1980. As betalactamases de classes A, C e D são betalactamases que possuem serina no sítio ativo, sendo chamadas de serino betalactamases. A betalactamases de classe B são metalo-betalactamases que possuem zinco no sítio ativo (40,41)

As espécies do complexo *E. cloacae* são frequentemente associadas a multirresistência. São intrinsecamente resistentes a penicilinas e a cefalosporinas de primeira geração pela expressão

constitutiva de betalactamases do tipo AmpC. A superprodução dessa enzima, por mutação no repressor *ampR* ou por indução durante o tratamento com cefalosporinas de terceira geração, causa resistência a maioria dos betalactâmicos, exceto aos carbapenêmicos e a cefalosporinas de quarta geração (8,38). Entretanto, a presença de genes que codificam AmpC carregados por plasmídeos conferindo o mesmo fenótipo de superprodução de AmpC cromossômico tem sido descrito em diferentes espécies de Enterobacterales: *K. pneumoniae*, *Salmonella enterica*, *Proteus mirabilis* e *E. coli* (38,42).

Infecções causadas por espécies do complexo *E. cloacae* e *K. aerogenes* produtoras de betalactamases de espectro estendido (ESBL) é descrita. No Brasil, as ESBLs mais comuns neste dois grupos de bactérias são as do tipo TEM e CTX-M (43–45). A produção dessas enzimas minimiza as opções para tratamento das infecções causadas por essas espécies, uma vez que tais enzimas são capazes de hidrolisar penicilinas, monobactâmicos e cefalosporinas de amplo espectro (4,43). ESBLs não agem sobre os carbapenemas, sendo esses a opção para tratamento das infecções causadas por bactérias produtoras dessas enzimas. Contudo, com o aumento do uso dos carbapenemas, observou-se a emergência de amostras de diferentes espécies de bacilos Gram-negativos resistentes a esses antimicrobianos principalmente pela produção de carbapenemases.

Dentre os mecanismos de resistência, atualmente, a produção de carbapenemases (KPC, NDM e OXA-48), é o mais preocupante, uma vez que os carbapenemas representam uma das últimas linhas de tratamento contra bacilos Gram-negativos multirresistentes e os genes que codificam as carbapenemases apresentam ampla capacidade de disseminação por estarem em elementos genéticos móveis (46).

A carbapenemase mais disseminada no Brasil e no mundo entre as espécies de Enterobacterales é a serino-carbapenemase KPC (*Klebsiella pneumoniae Carbapenemase*), sendo mais frequentemente encontrada em *K. pneumoniae* (47). Desde a primeira descrição no Brasil em 2009, por Monteiro e colaboradores, em amostras de *K. pneumoniae* isoladas em Recife em 2006, outros trabalhos foram publicados evidenciando a disseminação desse gene pelo Brasil em diferentes espécies (47,48). Há poucos dados sobre *Enterobacter* e *K. aerogenes*, mas observa-se que a carbapenemase do tipo KPC é amplamente disseminada e detectada principalmente em *K. aerogenes* quando comparado ao complexo *E. cloacae* (43,49–51).

A metalo-betalactamase NDM, inicialmente foi descrita em *K. pneumoniae* e em *E. coli* isoladas de um paciente na Suécia que havia vindo da Índia em 2008. Após sua descrição, já foi descrita em outros membros da família *Enterobacteriaceae* em diversos países. Essas

enzimas são capazes de hidrolisar todas as penicilinas, cefalosporinas e carbapenemas, mas não o monobactâmico aztreonam (46). No Brasil, o primeiro relato de NDM foi no Rio Grande do Sul em uma amostra de *Providencia rettgeri* recuperada de um fragmento de tecido de um paciente com pé diabético (52). Dentre as espécies do complexo *E. cloacae*, essa carbapenemase é frequentemente detectada em *E. hormaechei* (53–55)

As carbapenemases de classe D descritas em *Enterobacteriaceae* pertencem à família da OXA-48. O primeiro relato de OXA-48 foi em amostras de *K. pneumoniae* na Turquia em 2001 e desde então, várias variantes alélicas de OXA-48 têm sido identificadas em diversos lugares no mundo. Essas variantes se diferem pela substituição ou deleção de aminoácidos resultando na modificação no espectro atividade na hidrólise de β -lactâmicos (56). Embora menos frequente, uma nova variante de OXA-48, a OXA-370 foi identificada em uma amostra de *E. hormaechei* isoladas de pacientes em UTI, além de amostras de *E. cloacae* e *K. aerogenes* de diferentes hospitais no Brasil (57–60).

Um ponto de grande importância é a relação de clones epidêmicos e disseminação da resistência. O clone ST258 de *K. pneumoniae* (identificado por MLST) é um clone epidêmico de alto risco associado ao rápido aumento da resistência aos antimicrobianos e a disseminação da carbapenemase do tipo KPC em amostras de *K. pneumoniae* em vários países no mundo (61,62). Semelhante a esse dado, a relação entre o clone ST131 de *E. coli* e disseminação de CTX-M15 no mundo também tem sido descrita (63,64).

Com aumento da resistência aos carbapenemas devido à grande disseminação de carbapenemases, a reintrodução das polimixinas para tratamento de infecções causadas por bactérias com esse perfil se fez necessário.

1.3. Polimixinas

As polimixinas são polipeptídios catiônicos de ~1200 Da em massa, caracterizados por um anel policatiônico e uma cadeia lateral de ácidos graxos. A cadeia hidrofóbica facilita a inserção nas membranas bacterianas e o anel catiônico torna as moléculas solúveis em ambientes aquosos (65)

A primeira molécula isolada foi a polimixina B como produto sintetizado por uma bactéria Gram positiva *Bacillus polymyxa*, reclassificada como *Paenibacillus polymyxa*, e a polimixina E, também chamada de colistina, foi isolada da subespécie *Paenibacillus polymyxa* subsp *colistinus* (65,66). Há cinco variantes (A- E), mas apenas a polimixina B e polimixina E

(colistina) são utilizadas clinicamente, sendo a colistina a mais utilizada (67). Ambas se diferenciam estruturalmente pelo aminoácido presente no anel catiônico, no qual em polimixina B é uma D-fenilalanina e em colistina, uma D-leucina (65). A administração desses fármacos também é diferente, a polimixina B é administrada diretamente como sulfato de polimixina, enquanto a colistina é administrada como colistimetato (metanosulfonato de colistina) uma pró droga que é metabolizada *in vivo* e convertida em sulfato de colistina (65,68).

As polimixinas possuem amplo espectro de ação contra bactérias Gram-negativas, incluindo a maioria das espécies da ordem Enterobacterales e os Bacilos Gram-negativos não fermentadores de glicose (BGN-NF), como *Pseudomonas* spp. e *Acinetobacter* spp. No entanto, há alguns gêneros que são intrinsecamente resistentes a esse grupo de antimicrobianos: *Proteus* spp., *Providencia* spp., *Serratia* spp., *Edwardsiella* spp., *Morganella* spp., e *Hafnia* spp e *Burkholderia cepacia* (67,69).

Desde a descoberta, as polimixinas foram utilizadas no tratamento de diferentes infecções no trato gastrointestinal e no trato urinário, como também na descontaminação intestinal em pacientes tratados com imunossupressores (70). Contudo, entre as décadas de 1970 a 1980 devido aos níveis de nefrotoxicidade e neurotoxicidade por uso prolongado desse antimicrobiano, seu uso clínico foi restrito ao tratamento de infecções persistentes em pacientes com fibrose cística. Gradativamente o uso das polimixinas foi substituído por outros antimicrobianos, como os aminoglicosídeos e cefalosporinas de amplo espectro, que apresentavam o mesmo espectro de ação e menos tóxicos (65,66,70). Com esse retorno no uso das polimixinas para tratamento de infecções causadas por bactérias produtoras de carbapenemases, a resistência a esse grupo de antimicrobianos tem sido observada (66)

1.3.1. Mecanismo de ação das polimixinas

O mecanismo de ação inicial das polimixinas envolve a interação eletrostática entre os grupos amino do anel catiônico da colistina e o lipídio A do lipopolissacarídeo (LPS) na membrana externa das bactérias Gram negativas (67). Essa interação gera o deslocamento de íons magnésio e cálcio do LPS, aumentando a permeabilidade da célula bacteriana e conseqüentemente, liberação do conteúdo citoplasmático (67,70). Embora o alvo inicial das polimixinas seja o LPS na membrana externas das bactérias Gram negativas, o mecanismo que acarreta a morte celular não é tão claro.

Outros mecanismos de ação têm sido apontados para as polimixinas. Após a lise celular e liberação do LPS, a colistina interage e neutraliza o LPS uma vez que interage com o lipídeo A do LPS, exercendo uma atividade antiendotoxina (71).

Ainda que pouco discutido, Deris e colaboradores sugerem em seu estudo que um segundo alvo das polimixinas é a inibição da enzima NADH-quinona oxirredutase tipo II que atua no transporte de elétrons na membrana interna das Bactérias Gram negativas (72).

O aumento da multirresistência em bactérias Gram negativas pelo mundo, somada ao não desenvolvimento de novas opções para tratamento, as polimixinas foram reintroduzidas no uso clínico como última opção terapêutica na linha de tratamento contra infecções graves causadas por bactérias multirresistentes (65,71).

1.3.2. Mecanismos de resistência as polimixinas

Com o aumento do uso das polimixinas observa-se a emergência de resistência a esse grupo de antimicrobianos. O mecanismo mais discutido até o momento está relacionado à modificações do LPS, o qual está relacionado com o mecanismo de ação das polimixinas (69,73). Essa modificação acontece através da adição do 4-amino-4-deiocil-arabinose (L-Ara4N) ou fosfoetanolamina (PEtN), diminuindo a carga negativa do Lipídio A e reduzindo a afinidade da polimixina pela superfície celular (69).

Estas modificações têm sido associadas a alterações no sistema regulatório de dois componentes PmrA/PmrB, PhoP/PhoQ. Esses sistemas são influenciados por fatores ambientais como alterações do pH do meio, presença de ferro, concentrações de cálcio e magnésio. São responsáveis pela regulação de diferentes fatores de virulência e resistência. As alterações no meio estimulam uma proteína sensor de histidina quinase que sofre autofosforilação e ativa uma proteína citoplasmática que promove expressão ou repressão de genes alvos (66). O sistema PmrA-PmrB é regulado pelo sistema PhoP-PhoQ e regula dois loci *pmrCAB* e *arnBCADTEF-pmrE*, responsáveis pelas alterações no lipídio A pela adição de PEtN e L-Ara4N alterando a carga do lipolissacarídeo (Figura 1.1) (69).

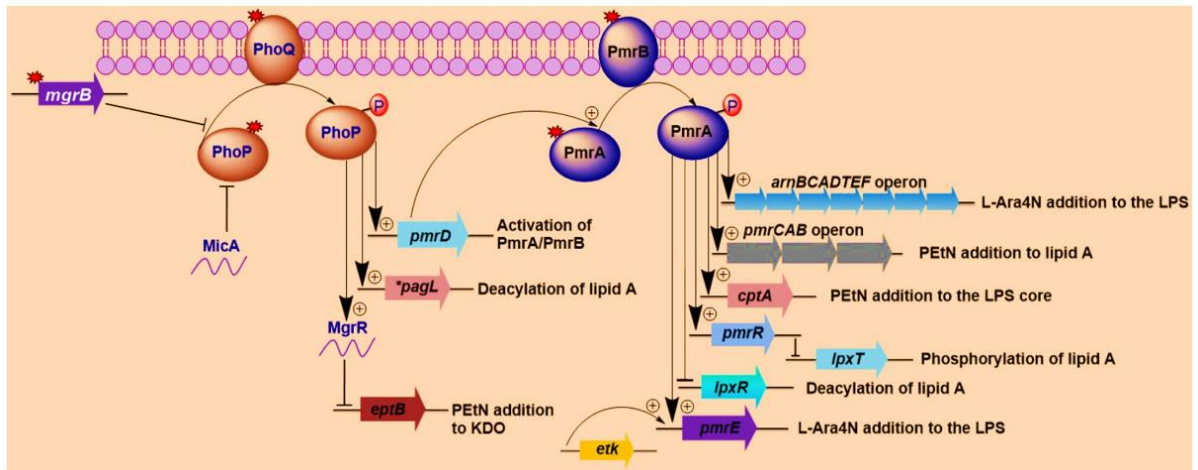


Figura 1.1: Sistema de dois componentes PhoP/PhoQ e PmrA/PmrB associado à resistência a polimixina em bactérias Gram negativas. Fonte: OLAITAN et al. (2014).

Os sistemas relacionados a resistência a polimixina diferem entre as bactérias: mutações nos genes *pmrA/pmrB* têm sido associado a resistência em *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Salmonella* spp., *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*; *phoP/phoQ* em *K. pneumoniae* e *Salmonella* spp.; *parR/parS* e *colR/colS* em *P. aeruginosa* e; *cprR/cprS* em *Campylobacter jejuni* (69)

Diene e colaboradores (2013) encontraram, em uma amostra clínica de *K. aerogenes*, mutação no gene *pmrA* por substituição do aminoácido glicina por uma serina (G53S), resultando na resistência a colistina (37). Um estudo recente sugeriu que a falha no tratamento com colistina em subpopulações de *E. cloacae* dependiam da expressão de *PhoQ* (BAND et al., 2016). Guérin et al. avaliando os genomas do complexo *E. cloacae* observaram a ausência de homólogos de *pmrD* sugerindo a independência entre os sistemas *phoP/phoQ* e *pmrA/pmrB*, diferentemente de outras enterobactérias em que os sistemas são interdependentes (69,74). Entretanto, outros estudos sugerem que os mecanismos de resistência a colistina em *E. cloacae* podem ser diferentes, que não no sistema PmrAB/PhoPQ, comparados a outras bactérias Gram negativas (75).

A resistência a polimixina também tem sido associada a elementos genéticos móveis, como o caso do gene *mcr* presente em plasmídeos. Recentemente, Liu e colaboradores (2016) observaram um aumento na resistência a colistina entre as amostras de *E. coli* de origem animal na China. Então, identificaram o gene plasmidial *mcr-1* (76). Esse gene codifica uma fosfoetanolamina transferase (pEtN transferase) que transfere pEtN para o lipídeo A (77). Após sua descrição, até o presente estudo, há descritas 10 variantes do gene *mcr* descritas em Enterobacterales (67,78–83).

Após sua descrição em amostras de origem animal, o gene *mcr-1* foi descrito por todos os continentes e em diferentes gêneros (*Escherichia* spp, *Klebsiella* spp, *Salmonella* spp, *Shigella* spp e *Enterobacter* spp), mais frequentemente em *E. coli* (84). De modo geral, as amostras positivas para *mcr-1* são caracterizadas por CIM baixas entre 2 a 8µg/mL (67). Estudos mostram a ocorrência do gene *mcr-1* em amostras produtoras de carbapenemases, uma questão de necessária atenção devido a problemática com a resistência aos carbapenêmicos e inviabilidade as opções disponíveis para tratamento. No Brasil, a coexistência de *mcr-1* e KPC-2 foi descrita por pesquisadores do nosso grupo em *K. pneumoniae* e *E. coli* (85,86).

Em 2016, Xavier e colaboradores identificaram a variante *mcr-2* na Bélgica em *E. coli* isolada de suínos e bezerros que apresentou 80,65% de identidade em relação a variante *mcr-1* (81). A terceira variante, *mcr-3*, foi identificada e descrita por Yin e colaboradores em 2017 em *E. coli* isoladas de porcos. Essa variante apresentou 32,5 e 31,7% de identidade nucleotídica com *mcr-1* e *mcr-2*, respectivamente. (83). No mesmo ano, o gene *mcr-4* foi detectado em *Salmonella* e *E. coli* isoladas de porcos na Itália, Espanha e Bélgica (87).

A variante *mcr-5* foi identificada e descrita como uma nova variante associada a resistência a colistina em um transposon integrado ao cromossomo bacteriano, em um gene de ornitina descarboxilase em *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B (79). Outras variantes foram descritas posteriormente: *mcr-6*, *mcr-7* e *mcr-8* (78,80,82)

Recentemente, a variante *mcr-9* foi identificada em 2019 em *Salmonella enterica* Typhimurium isolada de um paciente em Washington em 2010. Essa amostra era sensível a colistina com CIM de 2µg/mL e a transconjugante apresentou CIM entre 1,2 e 2,5µg/mL. (88).

Até o fim da escrita da dissertação, a última variante descrita foi a 10. O *mcr-10* foi descrito em *E. roggkampii* isolado em 2016 no West China Hospital, China. Essa variante apresentou 79,69% de identidade nucleotídica com *mcr-9*. Semelhante ao perfil das amostras positivas para as variantes anteriores, nesse estudo, a CIM para colistina nesta amostra foi de 2µg/mL (89).

A frequência de disseminação dessas variantes pelo mundo é diferente (90). Ling e colaboradores realizaram um levantamento de dados de estudos publicados detectando as variantes de *mcr* e do *National Database of Antibiotic Resistant Organisms* (NDARO), observaram que as variantes *mcr-1* e *mcr-9* são as mais detectadas, seguida pelo *mcr-5* (90).

1.4. Novas opções terapêuticas

Esse cenário é preocupante, uma vez que o progresso no desenvolvimento de novos antimicrobianos ainda está escasso e novos antibióticos direcionados para o tratamento de infecções causadas por Gram-negativos multirresistentes são necessários (91).

A *Food and Drug Administration* (FDA) e *European Medicines Agency* aprovaram duas novas combinações de cefalosporinas e inibidores de betalactamase para o tratamento de infecções graves intra-abdominais e do trato urinário e pneumonia: Ceftolozane/tazobactam e Ceftazidima/Avibactam (CAZ/AVI) (92,93). A combinação CAZ/AVI tem como alvo *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenemas, produtoras de serino carbapenemase, como KPC ou OXA-48, devido ao inibidor avibactam não ter atividade em metalo-beta-lactamases (92). Estudos tem demonstrado bons resultados em relação a eficácia de CAZ/AVI no tratamento de infecções graves causadas por *Enterobacteriaceae* resistentes aos carbapenemas (94,95).

1.5. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

Apesar da sua importância clínica, o conhecimento sobre a frequência de resistência à polimixina e os mecanismos associados em *K. aerogenes* e no complexo *E. cloacae* são escassos. Cada vez mais tem sido observado um aumento da frequência de resistência as polimixinas em espécies de importância hospitalar, contudo, ainda não é claro os mecanismos que resultam nesse fenótipo.

Com poucas opções disponíveis para terapia de infecções causadas por espécies multirresistentes, entender a dinâmica desse cenário de resistência à polimixina, a caracterização molecular e a frequência com que ocorre entre essas espécies é fundamental para manutenção da viabilidade do uso desses antimicrobianos até que novas opções terapêuticas sejam disponibilizadas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a frequência e os mecanismos relacionados à resistência às polimixinas em amostras do complexo *E. cloacae* e *K. aerogenes* encaminhadas ao Laboratório de pesquisa em Infecção Hospitalar (LAPIH/FIOCRUZ) no período de 2016 a 2018.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a frequência de resistência às polimixinas e determinar as concentrações inibitórias mínimas (CIM) de colistina
- Determinar o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos nos isolados selecionados para o estudo
- Confirmar a identificação das amostras do complexo *E. cloacae* resistentes a polimixina por sequenciamento
- Avaliar a produção de carbapenemases das amostras resistentes a polimixina, por teste fenotípico e confirmar a presença dos genes de carbapenemases por PCR e sequenciamento
- Avaliar a presença dos genes plasmidiais de resistência às polimixinas (*mcr-1* ao 9), através de PCR
- Avaliar a presença de mutações nos genes associados a alteração de carga do LPS levando a resistência às polimixinas através de PCR e sequenciamento
- Avaliar a relação de clonalidade entre as amostras resistentes à colistina através de PFGE e MLST

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Seleção de amostras

As amostras bacterianas incluídas no presente estudo foram obtidas a partir de um banco de amostras provenientes de diferentes espécimes clínicos encaminhadas ao Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar (LAPIH) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ) para investigação de mecanismos de resistência.

Foram recuperadas 124 amostras (94 do complexo *E. cloacae* e 30 de *K. aerogenes*) recebidas pelo LAPIH no período de 2016 a 2018. Todas foram retiradas do estoque, onde permanecem congeladas a uma temperatura de -30°C em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) (OXOID, UK) acrescido de 20% de glicerol (Sigma-Aldrich, EUA), e semeadas simultaneamente em duas placas de ágar *Eosin Methylene Blue* - EMB (OXOID, UK), uma sem a adição de antimicrobianos e outra acrescido de 4µg/mL de sulfato de colistina (SigmaAldrich, EUA) para avaliar o crescimento bacteriano e selecionar as amostras resistentes, respectivamente. Foram utilizadas como controle as cepas *E. coli* ATCC 25922 (sensível a colistina) *E. coli* CCBH 23595 (CIM_{colistina}= 4 µg/mL, *mcr-1*-positiva). Após o período de incubação em estufa bacteriológica a 35 ±2°C por um período de 18 a 24 horas, as amostras que não apresentaram crescimento no meio contendo colistina foram retiradas da seleção.

3.2. Determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIMs) para colistina

Para inclusão definitiva das amostras no presente estudo, estas foram submetidas à determinação da CIM para colistina utilizando o método da microdiluição em caldo descrito no CLSI M07-A10 e interpretação de acordo com o BrCast (96).

3.2.1. Preparo da solução estoque de sulfato de colistina

Antes de preparar as concentrações para microdiluição, uma solução estoque de sulfato de colistina a 2560 µg/mL foi preparada. Para isso, a potência do antimicrobiano, indicada no frasco em UI/mg, foi multiplicada por 0,03333, obtendo a potência em µg/mg. A partir disso, calculou-se a quantidade de antimicrobiano (mg) para preparar a solução estoque (2560 µg/mL), baseada na fórmula abaixo:

$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{Volume (mL)} \times \text{Concentração Máxima da Solução Estoque (}\mu\text{g/mL)}}{\text{Potência do Antimicrobiano (}\mu\text{g/mg)}}$$

O antimicrobiano foi dissolvido em água e a solução filtrada em membrana Millipore® de 0,22 µm. Em seguida alíquotas de 1,1mL foram feitas e estocadas a -20°C.

3.2.2. Preparo da placa de microdiluição

Para preparar as concentrações de teste de sulfato de colistina (0,25 a 256 µg/mL), volumes específicos de solução estoque de sulfato de colistina (2560µg/mL) foram adicionados em tubos Falcon® contendo Caldo Mueller Hinton Cátion Ajustado (CAMHB- Sigma) conforme Figura 3.1.

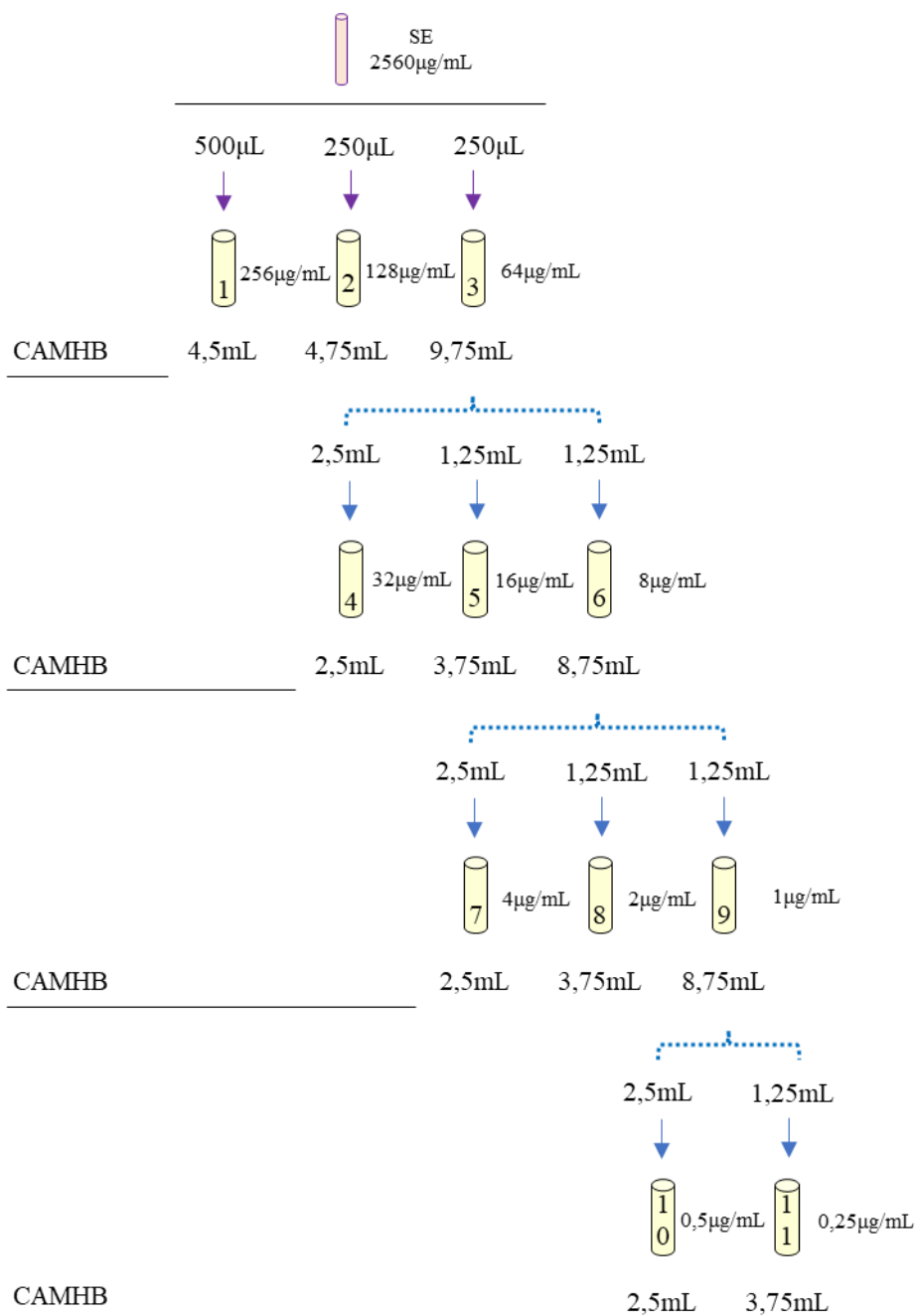


Figura 3.1: Esquema de preparo das soluções de uso para microdiluição

Foram distribuídos 50 µL das soluções concentradas de sulfato de colistina em microplacas de poliestireno de 96 poços com fundo em U (CralPlast, São Paulo, Brasil). Uma coluna foi reservada para adicionar 50µL de CAMHB sem adição de antimicrobiano como controle de contaminação.

3.2.3. Inoculação e leitura da CIM

A partir de um crescimento recente em placa de ágar nutriente (OXOID, Hampshire, UK) (18-24h) foi preparada a suspensão bacteriana, com 1 ou 2 colônias, em solução salina estéril (NaCl 0,9% p/v), com turvação correspondente a escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) e diluído 33µL dessa suspensão em 4967µL de CAMHB (Sigma). Para controle foram utilizadas as cepas *E. coli* ATCC 25922 ($CIM_{colistina} = 0,25$ a $2\mu\text{g/mL}$) e *P. aeruginosa* ATCC 27853 ($CIM_{colistina} = 0,5$ a $2\mu\text{g/mL}$). Um volume de 50µL dessa nova suspensão foi transferido para a microplaca contendo 50µL das diluições, resultando em um volume final de 100µL por poço. Após a aplicação, as placas foram incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 16 a 20 horas.

Com a adição de 50µL da suspensão a placa contendo o mesmo volume de solução de sulfato de colistina, a concentração final de antimicrobiano é diluída pela metade. Assim o poço que antes continha uma solução concentrada a $32\mu\text{g/mL}$, com adição da suspensão, na leitura foi interpretado como $16\mu\text{g/mL}$.

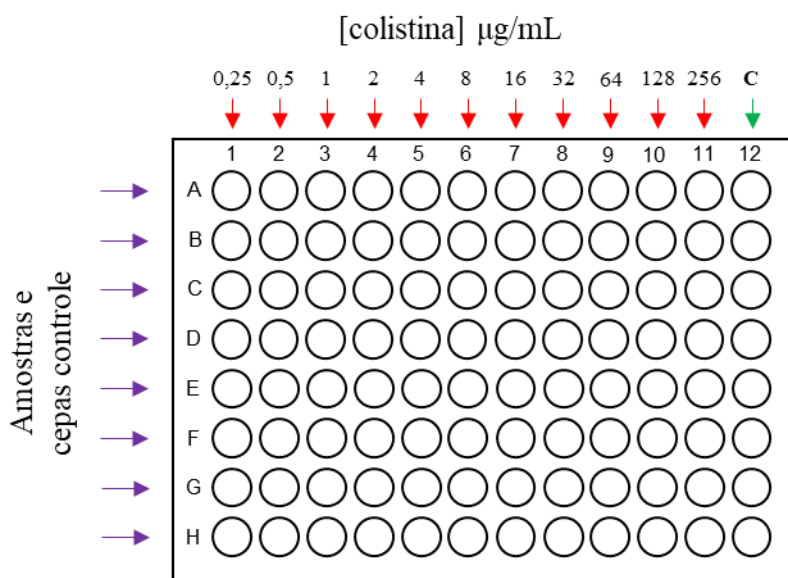


Figura 3.2: Esquema da organização da placa de 96 poços

Após o período de incubação, foi realizada a leitura e considerando a concentração inibitória mínima (CIM), o primeiro poço onde não houve turvação do meio de cultura ou formação de botão de crescimento bacteriano. Para interpretação dos resultados obtidos, foram utilizados os pontos de corte estabelecidos no BrCast, tendo sido selecionadas as amostras resistentes ($CIM > 2\mu\text{g/mL}$) e descartadas as amostras com $CIM \leq 2\mu\text{g/mL}$ (sensíveis).

3.3. Confirmação das espécies

Uma vez que as amostras do acervo do LAPIH já possuíam identificação prévia para fins de catalogação, a confirmação da identificação das espécies foi realizada através de métodos bioquímicos convencionais: TSI (*Triple Sugar Iron*) para avaliar a fermentação dos carboidratos (glicose, lactose, sacarose) e produção do sulfeto de hidrogênio; Ágar SIM (Motilidade, Indol e H₂S) para determinar a motilidade, formação de indol e produção de sulfeto de hidrogênio; Citrato para avaliar o uso do citrato como fonte de carbono; Agar Uréia para avaliar a atividade da urease, ágar DNase para determinar a capacidade de produzir a enzima DNase e descarboxilação da lisina, ornitina e arginina (97).

3.3.1. Sequenciamento gene *hsp60*

Para identificação das espécies do complexo *E. cloacae* foi realizado o PCR e sequenciamento do gene *hsp60* (21). A partir de um crescimento recente em Ágar Mueller-Hinton (OXOID, Hampshire, UK), 1 ou 2 colônias foram suspensas em microtubo de polipropileno de 1,5 mL estéril contendo 500 µl de água UltraPure™ (Invitrogen), homogeneizadas e submetidas à sonicação em cuba de ultrassom (Cristófoli, BR) 3 vezes por 30 segundos com intervalo de 10 segundos. O material lisado foi submetido à centrifugação em microcentrífuga (Heraeus® Biofuge Fresco) (16000 x g por 3 minutos) e armazenado em gelo até sua utilização.

A reação para detecção do gene *hsp60* foi preparada para o volume final de 25 µL contendo 0,5µL de cada iniciador: senso (5'GGTAGAAGAAGGCGTGGTTGC3') e antisenso (5'ATGCATTCGGTGGTGATCATCAG3') a uma concentração de 20 pmoles/µL, 12,5 µL de PCR Master Mix (Promega, EUA), 9,5 µL de água UltraPure™ (Invitrogen, USA) e 2 µL do lisado bacteriano. A reação foi submetida à amplificação em termociclador (Biorad, EUA) sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 60°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto. Por fim, extensão final a 72°C por 5 minutos. Para controle do experimento foi utilizada a cepa ATCC 13047, uma cepa de *E. cloacae* subsp. *cloacae*.

Com o término da amplificação, os produtos de PCR (272 pb) foram submetidos a eletroforese em gel de agarose ultrapura (UltraPure™ Agarose, Invitrogen) a 1,5% em TBE 0,4X (TBE 10X). A eletroforese foi realizada com tampão TBE 0,4X sob corrente de 100V por 30 minutos. Após a corrida, o gel foi corado por 30 minutos em GelRed Biotium (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) diluído em tampão TBE 1X e visualizados sob luz ultravioleta e

fotografados utilizando-se a ferramenta de fotodocumentação L-pix Molecular Imaging (Loccus Biotecnologia).

Os produtos foram purificados utilizando o illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, UK) de acordo com as instruções do fabricante.

Os produtos purificados foram encaminhados para a Plataforma de Sequenciamento Sanger - RPT01A (FIOCRUZ) em placas de 96 poços (SAPPHIRE, Greiner Bio-one). O sequenciamento foi realizado no sequenciador capilar 3730xl DNA Analyser (Applied Biosystems), com reações feitas utilizando o Big Dye terminator v.3.1 Cycle sequencing kit (Applied Biosystems). Os resultados foram analisados no programa Geneious 6.1.7 (Biomatters Ltd., Auckland, New Zealand) quanto a qualidade e a comparação com as sequências referências para identificação das espécies. As informações das sequências referências se encontram na Tabela 3.1.

Com as sequências analisadas, a árvore filogenética foi construída baseada no método estatístico *Neighbor-joining*, a significância das ramificações foi avaliada com 100 replicatas *Bootstrap* utilizando o programa Mega X. Foram mantidos apenas os grupos com bootstrap de 50% e o cluster genético como fortemente suportado com valores de bootstrap acima de 80% foram considerados significativos, conforme descrito por Hoffmann e Roggenkamp (21)

Tabela 3.1 Informações das sequências referências selecionadas para análise dos resultados do sequenciamento do gene *hsp60*.

Cluster	Espécie	Amostra tipo	n° de acesso
I	<i>E. asburiae</i>	ATCC 35953	AJ417141.1
II	<i>E. kobei</i>	DSM 13645	NZ_CP017181.1
V	<i>E. ludwigii</i>	EN-119	NZ_CP017279.1
VI	<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>oharae</i>	DSM 16687	NZ_CP017180.1
VII	<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>hormaechei</i>	ATCC 49162	GCA_000213995.1
VIII	<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>steigerwaltii</i>	DSM 16691	NZ_CP017179.1
IX	<i>E. bugandensis</i>	EB-247	GCA_900324475.1
X	<i>E. nimipressuralis</i>	ATCC 9912	AJ567900.1
XI	<i>E. cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i>	ATCC 13047	AJ417142.1
XII	<i>E. cloacae</i> subsp. <i>dissolvens</i>	ATCC 23373	AJ417143.1
-	<i>E. cancerogenus</i>	ATCC 33241T	AJ567895.1

Cluster	Espécie	Amostra tipo	n° de acesso
-	<i>E. chengduensis</i>	WCHECI-C4	CP043318.1

3.4. Testes de susceptibilidade a antimicrobianos

O teste de suscetibilidade aos antimicrobianos foi realizado para as amostras que se mostraram resistentes a colistina como resultado do teste de microdiluição em caldo (CIM >2 µg/mL). Foi realizado a determinação da concentração mínima inibitória Etest® para Ceftazidima-avibactam utilizando tiras de gradiente (Etest®) e o teste de disco-difusão em ágar para os outros antimicrobianos conforme as recomendações do BrCAST 2020.

A partir de cultura recente em Ágar Muller Hinton (OXOID, Hampshire, UK) foram selecionadas 1 a 2 colônias para obtenção de uma suspensão padronizada em solução salina fisiológica estéril, com turvação correspondente ao padrão 0,5 da escala de MacFarland. Esta suspensão foi semeada em toda a superfície da placa contendo o meio Mueller Hinton Agar (MHA; OXOID, UK), com auxílio de swab estéril, para obtenção de crescimento confluyente. Em até 15 minutos, foram aplicados os discos de antimicrobianos (OXOID, UK), mantendo-se um espaço de, no mínimo, 2,5 cm entre eles. Para este teste foram utilizados os discos de antimicrobianos descritos na tabela 3.2.

Tabela 3.2: Lista dos antimicrobianos utilizados no presente estudo para determinar o perfil de resistência entre as amostras de *K. aerogenes* e do complexo *E. cloacae*.

Antimicrobianos		
Categoria, classe	Agente	Conteúdo do disco
Aminoglicosídeos	Amicacina	30 µg
	Tobramicina	10 µg
	Gentamicina	10 µg
Penicilinas antipseudomonas + inibidores de b-lactamase	Piperacilina/ tazobactam	100/ 10 µg
Cefalosporinas	Cefoxitina	30 µg
	Cefepima	30 µg
	Ceftazidima	10 µg
Monobactâmicos	Aztreonam	30 µg
Cabapenemas	Ertapenem	10 µg
	Meropenem	10 µg
	Imipenem	10 µg

Antimicrobianos		
Categoria, classe	Agente	Conteúdo do disco
Tigeciclina	Tigeciclina	15 µg
Quinolonas	Ciprofloxacina	5 µg
Anfencóis	Cloranfenicol	30 µg
Inibidores da via do folato	Trimetoprim/ sulfametoxazol	1,25/ 23,75 µg

Para a combinação de Ceftazidima-avilbactam, foi adicionada a tira de gradiente de concentração de Ceftazidima-avilbactam (Etest®, Biomérieux, França) concentrado de 0,016 a 256 µg/mL de Ceftazidima e o inibidor avibactam em concentração fixa de 4 µg/mL.

Após aplicação dos discos as placas foram incubadas em estufa em ar ambiente a 35°C ±1°C por 18h±2°C. Terminado o período de incubação, o diâmetro dos halos para cada disco de antimicrobiano e área de inibição das tiras de Ceftazidima-avilbactam (Biomérieux, França) foram avaliados e o perfil de susceptibilidade interpretado de acordo com o BrCAST (96)

3.5. BLUE-CARBA

Para a avaliação fenotípica da produção de carbapenemases, todas as amostras foram submetidas ao teste Blue-Carba, um teste bioquímico desenvolvido para rápida detecção da produção de carbapenemases (serino-beta-lactamases ou metalo-beta-lactamases). (98). A detecção é baseada na hidrólise do imipenem, com ou sem adição de EDTA (inibidor de metalo-beta-lactamases), que acidifica e altera a cor do meio pela presença do indicador de pH azul de bromotimol que em solução ácida altera a cor de azul para amarelo. As amostras foram semeadas em ágar nutriente (OXOID, Hampshire, UK) e incubadas entre 18 a 24 horas a 35°C±2°C. Para realização do experimento a solução Blue-Carba (0,04% de Azul de bromotimol; 1% DMSO; 1% de sulfato de zinco 10mM, pH 7, água ultrapura (q.s.p)) foi adicionada a 3 tubos Falcon de 15mL (identificados como solução A, B e C). Nos tubos B e C foi adicionado à solução de Blue-Carba, 6 mg/mL de imipenem (imipenem + cilastatina sódica (500+500mg)/ BioChimico, Brasil. No tubo C também foi adicionado 30 µL/mL de solução de EDTA 100mM (EDTA dissódico, pH7,5). Após preparadas, as soluções foram distribuídas na placa de microtitulação de 96 poços adicionando 100µL das soluções em colunas diferentes.

Cada amostra bacteriana foi semeada nos poços contendo as 3 diferentes soluções. Em cada poço foi adicionada uma quantidade de massa bacteriana com uso de uma alça calibrada de 10 µL, agitando para obter uma suspensão homogênea. As placas foram incubadas por até 2 horas a 35±2°C seguindo a primeira leitura com 15 minutos, a segunda a 30 minutos e depois

com 1 e 2 horas de incubação. Como controle negativo foi utilizada a amostra *E. coli* ATCC 25922 e para controle positivo para atividade de serino betalactamase a *K. pneumoniae* CCBH 4556 (produtora de KPC-2), como controle positivo de metalo-betalactamase a *K. pneumoniae* CCBH 16302 (produtora de NDM-1).

Para interpretação dos resultados, verificamos a modificação da coloração dos poços 2 e 3 em relação ao poço 1 (sem antimicrobiano), sendo a combinação do poço 2 com cor amarelo e/ou verde-amarelado e poço 3 azul ou semelhante ao poço 1, como amostra produtora de carbapenemases do tipo metalo- betalactamase. Caso o poço 3 altere a cor, semelhante ao poço 2, a amostra foi classificada como produtora de serino-betalactamase (Figura 3.1).

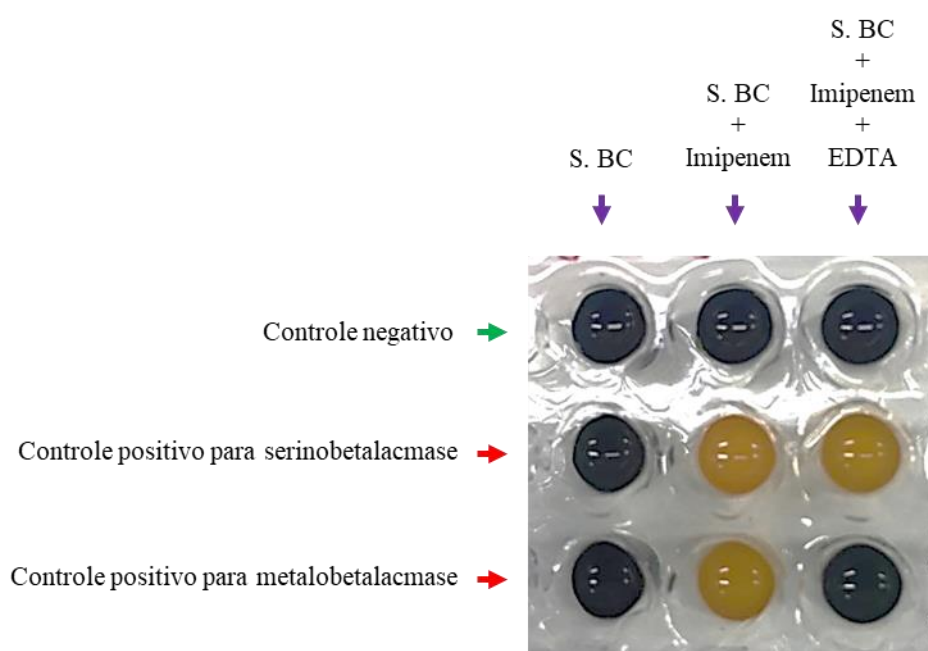


Figura 3.1: Interpretação do resultado através da alteração da coloração dos poços.

Legenda: S.BC- Solução Blue-Carba

3.6. Detecção dos genes plasmidiais de resistência aos carbapenemas (*bla_{KPC}*, *bla_{NDM}* e *bla_{OXA-48}*) e polimixina (*mcr-1* ao *mcr-9*)

Foram preparadas reações multiplex para detecção de genes codificadores de carbapenemases: *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}* e *bla_{OXA-48}* (Tabela 3.3) e para os genes plasmidiais de resistência a polimixina: *mcr-1* ao *mcr-5* e do *mcr-6* ao *mcr-9* (Tabela 3.3). Ambas as reações com volume final de 25µL contendo 0,5 µL dos iniciadores F e R de cada gene a uma concentração de 20 pmoles/µL, 12,5µL de PCR Master Mix (Promega, EUA), 9,5µL de água UltraPure™ (Invitrogen, USA) e 2µL do DNA extraído. Como controle positivo para os genes investigados foram utilizadas as cepas foram utilizadas as cepas CCBH6556 (*bla_{KPC}*-positiva),

CCBH16302 (*bla_{NDM}*-positiva), CCBH10079 (*bla_{OXA-48-like}*-positiva). Após preparada, a reação para carbapenemases foi submetida à amplificação em termociclador (Biorad, EUA) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 50°C por 1 minuto e extensão à 72°C por 1 minuto. Por fim, extensão final a 72°C por 5 minutos.

Tabela 3.3 Iniciadores para detecção de genes codificadores de carbapenemases.

Genes		Sequências dos iniciadores (5'-3')	Tamanho dos produtos (pb)	Referência
<i>bla_{KPC}</i>	F	5'TCGCTAAACTCGAACAGG3'	1011	(99)
	R	5'TTACTGCCCGTTGACGCCCAATCC5'		
<i>bla_{NDM}</i>	F	5'GGAGATCAACCTGCCGGT3'	608	
	R	5'TCAGCGCAGCTTGTCGGC3'		
<i>bla_{OXA-48}</i>	F	5'GTAAMRATGCTTGGTTCGC3'	755	
	R	5'TGTTTTTGGTGGCATCGAT3'		

A reação para detecção dos genes *mcr-1* ao *9* foi submetida à amplificação em termociclador (Biorad, EUA) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 15 minutos, seguida de 25 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 58°C por 1 minuto e 30 segundos e extensão à 72°C por 1 minuto. Por fim, extensão final a 72°C por 10 minutos. Como controle foram utilizadas as cepas CCBH20180 (*mcr-1*-positiva) e CCBH25606 (*mcr-5*-positiva), CCBH27304 (*mcr-9*-positiva)

Com o término da amplificação, os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose ultrapura (UltraPure™ Agarose, Invitrogen) a 1,5% em TBE 0,4X (EDTA 0,5M pH 8,0; Tris 1M pH 8,0; Ácido Bórico 0,035 M). A eletroforese foi realizada com tampão TBE 0,4X sob corrente de 100V por 30 minutos. Após a corrida, o gel foi corado por 30 minutos em GelRed Biotium (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) diluído em tampão TBE 1X e visualizados sob luz ultravioleta e fotografados utilizando-se a ferramenta de fotodocumentação L-pix Molecular Imaging (Loccus Biotecnologia).

Tabela 3.4 Iniciadores para detecção dos genes plasmidiais de resistência a polimixina

Genes		Sequências dos iniciadores (5'-3')	Tamanho dos produtos (pb)	Referência
<i>mcr-1</i>	F	AGTCCGTTTGTCTTGTGGC	320	(100)
	R	AGATCCTTGGTCTCGGCTTG		
<i>mcr-2</i>	F	CAAGTGTGTTGGTTCGCAGTT	715	
	R	TCTAGCCCCGACAAGCATAACC		

Genes		Sequências dos iniciadores (5'-3')	Tamanho dos produtos (pb)	Referência
<i>mcr-3</i>	F	AAATAAAAATTGTTCCGCTTATG	929	(101)
	R	AATGGAGATCCCCGTTTTT		
<i>mcr-4</i>	F	TCACTTTCATCACTGCGTTG	1.116	
	R	TTGGTCCATGACTACCAATG		
<i>mcr-5</i>	F	ATGCGGTTGTCTGCATTTATC	1.614	
	R	TCATTGTGGTTGTCCTTTTCTG		
<i>mcr-6</i>	F	GTCCGGTCAATCCCTATCTGT	252	
	R	ATCACGGGATTGACATAGCTAC		
<i>mcr-7</i>	F	TGCTCAAGCCCTTCTTTTCGT	551	
	R	TTCATCTGCGCCACCTCGT		
<i>mcr-8</i>	F	AACCGCCAGAGCACAGAATT	856	
	R	TTCCCCCAGCGATTCTCCAT		
<i>mcr-9</i>	F	GTATCCTTCCTGCCATCCTC	1011	
	R	CTTTCCATAACAGCGAGACAC		

3.7. Análise de mutações nos genes *phoP*, *phoQ*, *pmrA*, *pmrB*

Para as amostras do complexo *E. cloacae* foi realizada a PCR em termociclador (Biorad, EUA) para os genes *phoP*, *phoQ*, *pmrA*, *pmrB* (Tabela 3.5). As reações foram preparadas para um volume final de 25µL contendo 0,5 µL dos iniciadores F e R de cada gene a uma concentração de 20 pmoles/µL, 12,5µL de PCR Master Mix (Promega, EUA), 9,5µL de água UltraPure™ (Invitrogen, USA) e 2µL do DNA extraído como descrito no tópico 1.

Para os genes *phoP* e *phoQ* a amplificação se deu sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 1 minuto e extensão à 72°C por 1 minuto. Por fim, extensão final a 72°C por 5 minutos. E para os genes *pmrA* e *pmrB*: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 55°C por 45 segundos, extensão à 72°C por 45 minutos e extensão final a 72°C por 5 minutos.

Com o término da amplificação, os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose ultrapura (UltraPure™ Agarose, Invitrogen) a 1,5% em TBE 0,4X (EDTA 0,5M pH 8,0; Tris 1M pH 8,0; Ácido Bórico 0,035 M). A eletroforese foi realizada com tampão TBE 0,4X sob corrente de 100V por 30 minutos. Após a corrida, o gel foi corado por 30 minutos em GelRed Biotium (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) diluído em tampão TBE 1X e visualizados

sob luz ultravioleta e fotografados utilizando-se a ferramenta de fotodocumentação L-pix Molecular Imaging (Loccus Biotecnologia).

Tabela 3.5 Sequência de iniciadores para amplificação e sequenciamento dos genes associados a resistência à polimixina para as espécies do complexo *E. cloacae*.

Genes	Sequências dos iniciadores (5' - 3')	Tamanho do produto (pb)	Referência
<i>phoP</i>	F TCAGCGTTAAACTATTCATACTCTG	732	(75)
	R CAGTGAAAGGGGCATAATGT		
<i>phoQ</i>	F GGCTACCTGTTCGAATTA	518	
	R GAAGCCTGGGTGCGAGAT		
<i>pmrA</i>	F AGGTATCAGCCAAAACAGGT	942	
	R ATCTGTTCGCGGCTTTCA		
<i>pmrB</i>	F TTGGCAAAGACCGGATAAAAA	1.004	
	R GATAAGGCCCTGTTGATAC		

Os produtos purificados foram encaminhados para a Plataforma RPT01A de Sequenciamento do Instituto Oswaldo Cruz em placas de 96 poços (SAPPHIRE, Greiner Bio-one). O sequenciamento foi realizado no sequenciador capilar 3730xl DNA Analyser (Applied Biosystems), com reações feitas utilizando o Big Dye terminator v.3.1 Cycle sequencing kit (Applied Biosystems). As sequências foram analisadas no programa Geneious 6.1.7 (Biomatters Ltd., Auckland, New Zealand) comparando com as sequências referências descritas na Tabela 3.6.

Tabela 3.6: Sequências das amostras tipo das amostras identificadas no complexo *E. cloacae*

Cluster	Espécie	Amostra tipo	n° de acesso
V	<i>E. ludwigii</i>	EN-119	NZ_CP017279.1
VIII	<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>steigerwaltii</i>	DSM 16691	NZ_CP017179.1
IX	<i>E. bugandensis</i>	EB-247	GCA_900324475.1
XI	<i>E. cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i>	ATCC 13047	CP001918.1
	<i>E. chengduensis</i>	WCHECI-C4	CP043318.1

Para avaliação do efeito das mutações, sendo essas inserções, deleções ou substituições, foi utilizado a ferramenta PROVEAN PROTEIN (http://provean.jcvi.org/seq_submit.php), a qual classifica de acordo com o dado inserido se as modificações encontradas na sequência de aminoácidos da proteína são deletérias ou neutras. O escore para classificar as mutações foi o

padrão estabelecido pela ferramenta: -2,5 para a classificação binária (ou seja, deletéria versus neutra).

A amplificação dos quatro genes para *K. aerogenes* não foi realizada pois até o fim da realização desse estudo, não havia *primers* descritos na literatura para amplificação dos genes do sistema de dois componentes (PmrA/PmrB, PhoP/PhoQ) em *K. aerogenes*.

3.8. Determinação da diversidade genética

3.8.1. Análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico após eletroforese de campo pulsado em gel de agarose (PFGE)

De acordo com o protocolo descrito por Ribot e colaboradores (102), as amostras foram semeadas em tubos contendo 3mL de ágar nutriente (OXOID, Hampshire, UK) e incubadas por 24 horas a 35°C ±2. Após esse período, foi preparada uma suspensão bacteriana em tampão de suspensão de células (BSC) (EDTA 0,5M pH 8,0, TRIS-HCl 10mM pH 8) equivalente ao padrão de turvação 3 de MacFarland e 200µL dessa suspensão foram transferidos para um microtubo de 1,5mL contendo 5µL de Proteinase K (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) a 50mg/µL. Em seguida, foram adicionados 200µL de agarose Seakem Gold®(Lonza, Atlanta, EUA) a 1%, contendo SDS (0,1 g de agarose, 0,5mL de SDS à 1%, 9,4mL de TE (TRIS-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 0,1 MM pH 8.0), homogeneizados e distribuídos em moldes para *plugs* de PFGE (Bio-Rad, Berkeley, EUA). Após a solidificação dos blocos, esses foram transferidos para tubos de polipropileno de 15mL contendo 5µL de Proteinase K (50mg/ µLSigma) e 2mL de solução de lise (TRIS-HCl 10 mM pH 8,0/ EDTA 0,5M pH8,0/ N-Lauril sarcosil [SigmaAldrich, St. Louis, EUA] 10%/ Água Milli Q (q.s.p)) e incubados por 2 horas em banho maria a ±50°C. Os blocos foram lavados 3 vezes com 10mL de água MilliQ a ±50°C por 15 minutos e uma vez com 7mL de Tampão TE a ±50°C por 15 minutos. Após as lavagens, os blocos foram armazenados em 2mL de TE na geladeira.

Um terço de um bloco foi cortado e transferido para um microtubo de 1,5mL contendo 5µL da solução tampão da enzima de restrição *XbaI* (Invitrogen™ Anza™) e 45µL água MilliQ e incubadas na geladeira por 30 minutos para a pré-restrição. Posteriormente, o bloco foi transferido a um mix contendo: 42µL de água MilliQ, 5µL do tampão da enzima e 3µL enzima *XbaI*, foi preparado e incubado por 3 horas em termobloco a 37°C.

Os fragmentos de restrição foram separados em gel de agarose 1,1% (Seakem Gold®), preparado em TBE 0,4X, através de eletroforese de campo pulsado, utilizando o sistema CHEF-

DRIII (Bio-Rad, Richmond, EUA) sob as seguintes condições: pulso crescente de 0,5 a 35 segundos, por 18 horas a 6V/cm, na temperatura de 14°C. Foi utilizado como marcador molecular o Lambda Ladder PFG Marker (50 µg/mL - New England BioLabs, Ipswich, MA) com fragmentos com tamanhos entre 48.5–1,018 kb.

Após a corrida, o gel foi corado por 30 minutos em GelRed Biotium (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) diluído em tampão TBE 1X e visualizados sob luz ultravioleta e fotografados utilizando-se a ferramenta de fotodocumentação L-pix Molecular Imaging (Loccus Biotecnologia).

As análises dos géis e a confecção dos dendrogramas foram realizadas com auxílio do software BioNumerics (versão 6.6, Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Os agrupamentos foram realizados utilizando o coeficiente de Dice, e a correlação para agrupamento foi calculada por UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) com valores de otimização e tolerância de 1,5%. O percentual de similaridade usado foi acima de 85% para que as amostras fossem consideradas pertencentes ao mesmo grupo clonal.

3.8.2. MLST (*Multilocus Sequence Typing*) para as espécies do Complexo *E. cloacae* e *K. aerogenes*

Todas as amostras foram submetidas ao MLST seguindo o protocolo descrito por Miyoshi e colaboradores (103). As informações sobre os primers utilizados no estudo estão na Tabela 3.7.

As reações para amplificação dos sete genes (*dnaA*, *fusA*, *gyrB*, *pyrG*, *leuS*, *rplB*, *rpoB*) do MLST do complexo *E. cloacae* foram preparadas para um volume final de 25µL contendo 0,5µL de primer F e R de cada gene à uma concentração final de 20 pmoles/µL, 12,5µL de PCR Master Mix (Promega, EUA), 9,5µL de água Milli-Q e 2µL do lisado bacteriano. Nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 50 segundos, anelamento a 63°C por 50 segundos e extensão à 72°C por 50 segundos. Por fim, a extensão final a 72°C por 5 minutos.

Para o MLST em *K. aerogenes*, as reações foram preparadas no mesmo volume descrito no parágrafo anterior e para amplificação sob as condições para os genes *dnaA*, *fusA*, *gyrB*, *leuS*, *rplB*, *rpoB*: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 58°C por 45 segundos e extensão à 72°C

por 45 segundos. Por fim, a extensão final a 72°C por 5 minutos. Para o gene *pyrG*, o anelamento foi configurado para 60°C, mas sob as mesmas condições dos outros 6 genes.

Os produtos da amplificação foram purificados o *illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante. Os produtos purificados foram encaminhados para a Plataforma RPT01A de Sequenciamento do Instituto Oswaldo Cruz em placas de 96 poços SAPPHIRE (Greiner Bio-one). O sequenciamento foi realizado no sequenciador capilar 3730xl DNA Analyser (Applied Biosystems), com reações feitas utilizando o Big Dye terminator v.3.1 Cycle sequencing kit (Applied Biosystems). As sequencias foram analisadas no programa Geneious 6.1.7 (Biomatters Ltd., Auckland, New Zealand) e inseridas no banco disponível em <https://pubmlst.org/ecloacae/> e <https://pubmlst.org/organisms/klebsiella-aerogenes> para comparação e definição do *sequence type* (ST). A análise filogenética dos STs foi realizada com o auxílio do software PHYLOViZ (<https://online.phyloviz.net/>).

Tabela 3.7: Iniciadores para MLST (PCR e sequenciamento)

Espécie	Genes	Sequências dos iniciadores (5'-3')	Tamanho do produto (pb)	Referência
Complexo <i>E. cloacae</i>	<i>dnaA</i>	F AYAACCCGCTGTTCTBTATGGCGGCAC R KGCCAGCGCCATCGCCATCTGACGCGG	695	https://pubmlst.org/ecloacae/
	<i>fusA</i>	F TCGCGTTCGTAAACAAAATGGACCGTAT R TCGCCAGACGGCCCAGAGCCAGACCCAT	851	
	<i>gyrB</i>	F TCGACGAAGCGCTCGCGGGTCACTGTAA R GCAGAACCGCCC GCGGAGTCCCCTTCCA	1098	
	<i>leuS</i>	F GATCARCTSCCGGTKATCCTGCCGGAAG R ATAGCCGCAATTGCGGTATTGAAGGTCT	790	
	<i>pyrG</i>	F AYCCBGAYGTBATTGCRCAYMAGGCGAT R GCRCGRATYTCVCCCTSHTCGTCCCAGC	480	
	<i>rplB</i>	F GTAAACCGACATCTCCGGGTCGTCGCCA R ACCTTTGGTCTGAACGCCCCACGGAGTT	691	
	<i>rpoB</i>	F AAAAACGTATTCGTAAGGATTTTGGTAA R CCAGCAGATCCAGGCTCAGCTCCATGTT	693	
Sequenciamento				
	<i>gyrB</i>	F AAAACCGGTACYATGGTGC GTTTCTGG	785	
		R GCAGAACCGCCC GCGGAGTCCCCTTCC		
	<i>fusA</i>	F TCGCGTTCGTAAACAAAATGGACCGTAT	654	
		R ATCTCTTCACGYTTGTTAGCGTGCATCT		

Espécie	Genes	Sequências dos iniciadores (5'-3')	Tamanho do produto (pb)	Referência	
<i>K. aerogenes</i>	<i>dnaA</i>	F	CGTAAGCCAAATGCTAAAGTG	694	https://pubmlst.org/organisms/klbsiella-aerogenes
		R	GGCAGGCTGTGGTTGGTC		
	<i>fusA</i>	F	GTTCTTGATGGTGCGGTAATG	915	
		R	CATACGCTCCAGAATGATCG		
	<i>gyrB</i>	F	GCGACGGCAAAGAAGACC	699	
		R	CCTGGTTCTTACGGTTACG		
	<i>leuS</i>	F	CAATTCCAATGGTGACCCTG	882	
R		CGGTATTGAAGGTCTGACG			
<i>pyrG</i>	F	CGTGACCGTCAACATCAAGC	488		
	R	CTTCAATCGGTTTCAACAACA			
<i>rplB</i>	F	ATGGCAGTTGTTAAATGTAAAC	791		
	R	TCAGTACGCTTGTTGCTGC			
<i>rpoB</i>	F	GCTACCGTCTGGGCGAAC	805		
	R	CGTAAGCCAAATGCTAAAGTG			

4. RESULTADOS

4.1. Seleção de amostras

4.1.1. Triagem em meio seletivo contendo colistina

Entre o período de 2016-2018, o LAPIH recebeu 94 amostras pertencentes ao complexo *E. cloacae* e 30 de *K. aerogenes* totalizando 124 no acervo. Na triagem inicial, as 124 amostras foram semeadas em placas com meio EMB acrescido de sulfato de colistina a uma concentração final de 4µg/mL. Após incubação, 31 amostras, sendo 26 do complexo *E. cloacae* (27,7%) e 5 de *K. aerogenes* (16,7%) apresentaram crescimento em meio seletivo Tabela 4.1

4.1.2. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Para confirmação da resistência e inclusão no estudo, a CIM para colistina foi determinada pelo teste de microdiluição em caldo. Das 31 amostras que apresentaram crescimento no meio seletivo, 8 foram consideradas sensíveis com $CIM \leq 2\mu\text{g/mL}$, sendo uma de *K. aerogenes* e sete do complexo *E. cloacae*. Das 23 amostras resistentes incluídas no estudo, a CIM para colistina variou entre 4µg/mL a $\geq 128\mu\text{g/mL}$, com CIM_{50} 64 µg/mL e $CIM_{90} \geq 128$ µg/mL (Gráfico 4.1). Em *K. aerogenes* a frequência de resistência e CIM encontradas foram menores (13%; CIM_{50} 4µg/mL e $CIM_{90} \geq 128\mu\text{g/mL}$) quando comparadas ao complexo *E. cloacae* (20%; CIM_{50} 32µg/mL e $CIM_{90} \geq 128\mu\text{g/mL}$).

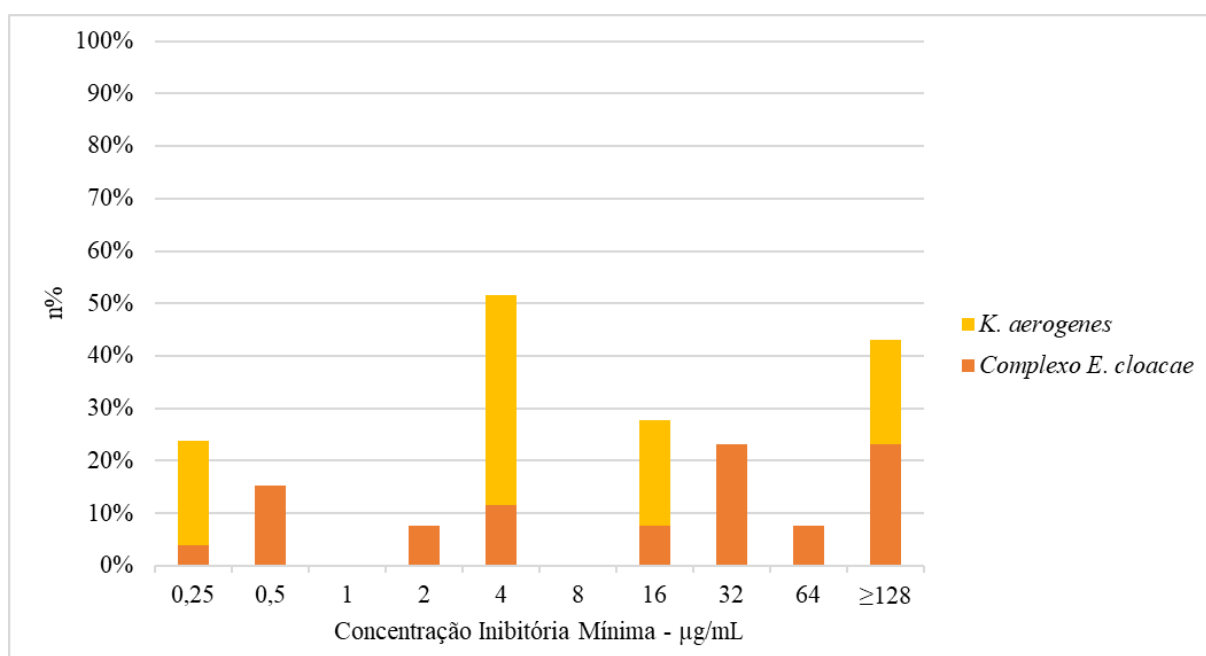


Gráfico 4.1: Variação entre as CIM das amostras do complexo *E. cloacae* e *K. aerogenes* resistentes à colistina.

CIM_{50} e CIM_{90} : Concentrações que inibem o crescimento de 50% e 90% da população bacteriana estudada respectivamente.

Tabela 4.1 Resultado da seleção de amostras para o estudo após triagem no meio seletivo e microdiluição em caldo.

	Espécie bacteriana (n° de amostras)		
	Complexo <i>E. cloacae</i>	<i>K. aerogenes</i>	Total
Número inicial de amostras	94	30	124 (100%)
Crescimento em meio seletivo	26	5	31 (25%)
CIM >2µg/mL	19 (20,2%)	4 (13,3%)	23 (18,5%)

CIM: concentração inibitória mínima

As 23 amostras resistentes à colistina incluídas nesse estudo foram provenientes de diferentes espécimes clínicos, sendo sangue o mais frequente (39,1%). As amostras foram isoladas de pacientes atendidos em hospitais de oito estados brasileiros, principalmente Minas Gerais (35%) e Espírito Santo (22%) como apresentado nas Tabela 4.2 e Tabela 4.3.

Tabela 4.2: Espécimes clínicos de origem das 23 amostras de Complexo *E. cloacae* e *K. aerogenes* resistentes à colistina.

	Espécie bacteriana (n° de amostras)					
	Complexo <i>E. cloacae</i>		<i>K. aerogenes</i>		Total	
Espécimes clínicos	n	%	n	%	n	(%)
Sangue	9	47,4%	0	0,0%	9	39,1%
Urina	4	21,1%	2	50,0%	6	26,1%
Swab retal	0	0,0%	1	25,0%	1	4,3%
Ponta de cateter	1	5,3%	0	0,0%	1	4,3%
Secreção traqueal	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
Outros ¹	5	26,3%	1	25,0%	6	26,1%
Total	19		4		23	

¹Outros: lesão de pele, líquido, peça cirúrgica e fragmento de tecido.

Tabela 4.3: Estados de origem das 23 amostras de Complexo *E. cloacae* e *K. aerogenes* resistentes à colistina.

Espécie bacteriana						
Estados	Complexo <i>E. cloacae</i>		<i>K. aerogenes</i>		Total	
	n	%	n	%	n	%
Bahia	2	11,0%	0	0,0%	2	8,7%
Ceará	0	0,0%	1	25,0%	1	4,3%
Espírito santo	5	26,0%	0	0,0%	5	21,7%
Goiás	0	0,0%	1	25,0%	1	4,3%
Maranhão	0	0,0%	1	25,0%	1	4,3%
Minas gerais	8	42,0%	0	0,0%	8	34,8%
Rio de janeiro	2	11,0%	0	0,0%	2	8,7%
Rio grande do Sul	2	11,0%	1	25,0%	3	13,0%
Total	19		4		23	

4.2. Identificação das amostras do Complexo *E. cloacae*

Todas as 19 amostras identificadas bioquimicamente como complexo *E. cloacae* foram submetidas ao sequenciamento parcial do gene *hsp60* (272 pb). Através da árvore *Neighbor-joining* construída com as 19 amostras do estudo e 16 sequências referências (Figura 4.1), foram observados agrupamentos com 5 espécies diferentes. Seis amostras (31,6%) apresentaram mais de 90% de similaridade com a amostra referência de *E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii*. Outras 5 amostras (26,3%) formaram um grupo com mais de 70% de similaridade com a amostra de referência de *E. cloacae* subsp. *cloacae*. A espécie *E. bugandensis* formou um agrupamento de 61% de similaridade com 4 amostras. Duas apresentaram 62% de similaridade com a espécie *E. ludwigii*. Duas amostras agruparam com a espécie *E. chengduensis*, uma com 100% de similaridade e outra com 51% (Tabela 4.4).

A espécie *E. chengduensis* não é descrita como pertencente ao complexo *E. cloacae*. Como inicialmente essas amostras foram identificadas como parte do complexo pelos testes bioquímicos utilizados para confirmação das espécies previamente identificadas, as amostras identificadas como *E. chengduensis* pelo sequenciamento do gene *hsp60* serão incluídas no presente estudo como parte do complexo para fins de análise.

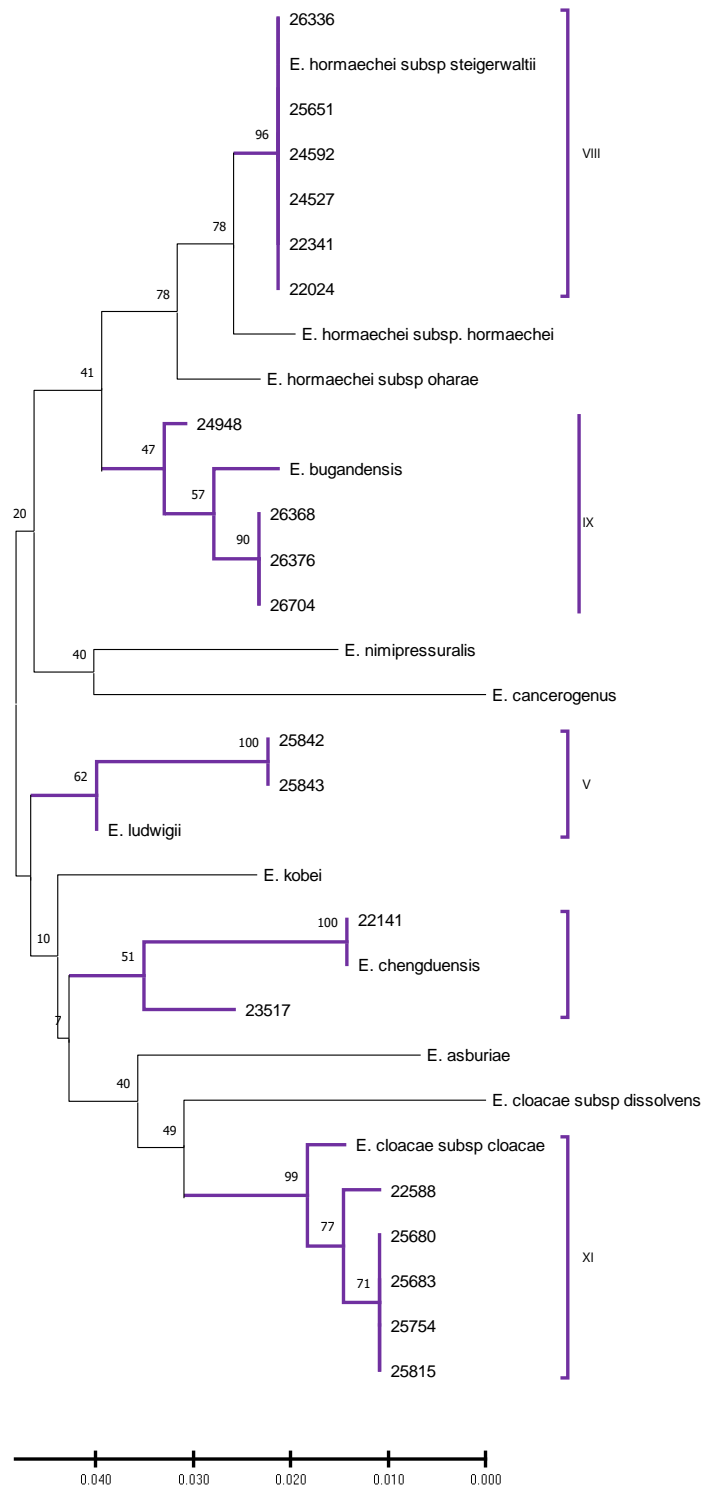


Figura 4.1: Árvore Neighbor-joining construída com a análise parcial do gene *hsp60* das 19 amostras selecionadas e identificadas como complexo *E. cloacae*. A árvore foi construída baseada no método estatístico Neighbor-joining, com 100 replicatas Bootstrap

Tabela 4.4: Características de origem de isolamento dos Clusters identificados entre as amostras do complexo *E. cloacae*.

Clusters	Espécies	n	%	Material Clínico	n	Estados
V	<i>E. ludwigii</i>	2	11%	Sangue	2	MG
VIII	<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>steigerwaltii</i>	6	32%	Sangue	1	ES
				Urina	2	MG, RS
				Ponta de Cateter	1	ES
				Outros ¹	2	RS, BA
XI	<i>E. cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i>	5	26%	Sangue	4	MG, SP
				Urina	1	RJ
IX	<i>E. bugandensis</i>	4	21%	Sangue	1	ES
				Outros	3	ES, BA
	<i>E. chengduensis</i>	2	11%	Sangue	1	MG
				Urina	1	RJ
Total			100%		19	

¹Outros: lesão de pele, líquido, peça cirúrgica e fragmento de tecido.

4.3. Determinação da suscetibilidade aos antimicrobianos

Através do teste de disco-difusão em ágar, mais de 60% das amostras apresentaram resistência à piperacilina-tazobactam, ceftazidima, cefepima, ertapenem, aztreonam, tobramicina e ciprofloxacina. As menores taxas de resistência foram para gentamicina (21,7%), amicacina (26,1%) e tigeciclina (26,1%). Em relação aos carbapenemas, 78,3% das amostras foram resistentes ao ertapenem, enquanto para imipenem e meropenem, as taxas de resistência foram menores (30,4% amostras) (Gráfico 4.2).

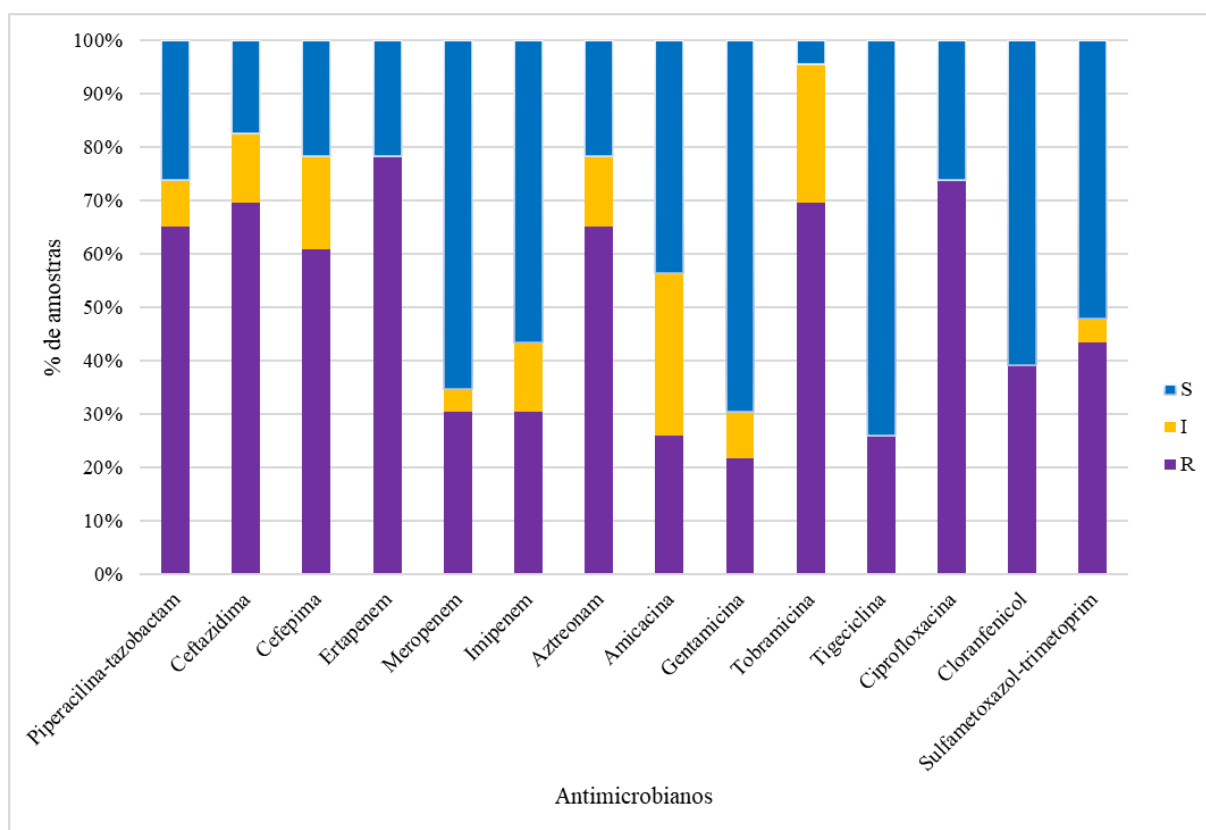


Gráfico 4.2: Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das amostras do complexo *E. cloacae* e *K. aerogenes*.

Comparando as taxas de resistência entre os dois grupos de bactérias estudadas, observamos que a maioria das amostras de *K. aerogenes* foram resistentes a amicacina, diferente do observado para as amostras do complexo *E. cloacae* (Tabela 4.5).

Tabela 4.5: Perfil de susceptibilidade das 23 amostras de Complexo *E. cloacae* e *K. aerogenes* resistentes à colistina.

Classes	Antimicrobianos	Complexo <i>E. cloacae</i> (n=19)			<i>K. aerogenes</i> (n=4)		
		S	I	R	S	I	R
Penicilina/ inibidor de beta-lactamase	Piperacilina-tazobactam	32%	5%	63%	0%	25%	75%
	Cefalosporina 3ª geração	Ceftazidima	21%	11%	68%	0%	25%
Cefalosporina 4ª geração	Cefepima	21%	21%	58%	25%	0%	75%
	Ertapenem	26%	0%	74%	0%	0%	100%
Carbapenêmicos	Meropenem	68%	5%	26%	50%	0%	50%
	Imipenem	58%	16%	26%	50%	0%	50%
Monobactâmicos	Aztreonam	21%	11%	68%	25%	25%	50%

		Complexo <i>E. cloacae</i> (n=19)			<i>K. aerogenes</i> (n=4)		
Aminoglicosídeos	Amicacina	47%	37%	16%	25%	0%	75%
	Gentamicina	68%	11%	21%	75%	0%	25%
	Tobramicina	5%	32%	63%	0%	0%	100%
-	Tigeciclina	74%	0%	26%	75%	0%	25%
Fluoroquinolonas	Ciprofloxacina	32%	0%	68%	0%	0%	100%
Anfenicóis	Cloranfenicol	63%	0%	37%	0%	0%	50%
Antimetabólitos	Sulfametoxazol-trimetoprim	53%	5%	42%	50%	0%	50%

4.3.1. Perfil de susceptibilidade das diferentes espécies do complexo

Comparando o perfil de resistência das espécies do complexo *E. cloacae*, foi observado que *E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii* e *E. cloacae* subsp. *cloacae* foram as espécies que apresentaram resistência a maioria dos antimicrobianos testados. Contudo, as amostras de *E. cloacae* subsp. *cloacae* foram sensíveis a meropenem, imipenem e amicacina e a maioria a tigeciclina (75%), enquanto as amostras de *E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii* apresentaram 67% de resistência ao meropenem e imipenem e maior suscetibilidade a gentamicina (100%) e cloranfenicol (83%) (Tabela 4.6)

As outras espécies mostraram-se mais sensíveis que *E. cloacae* subsp. *cloacae* e *E. hormaechei* subsp. *Steigerwaltii*. As amostras de *E. chengduensis* (n=2) apresentaram sensibilidade a amicacina, gentamicina, tobramicina, cloranfenicol e sulfametoxazol-trimetoprim, enquanto as amostras de *E. bugandensis* (n=4) e *E. ludwigii* (n=2) apresentaram sensibilidade a maioria dos antimicrobianos testados. Apenas uma amostra de *E. ludwigii* foi resistente a tobramicina e *E. bugandensis* teve uma taxa de resistência a Ertapenem de 75% entre os carbapenêmicos e 50% para tigeciclina e cloranfenicol.

Em relação a concentração inibitória mínima de colistina não houve diferença entre as espécies.

4.4. Confirmação da produção de carbapenemases

4.4.1. Detecção fenotípica da atividade de carbapenemases

Todas as amostras foram submetidas ao teste *Blue-Carba* para detecção da produção de carbapenemases. Das 23 amostras, 8 apresentaram atividade de carbapenemase no teste, 6 com atividade de serino-betalactamases, 2 com atividade de metalo-betalactamases.

4.4.2. Detecção molecular de carbapenemases

Para detectar a presença de genes codificadores de carbapenemases, as amostras foram submetidas a PCR multiplex para os genes *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM} e *bla*_{OXA-48} e as 8 (35%) amostras positivas no teste fenotípico foram positivas para algum dos genes testados, sendo 6 positivas para *bla*_{KPC} e 2 para *bla*_{NDM}.

Em comparação aos resultados do teste fenotípico, todas as amostras com atividade de serino-betalactamase foram positivas para o gene *bla*_{KPC} e as duas amostras com atividade de metalo-beta-lactamases no teste fenotípico foram positivas para o gene *bla*_{NDM}.

Das amostras produtoras de carbapenemases, duas eram da espécie *K. aerogenes*. Uma positiva para KPC (amostra 23461) e outra positiva para NDM (amostra 24777). As características das amostras se encontram descritas na Tabela 4.7.

Dentre as amostras do complexo *E. cloacae* produtoras de carbapenemases (n=6, 31,6%) a carbapenemase KPC foi encontrada em 5 amostras, sendo 4 da espécie *E. hormaechei* subsp *steigerwaltii* e uma de *E. chengduensis*. A carbapenemase NDM foi detectada em uma amostra de *E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii* (Tabela 4.7).

Tabela 4.6: Perfil de susceptibilidade das diferentes espécies do complexo

Antimicrobianos	Espécies														
	<i>E. hormaechei</i> subsp <i>steigerwaltii</i> (n=6)			<i>E. cloacae</i> subsp <i>cloacae</i> (n=5)			<i>E. bugandensis</i> (n=4)			<i>E. chengduensis</i> (n=2)			<i>E. ludwigii</i> (n=2)		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
TZP	0%	0%	100%	25%	25%	50%	75%	0%	25%	0%	0%	100%	100%	0%	0%
CAZ	17%	0%	83%	0%	0%	100%	75%	0%	25%	0%	0%	100%	100%	0%	0%
FEP	0%	0%	100%	25%	0%	75%	100%	0%	0%	50%	0%	50%	100%	0%	0%
ERT	0%	0%	100%	0%	0%	100%	25%	0%	75%	0%	0%	100%	100%	0%	0%
MEM	17%	17%	67%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	50%	0%	50%	100%	0%	0%
IMP	17%	17%	67%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	50%	0%	50%	100%	0%	0%
ATM	0%	0%	100%	25%	0%	75%	75%	0%	25%	0%	0%	100%	100%	0%	0%
AK	17%	33%	50%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	50%	50%	0%	100%	0%	0%
CN	100%	0%	0%	25%	0%	75%	100%	0%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%
TOB	0%	0%	100%	0%	0%	100%	100%	0%	0%	0%	100%	0%	50%	0%	50%
TGC	50%	0%	50%	75%	0%	25%	50%	0%	50%	0%	0%	100%	100%	0%	0%
CIP	0%	0%	100%	0%	0%	100%	100%	0%	0%	0%	0%	100%	100%	0%	0%
C	83%	0%	17%	25%	0%	75%	50%	0%	50%	100%	0%	0%	100%	0%	0%
SXT	50%	0%	50%	0%	0%	100%	75%	25%	0%	100%	0%	0%	100%	0%	0%
CIM _{colistina} (µg/mL)	4, 16 e 32			32, 64 e ≥128			16, 32 e ≥128			32 e ≥128			≥128		

Tabela 4.7: Característica das amostras produtoras de carbapenemases

Amostra	Espécie	Material Clínico	Estado	Genes de Resistência			CIM colistina (µg/mL)
				<i>bla</i> _{KPC}	<i>bla</i> _{NDM}	<i>bla</i> _{OXA-48}	
22141	<i>Enterobacter chengduensis</i>	Urina	RJ	+			32
22341	<i>E. hormaechei</i> subsp <i>steigerwaltii</i>	Swab de lesão de pele	RS	+			16
24527		Urina	MG	+			32
24592		Líquor	BA	+			32
25651		Sangue	ES	+			4
26336		Ponta de Cateter	ES		+		4
23461	<i>K. aerogenes</i>	Urina	GO	+			4
24777	<i>K. aerogenes</i>	Swab retal	RS		+		4

4.4.3. Comparação do perfil de susceptibilidade das amostras produtoras e não produtoras de carbapenemases

Como apresentado no Gráfico 4.3 , quando comparamos o perfil de susceptibilidade entre as amostras produtoras ou não de carbapenemases, observamos uma maior resistência para a maioria dos antimicrobianos testados dentre as produtoras de carbapenemases, exceto para gentamicina, cloranfenicol e sulfametoxazol-trimetoprim.

Para as amostras produtoras de KPC, foi testado a combinação ceftazidima/avibactam. Todas as amostras foram sensíveis a essa combinação com CIM 0,5/4 µg/mL e 0,38/4µg/mL. Este antimicrobiano foi testado apenas em amostras produtoras de KPC devido a não atividade contra metalo-betalactamases.

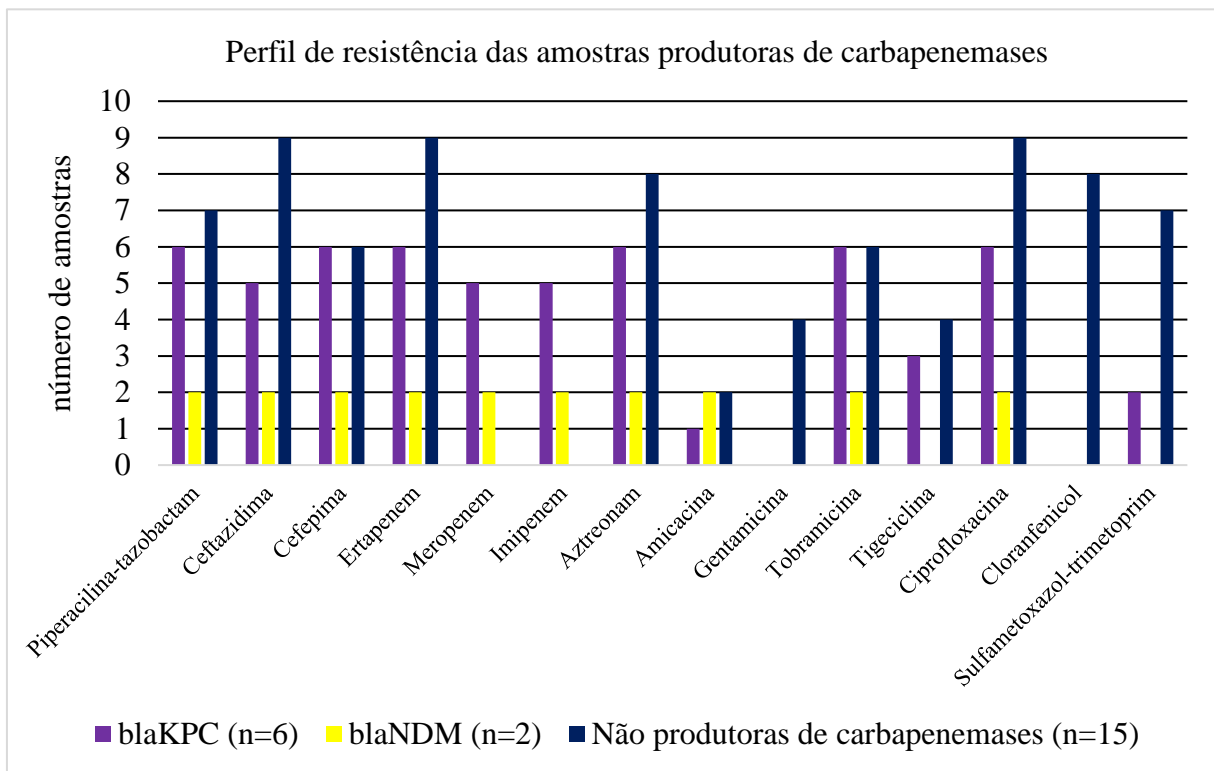


Gráfico 4.3: Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dentre as amostras resistentes à colistina produtoras e não produtoras de carbapenemases

Em relação a CIM de polimixina, observamos que as amostras produtoras de NDM apresentaram CIM mais baixas (4µg/mL) que as produtoras de KPC e não produtoras de carbapenemases (Gráfico 4.4).

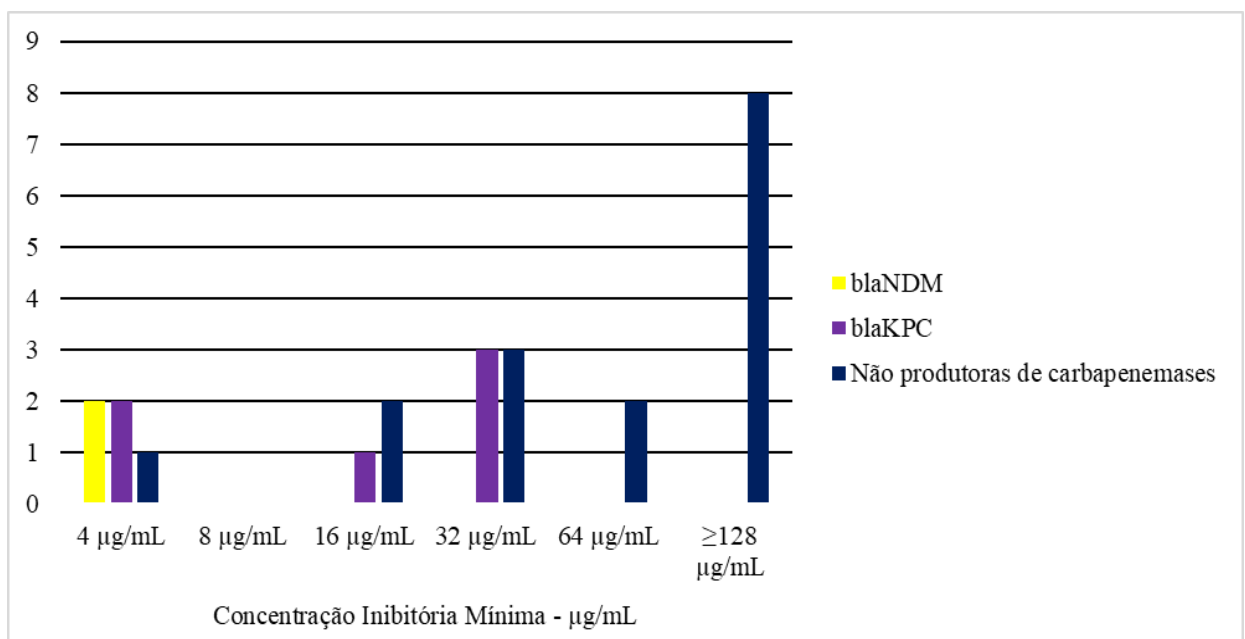


Gráfico 4.4: Comparação das concentrações inibitórias mínimas de colistina entre as amostras produtoras e não produtoras de carbapenemases resistentes à colistina

4.5. Detecção do gene *mcr* (variantes de 1-9)

Todas as 31 amostras foram submetidas a PCR para detecção dos genes plasmidiais de resistência a polimixina (*mcr-1* *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5*, *mcr-6*, *mcr-7*, *mcr-8* e *mcr-9*).

Apenas em uma amostra foi identificada uma das variantes pesquisadas. Na amostra 26336 identificada como *E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii* produtora de NDM foi detectada a variante *mcr-9* com CIM_{colistina} 4µg/mL. Esta amostra foi isolada de ponta de cateter de um paciente internado em um hospital do Espírito Santo e apresentava resistência a todos os antibióticos testados no estudo, exceto a Gentamicina, Tigeciclina, Cloranfenicol e Sulfametoxazol-trimetoprim.

4.6. Análise de mutações nos genes *phoPQ* e *pmrAB* de complexo *E. cloacae*

Os quatro genes do sistema de dois componentes (*phoP*, *phoQ*, *pmrA*, *pmrB*) foram avaliados para as espécies estudadas sempre comparando com as sequências obtidas com amostras referência de cada espécie conforme descrito na **Tabela 3.1**.

Dentre as 19 amostras do complexo *E. cloacae* analisadas, para alguns genes de algumas amostras não foi possível obter as sequências nucleotídicas ou por não amplificação do gene como no caso do gene *phoP* ou pela obtenção de sequências de baixa qualidade como no caso do gene *phoQ*. A proteína que apresentou mais alterações de aminoácidos foi a PmrB em todas as 5 espécies do complexo *E. cloacae* (Tabela 4.8).

Tabela 4.8: Modificações encontradas nas proteínas dos sistemas de dois componentes relacionadas a resistência a polimixina entre as espécies do complexo *E. cloacae*.

Espécie	Amostra	PmrA	PmrB	PhoP	PhoQ	CIMcol (µg/mL)
<i>E. hormaechei</i> subsp <i>steigerwaltii</i> (n=6)	22024	WT	L109M T121A V233A	N37D	ND	4
	22341	T31A	L109M I134V T121A V233A A344T	N37D	WT	16
	24527	WT	ND	ND	V300M	32
	24592	WT	ND	ND	V300M	32
	25651	T31A	L109M T121A V233A A344T	N37D	WT	4
	26336	WT	WT	ND	ND	4
<i>E. cloacae</i> subsp <i>cloacae</i> (n=5)	22588	V71A	N90K I295C	ND	S240T	≥128
	25680	WT	S175I G273D I295T	WT	S240T	32
	25683	WT	S175I G273D I295T	WT	S240T	64
	25754	WT	S175I G273D I295T	WT	S240T	≥128
	25815	WT	S175I G273D I295T	WT	S240T	64
<i>E. bugandensis</i> (n=4)	24948	WT	A270E	ND	WT	32
	26368	WT	A270E	ND	L423I L467S	32
	26376	WT	A270E	ND	L423I L467S	16
	26704	WT	A270E	ND	L423I Q80H	≥128
<i>E. ludwigii</i> (n=2)	25842	ND	ND	ND	ND	≥128
	25843	ND	S72G E171A S175T S206G T225K T260P D272E G278S Q291R Q292L K327T	ND	ND	≥128
<i>E. chengduensis</i> (n=2)	22141	S64T	WT	ND	ND	32
	23517	A72N R143Q N145D	D94A Y110F N132S	ND	ND	≥128

Espécie	Amostra	PmrA	PmrB	PhoP	PhoQ	CIMcol ($\mu\text{g/mL}$)
			Q135K			
			A163S			
			E171A			
			S206N			
			T260A			
			G278S			
			Q291R			
			V319L			

Legenda: Em vermelho são as modificações categorizadas como deletérias pelo PROVEAN.

ND: Não determinado

Em quatro amostras da espécie *E. cloacae* subsp. *cloacae* foram identificadas três alterações em PmrB (S175I, G273D e I295T). De acordo com a predição do PROVEAN, a substituição de serina por uma isoleucina na posição 175 da proteína PmrB foi considerada com um impacto “deletéria” pelo *score* (score -2.845) (Tabela 4.8). Para essas amostras a CIM variou entre 32 a $\geq 128 \mu\text{g/mL}$. Para PmrA, PhoP e PhoQ não foram encontradas modificações deletérias.

4.7. Avaliação da diversidade genética

4.7.1. Análise dos perfis clonais identificados por PFGE

As 23 amostras do estudo foram submetidas ao PFGE para avaliar o padrão de fragmentação do DNA de cada amostra e assim analisar a diversidade genética entre elas. Os perfis foram considerados como um grupo clonal quando apresentavam similaridade maior ou igual a 85%. Entre as amostras do complexo *E. cloacae* 13 grupos clonais nomeados de EcA – EcM foram identificados (Figura 4.2).

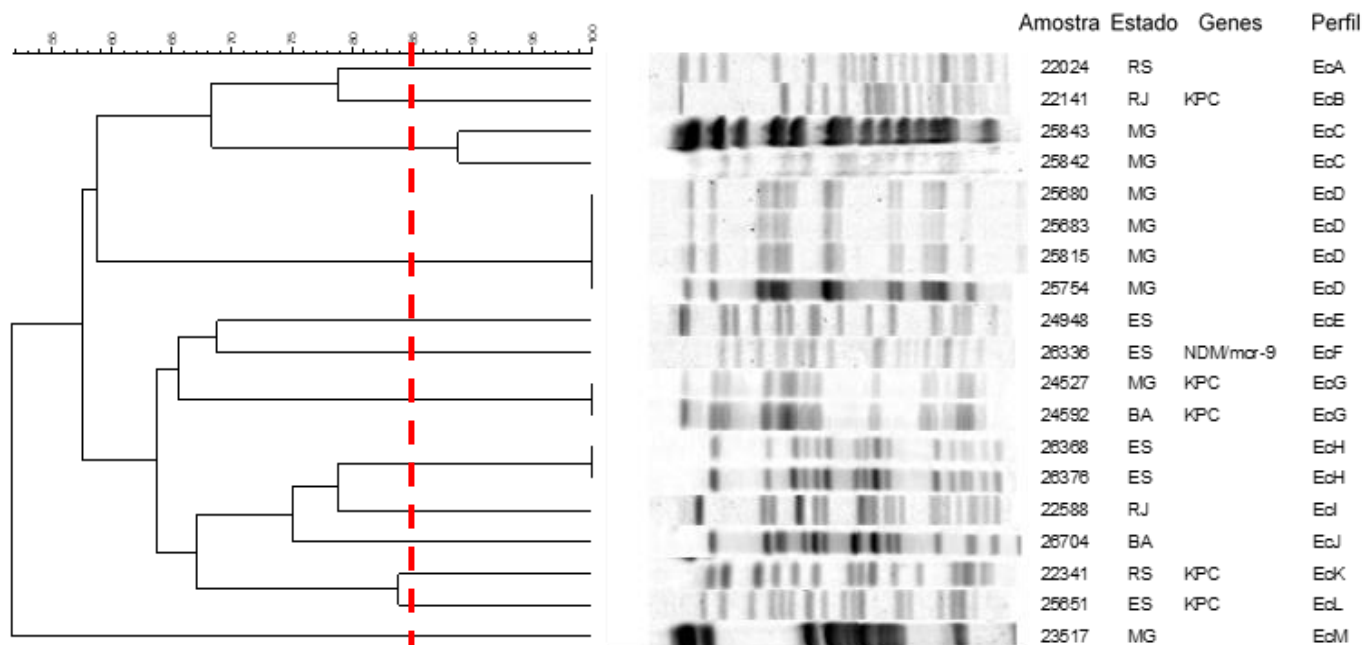


Figura 4.2: Dendrograma mostrando os perfis de fragmentação do DNA encontrados entre as 19 amostras do complexo *E. cloacae* resistentes a colistina. Linha tracejada indicando 85% de similaridade.

Entre as amostras da espécie *E. cloacae* subsp. *cloacae* foram encontrados dois clones: EcD e EcI, sendo o perfil EcD o mais frequente, com quatro amostras isoladas de sangue coletado de diferentes pacientes em um mesmo hospital em Minas Gerais no ano de 2018. O perfil de resistência aos antimicrobianos testados e as modificações encontradas nos quatro genes investigados nesse estudo (*pmrA*, *pmrB*, *phoP* e *phoQ*) foi semelhante entre as amostras identificadas como pertencentes ao clone EcD (Tabela 4.9), exceto pela sensibilidade da amostra 25683 a Piperacilina-tazobactam. A CIM para colistina entre essas amostras foi variável entre concentrações de 32 a $\geq 128 \mu\text{g/mL}$.

Tabela 4.9: Características fenotípicas das amostras de *E. cloacae* subsp. *cloacae* pertencentes ao clone EcD

Nº	Material clínico	Estado	Perfil de Resistência	Modificações	CIM $\mu\text{g/mL}$
25683	Sangue	MG	CAZ, FEP, ERT, ATM, TOB, CIP	S175I	64
25680	Sangue	MG		S175I	32
25754	Sangue	MG	TZP, CAZ, FEP, ERT, ATM, TOB, CIP	S175I	≥ 128
25815	Sangue	MG		S175I	64

Cinco clones foram identificados entre as amostras de *E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii*: EcA, EcF, EcG, EcK e EcL. Diferente do encontrado em *E. cloacae* subsp.

cloacae, não foi encontrada prevalência entre os clones. As amostras produtoras de KPC-2 pertenciam aos clones EcG, EcK e EcL, com origem nos estados de Minas Gerais, Bahia, Rio Grande do Sul e Espírito Santo, respectivamente. As duas amostras pertencentes ao clone EcG (27527 e 27592) foram isoladas nos estados de Minas Gerais e Bahia no ano de 2017.

Dentre as amostras de *E. bugandensis* foram identificados 3 clones: EcE, EcH e EcJ. As amostras 26368 e 26376, pertencentes ao clone EcH foram isoladas no Espírito Santos em 2018. As duas amostras de *E. ludwigii* pertenciam ao mesmo clone, EcC, isoladas em Minas Gerais em 2018. Dois clones foram identificados em *E. chengduensis* (EcB e EcM). No clone EcB está incluído a amostra 22141 produtora de KPC isolada no Rio de Janeiro.

Entre as 4 amostras de *K. aerogenes* identificamos 4 perfis diferentes nomeados de KaA-KaD. A amostra produtora de KPC pertenciam ao clone KaA e a positiva para NDM ao clone KaC (Figura 4.3)



Figura 4.3: Dendrograma mostrando os perfis de fragmentação do DNA encontrados entre 4 amostras de *K. aerogenes* resistentes a colistina.

Linha tracejada indicando 85% de similaridade.

4.7.2. MLST

Foram identificados 10 *sequence types* (ST) entre as amostras do complexo *E. cloacae*. Um ST novo foi identificado para *E. hormaechei* subsp *steigerwaltii*: ST1575. Foram identificados diferentes clones pelo PFGE que pertenciam a um mesmo ST. Em *E. bugandensis*, os clones EcH e EcI pertencem ao ST599. Os clones EcK e EcL de *E. hormaechei* subsp *steigerwaltii* ao ST91. Todas as amostras pertencentes ao clone EcD de *E. cloacae* subsp *cloacae* pertenciam ao ST 513 (Tabela 4.10).

Tabela 4.10 Relação entre os clones identificados por PFGE e os ST encontrados entre as amostras do complexo *E. cloacae*

Espécie	PFGE	Nº	Variante alélica							ST	UF
			<i>dnaA</i>	<i>fusA</i>	<i>gyrB</i>	<i>leuS</i>	<i>pyrG</i>	<i>rplB</i>	<i>rpoB</i>		
<i>E. hormaechei</i> subsp <i>steigerwaltii</i>	EcA	22024	4	4	4	6	1	30	127	1575	RS
	EcF	26336	360	4	391	6	39	74	6	1497	ES
	EcG	24527	58	41	14	6	69	4	6	106	MG
		24592	58	41	14	6	69	4	6	106	BA
	EcK	22341	58	37	4	6	11	4	25	91	RS
	EcL	25651	58	37	4	6	11	4	25	91	ES
<i>E. cloacae</i> subsp <i>cloacae</i>	EcD	25680	171	1	190	168	1	22	113	513	MG
		25683	171	1	190	168	1	22	113	513	MG
		25754	171	1	190	168	1	22	113	513	MG
		25815	171	1	190	168	1	22	113	513	MG
	EcI	22588	149	44	61	180	152	1	1	456	RJ
<i>E. bugandensis</i>	EcE	24948	140	19	157	167	126	8	29	917	ES
	EcH	26368	207	18	166	174	31	72	29	599	ES
		26376	207	18	166	174	31	72	29	599	ES
	EcI	26704	207	18	166	174	31	72	29	599	BA
<i>E. chengduensis</i>	EcB	22141	136	99	153	160	140	12	25	414	RJ
	EcM	23517	36	39	192	206	49	12	20	523	RJ
<i>E. ludwigii</i>	EcC	25842	231	145	246	168	229	94	147	713	MG
		25843	231	145	246	168	229	94	147	713	MG

Atualmente, existem 1574 STs depositados no banco de dados do pubmlst. A análise filogenética dos STs encontrados no presente estudo com os disponíveis no banco de dados foi realizada com o auxílio do software PHYLOViZ (<https://online.phyloviz.net/>), utilizando o algoritmo goeBURST v.1.2.1. Através desta análise foi observado que o ST106 (*E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii*) pertence ao Complexo Clonal CC106 que contém outros quatro STs (ST103, 453, 793 e 1007) com variações em apenas um *locus* gênico. O mesmo foi observado para o ST91 (*E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii*), que pertence ao CC90, contendo oito STs (ST90, 91, 224, 239, 751, 800 e 1474). OST 523 de *E. chengduensis* também pertence a um complexo clonal (CC523) contendo outros dois ST: ST1398 e ST823 e o ST599 (*E. bugandensis*) possui outros dois ST com variação de apenas um *locus* (ST593 e ST1537). Os outros STs encontrados não faziam parte de nenhum Complexo Clonal (Figura 4.4).

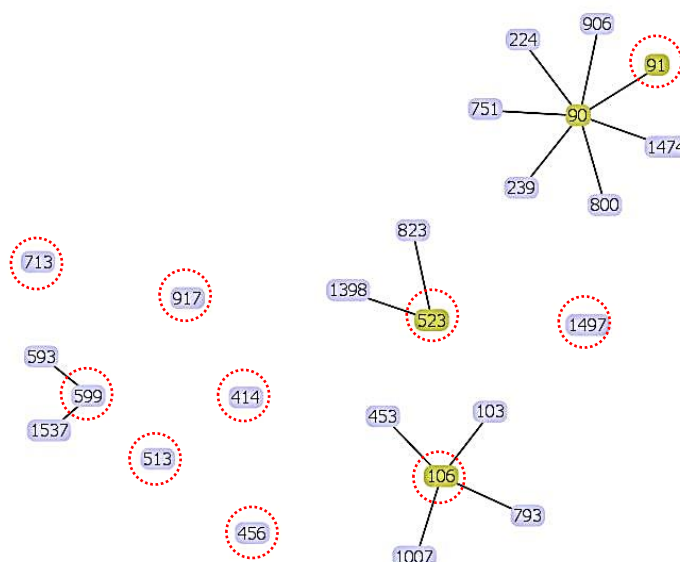


Figura 4.4 Full Minimum Spanning Tree (Full-MST) Parcial obtida através do software PHYLOViZ. Complexos clonais em *E. cloacae*. Os STs com círculos vermelhos tracejados foram os encontrados no presente estudo.

Os perfis de fragmentação das amostras de *K. aerogenes*, KaA e KaB, identificados no PFGE, pertencem ao mesmo ST (ST93). Essas amostras foram isoladas em Goiás e no Ceará, respectivamente. O ST da amostra 24777, correspondente ao clone KaC, foi submetido ao

ubmlst e gerado um novo ST: ST227. Para a amostra 21881 não foi definido o ST devido a qualidade do sequenciamento e não foi inserida na Tabela 4.11.

Tabela 4.11: Relação entre os clones identificados por PFGE e os ST encontrados entre as amostras de *K. aerogenes*

Espécie	PFGE	N°	Variante alélica							ST	UF
			<i>dnaA</i>	<i>fusA</i>	<i>gyrB</i>	<i>leuS</i>	<i>pyrG</i>	<i>rplB</i>	<i>rpoB</i>		
<i>K. aerogenes</i>	KaA	23461	3	3	2	18	3	1	10	93	GO
	KaB	24514	3	3	1	18	3	1	10	93	CE
	KaC	24777	10	2	3	28	1	1	2	227	RS

No banco de dados do pubmlst, há 227 STs de *K. aerogenes*. Através da análise com auxílio do software PHYLOViZ, o ST93 formou um complexo clonal incluindo os STs: ST160, 161, 50, 162, 60 e 191 (Figura 4.5).

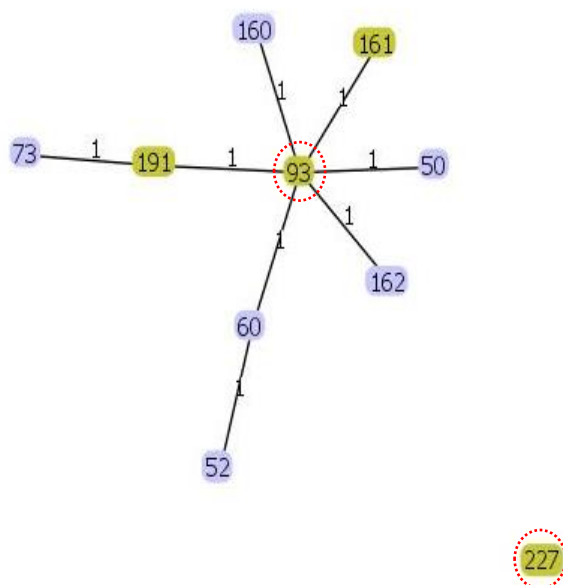


Figura 4.5: Full Minimum Spanning Tree (Full-MST) Parcial obtida através do software PHYLOViZ. Complexos clonais *K. aerogenes*. Os STs com círculos vermelhos tracejados foram os encontrados no presente estudo.

5. DISCUSSÃO

A resistência a polimixina é um problema crescente dentre as espécies de importância clínica da ordem Enterobacterales. Apesar da importância clínica do complexo *E. cloacae* e *K. aerogenes*, este é um assunto pouco estudado comparados a outras espécies como *K. pneumoniae* e *E. coli*. Contudo, os estudos mostram taxas significativas de resistência a polimixinas nestes dois grupos de bactérias desde 2001 (104)

Gales e colaboradores (2006) avaliando a atividade de polimixina B em bacilos Gram negativos isolados de diferentes hospitais da Ásia-Pacífico, Europa, América Latina e América do Norte entre 2001 e 2004, mostraram taxa de resistência de 1,8% em *K. pneumoniae* e 0,5% em *E. coli*, enquanto para o gênero *Enterobacter* (incluindo *K. aerogenes*, *C. sakazaki* e *P. gergoviae*) a taxa de resistência foi de 16,7%, sendo *K. aerogenes* e *E. cloacae* as espécies mais frequentes (104). Em estudo com amostras isoladas apenas em hospitais da América Latina no período entre 2008 – 2010, a taxa de resistência a polimixina no Brasil para o gênero *Enterobacter* (incluindo *K. aerogenes*) foi semelhante ao encontrado no estudo anterior do mesmo grupo (16,6%) (105). Sader e colaboradores avaliando a susceptibilidade em Gram-negativos isolados de pacientes hospitalizados nos Estados Unidos e na Europa no período de 2009 a 2012, encontraram uma taxa de resistência de 13,6% nos EUA e 15% na Europa para o gênero *Enterobacter* sp (106). Um estudo realizado na Coreia em 2018 encontrou uma taxa de resistência de 4,2% em *K. aerogenes*, enquanto a maior taxa foi encontrada para o complexo *E. cloacae* (23,9%) (107). O presente estudo mostrou taxa de 20% de resistência a polimixina entre as amostras do complexo *E. cloacae* e 13% em *K. aerogenes* corroborando com os dados encontrados na literatura.

Através da triagem usando meio EMB contendo 4µg/ml de colistina, foi observado crescimento de oito amostras que se mostraram sensíveis através da determinação da CIM pela microdiluição em caldo. Esta redução do número de amostras selecionadas após determinação da CIM para colistina pode ser justificada pela lenta difusão das polimixinas através do ágar, devido a característica catiônica da molécula e sua propensão a se ligar em superfícies plásticas fato que está inclusive relacionado ao desenvolvimento de pequenas zonas de inibição mesmo em amostras sensíveis, o que insere significativa quantidade de variabilidade nos ensaios de difusão em ágar e consequentemente os estudos com esse antimicrobiano (HUMPHRIES, 2014).

Chew e colaboradores (2017), avaliaram os métodos automatizados Sensititre®, Microscan®, Vitek2® e as tiras de gradiente (Etest®) para a avaliação da susceptibilidade à

polimixina e compararam com o padrão-ouro (microdiluição) em 76 cepas de Enterobacteriaceae, sendo 21 *mcr-I*-positivas. Os resultados confirmaram a falta de acurácia da automação em determinar a categorização correta para esses antimicrobianos. O estudo chama a atenção ainda para o fato de que a maioria das CIMs para os isolados *mcr-I*-positivos encontravam-se próximos ao breakpoint, sugerindo uma dificuldade na interpretação desses resultados e possível subnotificação de cepas produtoras de MCR (108). Dessa forma, atualmente, apenas a microdiluição em caldo é recomendada para avaliação da susceptibilidade às polimixinas B e E (colistina).

Apesar da alta taxa de resistência a polimixina encontrada no presente estudo, taxas significativas de sensibilidade a outros antimicrobianos, principalmente aos aminoglicosídeos (amicacina e gentamicina) e tigeciclina foram encontradas, exceto as amostras de *K. aerogenes* que apresentaram um perfil de resistência a amicacina.

Estes dados estão de acordo com o descrito na literatura. Hong e colaboradores avaliaram o perfil de suscetibilidade de 51 amostras do complexo *E. cloacae* e *K. aerogenes* resistentes a polimixina isoladas em oito hospitais na Coréia e observaram baixa taxa de resistência a gentamicina para o complexo *E. cloacae* (2%), enquanto para amostras de *K. aerogenes* foi observado taxa de 50%. Para tigeciclina foi observada taxas de sensibilidade de 13,7% e 50% para o complexo *E. cloacae* e *K. aerogenes*, respectivamente (107).

Em relação aos carbapenêmicos, as amostras do complexo *E. cloacae* do nosso estudo, apresentaram baixas taxas de resistência ao meropenem e ao imipenem (26%). No estudo de Hong e colaboradores, citado anteriormente, baixas taxas de resistência aos carbapenêmicos meropenem e imipenem também foram encontradas. Para as amostras de *E. cloacae* resistentes a colistina, 2% foram resistentes a imipenem e meropenem, enquanto para *K. aerogenes* resistentes a colistina, nenhuma amostra foi resistente ao imipenem e 16,7% (1/6) foram resistentes ao meropenem (107).

Apesar da baixa resistência ao imipenem e meropenem, a maioria das amostras foi resistente ao ertapenem (74% das amostras de complexo *E. cloacae* 100% das amostras de *K. aerogenes*). Estas espécies possuem intrinsecamente beta-lactamases do tipo AmpC, que quando superexpressas podem levar a um fenótipo de suscetibilidade reduzida ou resistência aos carbapenemas, com o ertapenem sendo geralmente mais afetado (42). Mammeri e colaboradores mostraram que a expressão de AmpC associada a baixa expressão das porinas OmpC e OmpF em *E. coli* conferiu altos níveis de resistência ao ertapenem, sugerindo que essa

associação pode favorecer a redução da suscetibilidade aos carbapenemas, sendo a suscetibilidade ao imipenem e ao meropenem menos afetadas comparado ao ertapenem (109).

Chavda e colaboradores avaliaram o genoma de 97 amostras de *Enterobacter* spp resistentes aos carbapenemas e encontraram a prevalência de detecção da carbapenemase do tipo KPC. Semelhante ao encontrados no nosso estudo, a carbapenemase NDM foi a menos prevalente (110). Desde sua descrição, KPC tem sido reportada globalmente em Gram negativos, sendo KPC-2 a principal variante disseminada no Brasil e no mundo (47,63). Em um estudo anterior do nosso laboratório, avaliando a epidemiologia molecular de KPC em espécies da Ordem Enterobacterales (excluindo as amostras de *K. pneumoniae*) no Brasil entre 2009 e 2011, a frequência de KPC em *K. aerogenes* foi 31,4%, enquanto em *E. cloacae* a taxa foi de 17% (111).

A emergência da resistência a polimixina tem sido associada a disseminação de Enterobactérias produtoras de carbapenemases, sugerindo que o uso de polimixinas para o tratamento de infecções por essas bactérias esteja exercendo uma pressão seletiva, selecionando amostras resistentes a polimixina. Contudo, no nosso estudo, a frequência de detecção da produção de carbapenemases foi baixa e a suscetibilidade aos carbapenemas imipenem e meropenem alta, sugerindo que o aumento do uso de polimixinas como opção terapêutica esteja gerando uma pressão seletiva de uma forma geral no ambiente hospitalar e não somente sobre as bactérias produtoras de carbapenemases.

Com o aumento da resistência as polimixinas entre as amostras produtoras de carbapenemases, restam poucas opções de tratamento disponíveis. Recentemente foi disponibilizado para a prática clínica, a combinação do betalactâmico Ceftazidima com o inibidor de betalactamase Avibactam que possui atividade sobre as serino-carbapenemases como a KPC. No nosso estudo, os resultados sugerem a possibilidade deste antimicrobiano ser uma alternativa de tratamento entre as amostras produtoras de KPC resistentes a polimixina. Todas as amostras produtoras de KPC mostraram-se sensíveis a CAZ/AVI com $CIM_{CAZ/AVI}$ entre 0,38 a 1,5 μ g/mL. Esse resultado corrobora com o encontrado em um estudo avaliando a atividade de CAZ/AVI em isolados de Enterobacteriaceae de 18 países europeus, através de dados do International Network of Optimal Resistance Monitoring (INFORM), programa de vigilância em resistência antimicrobiana, no qual 98,9% das amostras de Enterobacteriaceae produtoras de KPC foram suscetíveis a essa combinação. (94). Contudo, apesar de raro, a resistência a CAZ/AVI tem sido descrita em *K. pneumoniae* (112)

Apesar da relevância clínica do complexo *E. cloacae*, informações sobre a frequência nas infecções humanas, perfil de resistência aos antimicrobianos para cada espécie do complexo é pouco discutida. A similaridade fenotípica nos testes bioquímicos convencionais e os resultados não discriminatórios em testes automatizados para essas espécies, dificulta a correta identificação. O uso do MALDI-TOF MS permitiu identificar corretamente *E. cloacae* e *E. nimipressuralis*, com resultados não discriminatórios para *E. asburiae*, *E. hormaechei*, *E. kobei* e *E. ludwigii* (20). A comparação de metodologias sugere o sequenciamento do *hsp60* como mais discriminatório quando comparado a outros genes como *oriC*, *gyrB*, *rpoB* (21).

Estudos apontam a prevalência de *E. hormaechei* entre as espécies do complexo. Kremer e Hoffman encontraram uma prevalência de *E. hormaechei* amostras clínicas, entre eles 31% subespécies *E. hormaechei* subsp *steigerwaltii* e 25% para o Cluster III que no período do estudo não havia a classificação para *E. hormaechei* subsp. *hoffmannii* (113). Um estudo realizado por Morand e colaboradores avaliando a distribuição das espécies do complexo *E. cloacae* isoladas de infecções em implantes ortopédicos que as espécies mais frequentes foram *E. hormaechei* subsp *steigerwalltii* seguido de *E. hormaechei* subsp. *oharae* (MORAND et al., 2009). Apesar do nosso estudo avaliar a frequência das espécies do complexo *E. cloacae* resistentes a colistina, observou-se uma relação da frequência de identificação dessas espécies em infecções e a frequência de resistência a polimixina. As espécies mais frequentes no nosso estudo também foram *E. hormaechei* subsp *steigerwallti* (31,6%) e *E. cloacae* subsp *cloacae* (26,3%).

E. bugandensis é uma espécie descrita recentemente causando quadro de sepse em neonatais (14). Em um estudo genômico com amostras do complexo *E. cloacae* positivas para *bla_{IMI}* isoladas em Singapura em um período de 5 anos encontrou uma frequência de 13,8% para *E. bugandensis* (114). Em nosso estudo, essa espécie foi a terceira mais frequente. Em nosso estudo duas amostras foram identificadas como *E. chengduensis*. Desde a sua descrição em 2019, não houve outros estudos identificando essa espécie em infecções clínicas (15). Sua relação com o complexo não é definida, entretanto, por inicialmente ser identificada por testes bioquímicos convencionais e para fins de análise, ela foi incluída no presente estudo ao complexo.

E. ludwigii é frequentemente descrita em estudos com plantas e animais, contudo há descrição causando infecções sanguíneas e isoladas em cateter urinário (115–117). A relação da frequência de resistência a colistina para as espécies *E. bugandensis*, *E. chengduensis* e *E. ludwigii* não haviam sido descritas até o presente estudo.

A resistência as polimixinas podem ser causadas por mutações em genes que codificam os sistemas de dois componentes, principalmente, PhoP/PhoQ e PmrA/PmrB e o gene regulador do sistema *mgrB* e pela aquisição de genes plasmidiais que codificam uma fosfoetanolaminotransferase (genes *mcr*) (69,84,118). Em 2015 foi descrito o gene *mcr-I* conferindo resistência a polimixina em amostras de *E. coli* isolados em alimentos, animais e humanos (76). Desde a sua descrição, foram descritas 10 variantes do gene *mcr* em diferentes espécies ao redor do mundo (79–83,87–89) No Brasil, há identificação desse gene em diferentes espécies (85,119). Entretanto, a detecção de *mcr-I* não é frequente em *Enterobacter* spp. As poucas descrições neste grupo de bactérias, mostraram a presença da variante *mcr-I* em *K. aerogenes* e *E. cloacae* isoladas na China e na França (77,120).

Em nosso estudo, encontramos uma amostra de *E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii* carregando o gene *mcr-9* e o gene *bla_{NDM}*. Essa variante de *mcr* tem sido frequentemente identificada em *Enterobacter* spp., com uma prevalência em *E. hormaechei*. Li e colaboradores mostraram a distribuição dessa variante em diferentes países em amostras isoladas de humanos, animais, ambiente e alimentos, sendo *Enterobacter* spp a espécie mais comum carregando esse gene (121).

Além disso, alguns estudos também têm mostrado a associação deste gene com genes de carbapenemases. O estudo realizado por Yuan e colaboradores na China mostrou a coprodução de *mcr-9* e *bla_{NDM-1}* em *E. hormaechei* isolado de um paciente com infecção sanguínea (122). Outro estudo descreveu uma amostra de *E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii* carregando *mcr-9* e *bla_{VIM-4}* isolado de um paciente pediátrico com infecção de garganta (123). Semelhante a esses dados, a coprodução de *mcr-9* já foi identificada com outras carbapenemases em *Enterobacter* spp. como IMP-1 (124) e VIM-1 (125).

O interessante a se observar é a CIM para polimixinas que algumas amostras apresentam quando positivas para *mcr-9*. A presença dos genes *mcr-I* tem sido associada a baixos níveis de resistência às polimixinas (CIM 4-8 µg/mL) (76,77,85,126). Entretanto, a maioria dos relatos de *mcr-9* são em amostras sensíveis a polimixina. Como no estudo de Kananizadeh e colaboradores (2020) em que as amostras que carregavam este gene (*E. hormaechei* subsp. *xiangfangensis* e *E. asburiae*) apresentaram CIM de 0,125µg/mL (124). Soliman e colaboradores (2020) encontraram CIM de 0.25 µg/mL para colistina em uma amostra de *E. hormaechei* positiva para *mcr-9* e *bla_{VIM-4}* isolada de escarro de um paciente no Cairo, Egito (127).

Diferentemente desses dados, no nosso estudo a amostra positiva para *mcr-9* e produtora de NDM apresentou CIM de 4µg/mL, sendo considerada resistente a colistina, apesar de ser uma CIM baixa. No trabalho publicado por Yuan e colaboradores, a amostra co-produtora de NDM-1 e Mcr-9 também se mostrou resistente com CIM de 16µg/mL. Ressaltando a importância de se estudar os mecanismos associados a resistência à polimixina.

A resistência a polimixina em níveis mais altos têm sido associadas principalmente a mutações nos genes do sistema de dois componentes (*phoP/Q* e *pmrA/B*). Um estudo realizado por Guérin em 2016 mostrou a associação do sistema PhoP/ PhoQ com a resistência a polimixina em *Enterobacter* spp, uma vez que mutantes deletados para esses genes se tornaram sensíveis e quando restaurados os genes, as amostras retornaram ao fenótipo de resistência (74). Outros estudos também têm mostrado a ausência de mutações ou de mutações significativas nos genes associados a resistência a polimixinas (128).

Mutações em PmrA e PmrB também têm sido associadas a resistência a polimixinas em *E. cloacae* (Chavda et al, 2018; Dagner, 2019). Algumas das substituições em PmrB detectadas em nosso estudo em *E. hormaechei subsp steigerwallti* (A344T, I134V e T121A) já foram detectadas em amostras de *E. hormaechei* suscetíveis e resistentes à colistina (129). Dentre as diferentes mutações identificadas nos genes *pmrA/B*, *phoP/Q*, apenas a modificação por substituição de aminoácidos em PmrB (S175I) de *E. cloacae subsp cloacae* apresentou efeito deletério através da análise pelo programa Provean, sugerindo um provável comprometimento da função proteica para manutenção da viabilidade da célula bacteriana em meio a pressão do antimicrobiano, com CIM de colistina variando entre 32µg/mL a 128µg/mL. Entretanto, outras amostras sem mutações deletérias também apresentaram CIM altas, sugerindo a possibilidade de outros mecanismos de resistência e que não necessariamente essas mutações encontradas estejam relacionadas à resistência ao antimicrobiano.

O gene *mgrB* não foi estudado nesse trabalho. Entretanto dados recentes sugerem que a inativação deste gene seja responsável pela resistência a colistina em *E. hormaechei subsp steigerwallti* (130). A ausência desse gene também tem sido descrito como responsável pela resistência a colistina em *E. cloacae* no estudo recente de Wozniak e colaboradores (131). Contudo, outros genes podem estar associados a resistência a polimixina. Há estudos que reportam a superexpressão da bomba de efluxo *acrAB-tolC* regulada pelo gene *soxRS* ligada a heterorresistencia em *E. cloacae* e *E. asburiae* (132). O operon *crrB* tem sido associado a resistência a colistina em *K. pneumoniae* (133), na qual a inativação do gene *crrB* (proteína quinase) gera uma superexpressão do operon *pmrAB* e adição de L-Ara4N e pEtN no lipídeo A

no LPS e alteração da carga da membrana externa reduzindo a afinidade da polimixina pelo seu alvo.

Em nosso estudo, não foi possível avaliar modificações em *K. aerogenes*. Contudo, até momento, um estudo de Diene e colaboradores avaliando o genoma de uma amostra clínica de *K. aerogenes* com perfil de resistência a vários antimicrobianos (exceto gentamicina), sugeriu a associação da substituição G53S na proteína PmrA a CIM para colistina de 16µg/mL (37).

A resistência a polimixinas tem sido associada a clones epidêmicos em *K. pneumoniae*, a exemplo do complexo clonal CC11, o complexo de grande importância em *K. pneumoniae* associado a produção de KPC (61,134). Bartolleti e colaboradores (2016) estudaram a resistência à polimixina B em 62 isolados clínicos de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenemas na cidade de São Paulo/SP e encontraram maior prevalência de resistência às polimixinas em cepas não susceptíveis aos carbapenemas, sendo o ST11 (48,4%) e o ST437 (27,4%) os mais prevalentes, ambos pertencentes ao CC11 (135).

Através do PFGE foram encontrados 13 perfis clonais entre as amostras do complexo *E. cloacae* e 11 STs através de MLST. Os perfis EcK e EcL de *E. hormaechei subsp steigerwaltii*, produtores de KPC, pertenciam ao ST91, assim como o EcH e EcI de *E. bugandensis* pertenciam ao ST599. Em *K. aerogenes* também foi encontrada esse resultado, no qual os perfis KaA e KaB pertenciam ao mesmo ST, o ST93. A detecção de diferentes perfis de fragmentação pelo PFGE pertencentes ao mesmo ST também tem sido relatado em outros estudos. Cai e colaboradores (2019) descreveram amostras de *E. cloacae* de 4 diferentes pulsotipos que pertenciam ao ST114 (136). De forma semelhante, Izdebski e colaboradores (2015) comparando PFGE com MLST encontraram uma relação entre os resultados (137). Estes achados sugerem que o PFGE seja mais discriminatório que o MLST.

Não foram encontrados estudos recentes avaliando a resistência a polimixinas e os clones ou STs em *Enterobacter* spp. O primeiro estudo que descreveu a distribuição dos clones em 173 isolados de *E. cloacae* resistentes a cefalosporinas em diferentes hospitais em países da Europa e Israel, identificou por MLST 88 STs, sendo ST78, ST66, ST114 e ST108 prevalentes e cada um representado com mais de 10 isolados de países diferentes, com diferentes pulsotipos, relacionados em um ou mais hospitais, ressaltado pelos autores sugerindo o potencial epidêmico desses STs (137). Nesse estudo foi descrito um novo ST (ST106) com amostras positivas para as ESBLs: TEM-21 e CTX-M-3. (137). Apesar de avaliado a presença de carbapenemases no estudo, não foi detectado no ST106 amostras produtoras de KPC, diferentemente do nosso estudo, no qual as amostras do ST106 eram produtoras de KPC e com CIM_{colistina} de 32µg/mL.

Após esse estudo, um mais recente de 2018, analisando o sequenciamento de genoma total de 170 amostras clínicas de *Enterobacter* spp produtores de carbapenemases coletadas 2008–2014, encontraram os ST: 114, ST93, ST90 e ST78 como prevalentes e associados a diferentes carbapenemases (138).

No presente estudo, não foram encontrados prevalência de clones ou associação com produção de carbapenemases e resistência a polimixinas entre as amostras do complexo *E. cloacae* e *K. aerogenes*, sugerindo que ao aumento da resistência a estes antimicrobianos esteja relacionado a pressão seletiva exercida pelo aumento do uso nos hospitais. Ressaltamos a importância em ampliar o número de amostras para uma análise mais abrangente do cenário da resistência as polimixinas em *K. aerogenes* e no complexo *E. cloacae*.

6. CONCLUSÃO

A frequência de resistência as polimixinas encontrada no presente estudo entre os isolados do complexo *E. cloacae* foi maior comparada a *K. aerogenes*, corroborando o que tem sido observado em estudos anteriores. Sendo *E. hormaechei* e *E. cloacae* as espécies do complexo *E. cloacae* as mais isolada no presente estudo.

De modo geral, todas as 23 amostras do estudo apresentaram um perfil de resistência a maioria dos antimicrobianos testados, com sensibilidade a gentamicina (22%), amicacina (22%) e tigeciclina (22%), sugerindo-os como opções de tratamento entre essas amostras. Analisando a resistência dentre as espécies do complexo *E. cloacae*, as amostras de *E. cloacae* e *E. hormaechei* apresentaram níveis de resistência maiores que as outras espécies identificadas.

A taxa de produção de carbapenemase foi baixa dentre as amostras resistentes a polimixina. Entretanto, as CIM para colistina dentre as amostras produtoras de KPC foram altas. Dado esperado, uma vez que as polimixinas são utilizadas como opção terapêuticas em infecções causadas por bactérias resistentes aos carbapenemas.

A associação Ceftazidima/Avibactam foi ativa contra todos os isolados testados, mostrando-se uma opção terapêutica para cepas produtoras de serino-carbapenemases do tipo KPC e resistentes à colistina no presente estudo.

A frequência de identificação de genes plasmidiais de resistência a polimixina (*mcr*) foi baixo e esperado de acordo com os dados publicados até o momento, sendo apenas uma amostra de *E. hormaechei* positiva para *mcr-9* e produtora de NDM.

Em relação aos mecanismos de resistência associado a mutações em genes dos sistemas de dois componentes, apenas em *E. cloacae* foi encontrada uma modificação em PmrB, mas que não mostrou correlação com a CIM para polimixina, sugerindo que outros mecanismos possam estar associados aos níveis de resistência encontrados no presente estudo.

Dado o número de amostras, não foi observada prevalência de clones dentre as amostras resistentes à polimixina, sugerindo que os níveis de resistência a esse antimicrobiano estar relacionado ao aumento do uso desse fármaco nos hospitais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. WHO | Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014. *Antimicrob Resist Glob Rep Surveill 2014* [Internet]. 2016 [citado 9 de novembro de 2020]; Available at: <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>
2. World Health Organization (WHO). Global antimicrobial resistance surveillance system (GLASS) report: early implementation 2016-2017. Geneva; 2017.
3. O'Neill J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations: the review on antimicrobial resistance; 2016 [Available from: <https://amr-review.org> [Internet]. Publications. html. 2019 [citado 9 de novembro de 2020]. Available at: [https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final paper_with cover.pdf](https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf)
4. Paterson DL. Resistance in Gram-Negative Bacteria: Enterobacteriaceae. *Am J Med* [Internet]. 1 de junho de 2006 [citado 1 de novembro de 2020];119(6):S20–8. Available at: <http://www.amjmed.com/article/S0002934306003445/fulltext>
5. Jorgensen JH, Pfaller MA. Introduction to the 11th Edition of the *Manual of Clinical Microbiology*. In: *Manual of Clinical Microbiology* [Internet]. Washington, DC, USA: ASM Press; 2015 [citado 3 de dezembro de 2020]. p. 1–4. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1128/9781555817381.ch1>
6. Adeolu M, Alnajjar S, Naushad S, Gupta RS. Genome-based phylogeny and taxonomy of the ‘Enterobacteriales’: Proposal for enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morgane. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2016;66(12):5575–99.
7. Tacconelli E, Magrini N. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. *Organ Mund la Salud* [Internet]. 2017 [citado 9 de novembro de 2020];1–7. Available at: <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/>
8. Davin-Regli A, Lavigne J-PP, Pagès J-MM. *Enterobacter* spp.: Update on Taxonomy, Clinical Aspects, and Emerging Antimicrobial Resistance. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 17 de julho de 2019 [citado 3 de dezembro de 2020];32(4):1–32. Available at: <https://doi.org/10.1128/CMR.00002-19>.
9. Moura Q, Fernandes MR, Cerdeira L, Nhambe LF, Jenne S, Souza TA, et al. Draft genome sequence of a multidrug-resistant KPC-2-producing *Enterobacter aerogenes* isolated from a hospitalised patient in Brazil. *J Glob Antimicrob Resist* [Internet]. 1 de setembro de 2017 [citado 2 de novembro de 2020];10(2010):277–8. Available at:

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28764940/>
10. Sader HS, Farrell DJ, Flamm RK, Jones RN. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative organisms isolated from patients hospitalized in intensive care units in United States and European hospitals (2009-2011). *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. 1 de abril de 2014 [citado 3 de dezembro de 2020];78(4):443–8. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.11.025>
 11. Mezzatesta ML, Gona F, Stefani S. *Enterobacter cloacae* complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. *Future Microbiol* [Internet]. 24 de julho de 2012 [citado 3 de dezembro de 2020];7(7):887–902. Available at: <https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/fmb.12.61>
 12. Zhu B, Lou M-M, Xie G-L, Wang G-F, Zhou Q, Wang F, et al. *Enterobacter mori* sp. nov., associated with bacterial wilt on *Morus alba* L. *Int J Syst Evol Microbiol* [Internet]. 1 de novembro de 2011 [citado 1 de novembro de 2020];61(11):2769–74. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21216919/>
 13. Tindall BJ, Sutton G, Garrity GM. *Enterobacter aerogenes* Hormaeche and Edwards 1960 (Approved lists 1980) and *Klebsiella mobilis* bascomb et al. 1971 (approved lists 1980) share the same nomenclatural type (ATCC 13048) on the approved lists and are homotypic synonyms, with consequences for. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2017;67(2):502–4.
 14. Doijad S, Imirzalioglu C, Yao Y, Pati NB, Falgenhauer L, Hain T, et al. *Enterobacter bugandensis* sp. nov., isolated from neonatal blood. *Int J Syst Evol Microbiol* [Internet]. 1 de fevereiro de 2016 [citado 3 de dezembro de 2020];66(2):968–74. Available at: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ijsem.0.000821>
 15. Wu W, Feng Y, Zong Z. Characterization of a strain representing a new *Enterobacter* species, *Enterobacter chengduensis* sp. nov. *Antonie Van Leeuwenhoek* [Internet]. 9 de abril de 2019 [citado 3 de dezembro de 2020];112(4):491–500. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10482-018-1180-z>
 16. Brady C, Cleenwerck I, Venter S, Coutinho T, De Vos P. Taxonomic evaluation of the genus *Enterobacter* based on multilocus sequence analysis (MLSA): Proposal to reclassify *E. nimipressuralis* and *E. amnigenus* into *Lelliottia* gen. nov. as *Lelliottia nimipressuralis* comb. nov. and *Lelliottia amnigena* comb. nov., . *Syst Appl Microbiol*. 2013;36(5):309–19.
 17. Jang KS, Kim YH. Rapid and robust MALDI-TOF MS techniques for microbial identification: a brief overview of their diverse applications [Internet]. Vol. 56, *Journal of Microbiology*. Microbiological Society of Korea; 2018 [citado 7 de fevereiro de

- 2021]. p. 209–16. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29492868/>
18. Furniss CRD, Dortet L, Bolland W, Drews O, Sparbier K, Bonnin RA, et al. Fast and robust detection of colistin resistance in *Escherichia coli* using the MALDI Biotyper Sirius mass spectrometry system. *bioRxiv*. 2019;57(12):1–7.
 19. Fang L, Xu H, Ren X, Li X, Ma X, Zhou H, et al. Epidemiology and Risk Factors for Carbapenem-Resistant *Klebsiella Pneumoniae* and Subsequent MALDI-TOF MS as a Tool to Cluster KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae*, a Retrospective Study. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10(September):1–8.
 20. Pavlovic M, Konrad R, Iwobi AN, Sing A, Busch U, Huber I. A dual approach employing MALDI-TOF MS and real-time PCR for fast species identification within the *Enterobacter cloacae* complex. *FEMS Microbiol Lett* [Internet]. 1 de março de 2012 [citado 1 de novembro de 2020];328(1):46–53. Available at: <https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.2011.02479.x>
 21. Hoffmann H, Roggenkamp A. Population Genetics of the Nomenclotype *Enterobacter cloacae*. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 1 de setembro de 2003 [citado 31 de maio de 2020];69(9):5306–18. Available at: <https://aem.asm.org/content/69/9/5306>
 22. Sutton GG, Brinkac LM, Clarke TH, Fouts DE. *Enterobacter hormaechei* subsp. *hoffmannii* subsp. nov., *Enterobacter hormaechei* subsp. *xiangfangensis* comb. nov., *Enterobacter roggkampii* sp. nov., and *Enterobacter muelleri* is a later heterotypic synonym of *Enterobacter asburiae* based on computational analysis. *F1000Research*. 2018;7:521.
 23. Hormaeche E, Edwards PR. A Proposed Genus *Enterobacter*. *Int Bull Bacteriol Nomencl Taxon* [Internet]. 1 de abril de 1960 [citado 3 de dezembro de 2020];10(2):71–4. Available at: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/0096266X-10-2-71>
 24. Dalben M, Varkulja G, Basso M, Krebs VLJ, Gibelli MA, van der Heijden I, et al. Investigation of an outbreak of *Enterobacter cloacae* in a neonatal unit and review of the literature. Vol. 70, *Journal of Hospital Infection*. W.B. Saunders Ltd; 2008. p. 7–14.
 25. Pestourie N, Garnier F, Barraud O, Bedu A, Ploy M-CC, Mounier M. Outbreak of AmpC β -lactamase-hyper-producing *Enterobacter cloacae* in a neonatal intensive care unit in a French teaching hospital. *Am J Infect Control* [Internet]. 1 de abril de 2014 [citado 8 de novembro de 2020];42(4):456–8. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24679578/>
 26. Mezzatesta ML, Gona F, Stefani S. *Enterobacter cloacae* complex: Clinical impact and

- emerging antibiotic resistance. Vol. 7, Future Microbiology. 2012. p. 887–902.
27. Liu F, Yang J, Xiao Y, Li L, Yang F, Jin Q. Complete genome sequence of a clinical isolate of *Enterobacter asburiae*. Genome Announc [Internet]. 2016 [citado 8 de novembro de 2020];4(3). Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27284137/>
 28. Markovska R, Stoeva T, Stankova P, Boyanova L, Dimitrova D, Gergova R, et al. First report of *Enterobacter asburiae* isolate, producing NDM-1 and a novel ACT-68 enzyme in Bulgaria. Infect Dis (Auckl) [Internet]. 3 de agosto de 2019 [citado 8 de novembro de 2020];51(8):627–9. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31188042/>
 29. Brenner DJ, McWhorter AC, Kai A, Steigerwalt AG, Farmer JJ. *Enterobacter asburiae* sp. nov., a new species found in clinical specimens, and reassignment of *Erwinia dissolvens* and *Erwinia nimipressuralis* to the genus *Enterobacter* as *Enterobacter dissolvens* comb. nov., and *Enterobacter nimipressuralis* comb. nov. J Clin Microbiol. 1986;23(6):1114–20.
 30. Wenger PN, Tokars JI, Brennan P, Samel C, Bland L, Miller M, et al. An outbreak of *Enterobacter hormaechei* infection and colonization in an intensive care nursery. Clin Infect Dis [Internet]. 1997 [citado 8 de novembro de 2020];24(6):1243–4. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9195091/>
 31. da Silva CLP, Miranda LEV, Moreira BM, Rebello D, Carson LA, Kellum ME, et al. *Enterobacter hormaechei* bloodstream infection at three neonatal intensive care units in Brazil. Pediatr Infect Dis J [Internet]. fevereiro de 2002 [citado 8 de novembro de 2020];21(2):175–7. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11840092/>
 32. Campos LC, Lobianco LF, Seki LM, Santos RMR, Asensi MD. Outbreak of *Enterobacter hormaechei* septicaemia in newborns caused by contaminated parenteral nutrition in Brazil [Internet]. Vol. 66, Journal of Hospital Infection. Elsevier; 2007 [citado 1 de novembro de 2020]. p. 95–7. Available at: <http://www.journalofhospitalinfection.com/article/S0195670107000606/fulltext>
 33. Kosako Y, Tamura K, Sakazaki R, Miki K. *Enterobacter kobei* sp. nov., a new species of the family Enterobacteriaceae resembling *Enterobacter cloacae*. Curr Microbiol [Internet]. outubro de 1996 [citado 8 de novembro de 2020];33(4):261–5. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8824173/>
 34. Hoffmann H, Stindl S, Stumpf A, Mehlen A, Monget D, Heesemann J, et al. Description of *Enterobacter ludwigii* sp. nov., a novel *Enterobacter* species of clinical relevance. Syst Appl Microbiol [Internet]. 22 de abril de 2005 [citado 31 de maio de 2020];28(3):206–12. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15900967/>
 35. Eke P, Kumar A, Sahu KP, Wakam LN, Sheoran N, Ashajyothi M, et al. Endophytic

- bacteria of desert cactus (*Euphorbia trigonas* Mill) confer drought tolerance and induce growth promotion in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Microbiol Res.* 1 de novembro de 2019;228:126302.
36. Harada K, Shimizu T, Mukai Y, Kuwajima K, Sato T, Kajino A, et al. Phenotypic and molecular characterization of antimicrobial resistance in *Enterobacter* spp. isolates from companion animals in Japan. Butaye P, organizador. *PLoS One* [Internet]. 22 de março de 2017 [citado 3 de dezembro de 2020];12(3):e0174178. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174178>
 37. Diene SM, Merhej V, Henry M, El Filali A, Roux V, Robert C, et al. The rhizome of the multidrug-resistant *Enterobacter aerogenes* genome reveals how new “Killer Bugs” are created because of a sympatric lifestyle. *Mol Biol Evol* [Internet]. 1 de fevereiro de 2013 [citado 2 de novembro de 2020];30(2):369–83. Available at: <https://academic.oup.com/mbe/article/30/2/369/1017110>
 38. Davin-Regli A, Pagès J-M, Pagès JM. *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. *Front Microbiol* [Internet]. 18 de maio de 2015 [citado 3 de dezembro de 2020];6(MAY):1–10. Available at: www.frontiersin.org
 39. ANVISA. Boletim Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 17: Avaliação dos indicadores nacionais das infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) e resistência microbiana do ano de 2017 [Internet]. 2019 [citado 3 de março de 2021]. Available at: https://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/publicacoes/item/boletim-seguranca-do-paciente-e-qualidade-em-servicos-de-saude?category_id=1899
 40. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. março de 2010;54(3):969–76. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19995920>
 41. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* [Internet]. 1980 [citado 23 de fevereiro de 2021];289(1036):321–31. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6109327/>
 42. Meini S, Tascini C, Cei Marco, Sozio E, Gian , Rossolini M. AmpC β -lactamase-producing *Enterobacteriales*: what a clinician should know. 2019;47:363–75. Available at: <https://doi.org/10.1007/s15010-019-01291-9>
 43. Cabral AB, Maciel MAV, Barros JF, Antunes MM, Barbosa De Castro CMM, Souza Lopes AC. Clonal spread and accumulation of β -lactam resistance determinants in *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae* complex isolates from infection and

- colonization in patients at a public hospital in Recife, Pernambuco, Brazil. *J Med Microbiol*. 1 de janeiro de 2017;66(1):70–7.
44. Dropa M, Balsalobre LC, Lincopan N, Mamizuka EM, Murakami T, Cassettari VC, et al. Extended-spectrum beta-lactamases among Enterobacteriaceae isolated in a public hospital in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* [Internet]. julho de 2009 [citado 7 de novembro de 2020];51(4):203–9. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19739000/>
 45. Pereira RS, Dias VC, Ferreira-Machado AB, Resende JA, Bastos AN, de Andrade Bastos LQ, et al. Physiological and molecular characteristics of carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter aerogenes*. *J Infect Dev Ctries* [Internet]. 1 de junho de 2016 [citado 7 de novembro de 2020];10(6):592–9. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27367007/>
 46. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis*. 2011;17(10):1791–8.
 47. Sampaio JLM, Gales AC. Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae in Brazil: focus on β -lactams and polymyxins. *Brazilian J Microbiol* [Internet]. 2016;47:31–7. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.002>
 48. Monteiro J, Santos AF, Asensi MD, Peirano G, Gales AC. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2009;53(1):333–4. Available at: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
 49. Rosa JF, Rizek C, Marchi AP, Guimaraes T, Miranda L, Carrilho C, et al. Clonality, outer-membrane proteins profile and efflux pump in KPC- producing *Enterobacter* sp. in Brazil. *BMC Microbiol* [Internet]. 17 de dezembro de 2017 [citado 2 de novembro de 2020];17(1):69. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28302074/>
 50. Zavascki AP, Machado ABMP, de Oliveira KRP, Superti S V., Pilger DA, Cantarelli V V., et al. KPC-2-producing *Enterobacter cloacae* in two cities from Southern Brazil. Vol. 34, *International Journal of Antimicrobial Agents*. Elsevier; 2009. p. 286–8.
 51. Tuon FF, Scharf C, Rocha JL, Cieslinsk J, Becker GN, Arend LN. KPC-producing *Enterobacter aerogenes* infection. *Brazilian J Infect Dis* [Internet]. 1 de maio de 2015 [citado 31 de maio de 2020];19(3):324–7. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25722130/>
 52. Carvalho-Assef APD alincour., Pereira PS, Albano RM, Berião GC, Chagas TPG, Timm LN, et al. Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in brazil [Internet]. Vol. 68, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. *J Antimicrob Chemother*; 2013 [citado 23 de fevereiro de 2021]. p. 2956–7. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23869051/>

53. Pereira PS, Borghi M, Albano RM, Lopes JCO, Silveira MC, Marques EA, et al. Coproduction of NDM-1 and KPC-2 in *Enterobacter hormaechei* from Brazil. *Microb Drug Resist* [Internet]. 1 de abril de 2015 [citado 3 de dezembro de 2020];21(2):234–6. Available at: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/mdr.2014.0171>
54. Carvalho-Assef APDA, Pereira PS, Albano RM, Berião GC, Tavares CP, Chagas TPG, et al. Detection of NDM-1-, CTX-M-15-, and qnrB4-producing *Enterobacter hormaechei* isolates in Brazil [Internet]. Vol. 58, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. American Society for Microbiology; 2014 [citado 8 de novembro de 2020]. p. 2475–6. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24449772/>
55. Rozales FP, Ribeiro VB, Magagnin CM, Pagano M, Lutz L, Falci DR, et al. Emergence of NDM-1-producing Enterobacteriaceae in Porto Alegre, Brazil. *Int J Infect Dis* [Internet]. 2014 [citado 7 de novembro de 2020];25:79–81. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24857802/>
56. Mairi A, Pantel A, Sotto A, Lavigne JP, Touati A. OXA-48-like carbapenemases producing Enterobacteriaceae in different niches [Internet]. Vol. 37, *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2018. p. 587–604. Available at: <https://doi.org/10.1007/s10096-017-3112-7>
57. Sampaio JLM, Ribeiro VB, Campos JC, Rozales FP, Magagnin CM, Falci DR, et al. Detection of OXA-370, an OXA-48-related class d β -lactamase, in *Enterobacter hormaechei* from Brazil [Internet]. Vol. 58, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. American Society for Microbiology; 2014 [citado 7 de novembro de 2020]. p. 3566–7. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24709259/>
58. Magagnin CM, Rozales FP, Antochévis L, Nunes LS, Martins AS, Barth AL, et al. Dissemination of bla OXA-370 gene among several Enterobacteriaceae species in Brazil. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2017;36(10):1907–10.
59. Pereira PS, Borghi M, De Araújo CFM, Aires CAM, Oliveira JCR, Asensi MD, et al. Clonal dissemination of OXA-370-producing *Klebsiella pneumoniae* in Rio de Janeiro, Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 1 de agosto de 2015 [citado 3 de março de 2021];59(8):4453–6. Available at: <http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST>
60. Augusto C, Aires M, Rocha-De-Souza CM, Timm N, Pereira S, Paula D' A, et al. Early detection of OXA-370-producing *Klebsiella pneumoniae* ST17 co-harboring bla CTX-M-8 in Brazil. 2016; Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.09.007>
61. Pitout JDD, Nordmann P, Poirel L. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance. *Antimicrob Agents Chemother*.

- 2015;59(10):5873–84.
62. Lee CR, Lee JH, Park KS, Kim YB, Jeong BC, Lee SH. Global dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods. *Front Microbiol*. 2016;7(JUN):1–30.
 63. Hammoudi Halat D, Ayoub Moubareck C. The Current Burden of Carbapenemases: Review of Significant Properties and Dissemination among Gram-Negative Bacteria. *Antibiotics* [Internet]. 16 de abril de 2020;9(4):186. Available at: www.mdpi.com/journal/antibiotics
 64. Micha R, Khatibzadeh S, Shi P, Andrews KG, Engell RE, Mozaffarian D. Global, regional and national consumption of major food groups in 1990 and 2010: a systematic analysis including 266 country-specific nutrition surveys worldwide on behalf of the Global Burden of Diseases Nutrition and Chronic Diseases Expert Group (Nutri. *Open* [Internet]. 2015 [citado 23 de fevereiro de 2021];5:8705. Available at: <http://dx.doi.org/>
 65. Trimble MJ, Mlynářčik P, Kolář M, Hancock REW. Polymyxin: Alternative Mechanisms of Action and Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. 1 de outubro de 2016 [citado 8 de novembro de 2020];6(10):a025288. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27503996/>
 66. Girardello R, Gales AC. Resistência às Polimixinas : velhos antibióticos , últimas opções terapêuticas Polymyxins resistance : old antimicrobials , last therapeutic options. *Rev Epidemiol Control Infect*. 2012;2(2):66–9.
 67. Stefaniuk EM, Tyski S. Colistin resistance in Enterobacterales strains – A current view [Internet]. Vol. 68, *Polish Journal of Microbiology*. Polish Society of Microbiologists; 2019 [citado 8 de novembro de 2020]. p. 417–27. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31880886/>
 68. Dobias J, Poirel L, Nordmann P. Cross-resistance to human cationic antimicrobial peptides and to polymyxins mediated by the plasmid-encoded MCR-1? *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2017;23(9):676.e1-676.e5. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2017.03.015>
 69. Olaitan AO, Morand S, Rolain J. Mechanisms of polymyxin resistance : acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol*. 2014;5(November):1–18.
 70. Bialvaei AZ, Samadi Kafil H. Colistin, mechanisms and prevalence of resistance [Internet]. Vol. 31, *Current Medical Research and Opinion*. Informa Healthcare; 2015 [citado 8 de novembro de 2020]. p. 707–21. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25697677/>
 71. Grégoire N, Aranzana-Climent V, Magréault S, Marchand S, Couet W. Clinical

- Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Colistin. *Clin Pharmacokinet* [Internet]. 26 de dezembro de 2017;56(12):1441–60. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s40262-017-0561-1>
72. Deris ZZ, Akter J, Sivanesan S, Roberts KD, Thompson PE, Nation RL, et al. A secondary mode of action of polymyxins against Gram-negative bacteria involves the inhibition of NADH-quinone oxidoreductase activity. *J Antibiot (Tokyo)* [Internet]. fevereiro de 2014;67(2):147–51. Available at: www.nature.com/ja
 73. Jayol A, Poirel L, Brink A, Villegas MV, Yilmaz M, Nordmann P. Resistance to colistin associated with a single amino acid change in protein PmrB among *Klebsiella pneumoniae* isolates of worldwide origin. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2014 [citado 3 de dezembro de 2020];58(8):4762–6. Available at: <http://bacteria.ensembl.org/index.html>
 74. Guérin F, Isnard C, Sinel C, Morand P, Dhalluin A, Cattoir V, et al. Cluster-dependent colistin hetero-resistance in *Enterobacter cloacae* complex. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2016 [citado 3 de dezembro de 2020];71(11):3058–61. Available at: <https://academic.oup.com/jac/article/71/11/3058/2399389>
 75. Hong Y-KK, Ko KS. PmrAB and PhoPQ Variants in Colistin-Resistant *Enterobacter* spp. Isolates in Korea. *Curr Microbiol* [Internet]. 19 de maio de 2019 [citado 3 de dezembro de 2020];76(5):644–9. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-019-01672-1>
 76. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2016;16(2):161–8. Available at: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7)
 77. Baron S, Bardet L, Dubourg G, Fichaux M, Rolain JM. mcr-1 plasmid-mediated colistin resistance gene detection in an *Enterobacter cloacae* clinical isolate in France. *J Glob Antimicrob Resist* [Internet]. 1 de setembro de 2017 [citado 3 de dezembro de 2020];10:35–6. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jgar.2017.05.004>
 78. AbuOun M, Stubberfield EJ, Duggett NA, Kirchner M, Dormer L, Nunez-Garcia J, et al. mcr-1 and mcr-2 (mcr-6.1) variant genes identified in *Moraxella* species isolated from pigs in Great Britain from 2014 to 2015. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 1 de outubro de 2018 [citado 9 de novembro de 2020];73(10):2904–2904. Available at: <http://www.nationalarchives.gov.uk/doc/>
 79. Borowiak M, Fischer J, Hammerl JA, Hendriksen RS, Szabo I, Malorny B. Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, mcr-5,

- conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B. J Antimicrob Chemother [Internet]. 1 de dezembro de 2017 [citado 3 de dezembro de 2020];72(12):3317–24. Available at: <https://academic.oup.com/jac/article/72/12/3317/4161410>
80. Wang X, Wang YY, Zhou Y, Li J, Yin W, Wang S, et al. Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, mcr-8 , in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae*. Emerg Microbes Infect [Internet]. 1 de dezembro de 2018 [citado 9 de novembro de 2020];7(1):1–9. Available at: www.nature.com/emi
81. Xavier BB, Lammens C, Ruhai R, Kumar-Singh S, Butaye P, Goossens H, et al. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, mcr-2, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. Eurosurveillance [Internet]. 7 de julho de 2016 [citado 9 de novembro de 2020];21(27). Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27416987/>
82. Yang Y-QQ, Li Y-XX, Lei C-WW, Zhang A-YY, Wang H-NN. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene mcr-7.1 in *Klebsiella pneumoniae*. J Antimicrob Chemother [Internet]. 1 de julho de 2018 [citado 9 de novembro de 2020];73(7):1791–5. Available at: <http://issaga.biotoul.fr>
83. Yin W, Li H, Shen Y, Liu Z, Wang S, Shen Z, et al. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene mcr-3 in *Escherichia coli*. MBio [Internet]. 1 de maio de 2017 [citado 9 de novembro de 2020];8(3). Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28655818/>
84. Baron S, Hadjadj L, Rolain JM, Olaitan AO. Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns. Int J Antimicrob Agents [Internet]. 1 de dezembro de 2016 [citado 3 de dezembro de 2020];48(6):583–91. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.06.023>
85. Conceição-Neto OC, Aires CAM, Pereira NF, da Silva LHJ, Picão RC, Siqueira BN, et al. Detection of the plasmid-mediated mcr-1 gene in clinical KPC-2-producing *Escherichia coli* isolates in Brazil [Internet]. Vol. 50, International Journal of Antimicrobial Agents. Elsevier B.V.; 2017 [citado 12 de fevereiro de 2021]. p. 282–4. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.05.003>
86. Aires CAM, Da Conceição-Neto OC, Tavares E Oliveira TR, Dias CF, Montezzi LF, Picão RC, et al. Emergence of the plasmid-mediated mcr-1 gene in clinical KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* sequence type 392 in Brazil. Antimicrob Agents Chemother [Internet]. 1 de julho de 2017 [citado 3 de março de 2021];61(7). Available at: <https://doi.org/10.1016/S1473-3099>
87. Carattoli A, Villa L, Feudi C, Curcio L, Orsini S, Luppi A, et al. Novel plasmid-mediated

- colistin resistance *mcr-4* gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. *Eurosurveillance* [Internet]. 3 de agosto de 2017 [citado 12 de fevereiro de 2021];22(31):30589. Available at: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.31.30589>
88. Carroll LM, Gaballa A, Guldimann C, Sullivan G, Henderson LO, Wiedmann M. Identification of Novel Mobilized Colistin Resistance Gene *mcr-9* in a Multidrug-Resistant, Colistin-Susceptible *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium Isolate. Turner MS, organizador. *MBio* [Internet]. 7 de maio de 2019 [citado 3 de dezembro de 2020];10(3):1–6. Available at: <https://doi.org/10.1128/mBio>
 89. Wang C, Feng Y, Liu L, Wei L, Kang M, Zong Z. Identification of novel mobile colistin resistance gene *mcr-10*. 2020; Available at: <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1732231>
 90. Ling Z, Yin W, Shen Z, Wang Y, Shen J, Walsh TR. Epidemiology of mobile colistin resistance genes *mcr-1* to *mcr-9*. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 1 de novembro de 2020 [citado 3 de dezembro de 2020];75(11):3087–95. Available at: <https://academic.oup.com/jac/article/75/11/3087/5854858>
 91. Chahine EB, Sourial M, Ortiz R. Ceftazidime/avibactam: A new antibiotic for gram-negative infections. *Consult Pharm*. 2015;30(12):695–705.
 92. Criscuolo M, Trecarichi EM. Ceftazidime/avibactam and ceftolozane/tazobactam for multidrug-resistant gram negatives in patients with hematological malignancies: Current experiences [Internet]. Vol. 9, *Antibiotics*. MDPI AG; 2020 [citado 13 de fevereiro de 2021]. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32028615/>
 93. van Duin D, Bonomo RA. Ceftazidime/Avibactam and Ceftolozane/Tazobactam: Second-generation β -Lactam/ β -Lactamase Inhibitor Combinations [Internet]. Vol. 63, *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. Oxford University Press; 2016 [citado 13 de fevereiro de 2021]. p. 234–41. Available at: </pmc/articles/PMC4928383/>
 94. Kazmierczak KM, de Jonge BLM, Stone GG, Sahn DF. In vitro activity of ceftazidime/avibactam against isolates of Enterobacteriaceae collected in European countries: INFORM global surveillance 2012–15. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 1 de outubro de 2018 [citado 27 de janeiro de 2021];73(10):2782–8. Available at: <https://academic.oup.com/jac/article/73/10/2782/5052241>
 95. Lin M, Yang Y, Yang Y, Chen G, He R, Wu Y, et al. Co-occurrence of *mcr-9* and *bla_{NDM-1}* in enterobacter cloacae isolated from a patient with bloodstream infection. *Infect Drug Resist*. 2020;13:1397–402.

96. BrCAST. Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos. Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Versão 2.0. 2020;
97. Jorgensen JH, Pfaller MA. Introduction to the 11th Edition of the Manual of Clinical Microbiology. In: Manual of Clinical Microbiology [Internet]. Washington, DC, USA: ASM Press; 2015 [citado 9 de novembro de 2020]. p. 1–4. Available at: <https://www.asmscience.org/content/book/10.1128/9781555817381.mcm11.ch01>
98. Pires J, Novais A, Peixe L. Blue-Carba, an easy biochemical test for detection of diverse Carbapenemase producers directly from bacterial cultures. J Clin Microbiol [Internet]. dezembro de 2013 [citado 9 de novembro de 2020];51(12):4281–3. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24108615/>
99. Monteiro J, Widen RH, Pignatari ACC, Kubasek C, Silbert S. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. J Antimicrob Chemother [Internet]. abril de 2012 [citado 9 de novembro de 2020];67(4):906–9. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22232516/>
100. Rebelo AR, Bortolaia V, Kjeldgaard JS, Pedersen SK, Leekitcharoenphon P, Hansen IM, et al. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, mcr-1, mcr-2, mcr-3, mcr-4 and mcr-5 for surveillance purposes. Eurosurveillance [Internet]. 8 de fevereiro de 2018 [citado 14 de março de 2021];23(6):17–00672. Available at: <https://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.6.17-00672>
101. Borowiak M, Baumann B, Fischer J, Thomas K, Deneke C, Hammerl JA, et al. Development of a Novel mcr-6 to mcr-9 Multiplex PCR and Assessment of mcr-1 to mcr-9 Occurrence in Colistin-Resistant Salmonella enterica Isolates From Environment, Feed, Animals and Food (2011–2018) in Germany. Front Microbiol [Internet]. 2020;11:80. Available at: www.frontiersin.org
102. Ribot EM, Fair MA, Gautom R, Cameron DN, Hunter SB, Swaminathan B, et al. Standardization of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocols for the Subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, Salmonella, and Shigella for PulseNet. Foodborne Pathog Dis [Internet]. 7 de março de 2006 [citado 3 de dezembro de 2020];3(1):59–67. Available at: <http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/fpd.2006.3.59>
103. Miyoshi-Akiyama T, Hayakawa K, Ohmagari N, Shimojima M, Kirikae T. Multilocus Sequence Typing (MLST) for Characterization of *Enterobacter cloacae*. Woo PCY, organizador. PLoS One [Internet]. 11 de junho de 2013 [citado 3 de dezembro de 2020];8(6):e66358. Available at: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0066358>
104. Gales AC, Jones RN, Sader HS. Global assessment of the antimicrobial activity of

- polymyxin B against 54 731 clinical isolates of Gram-negative bacilli: Report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme (2001-2004). *Clin Microbiol Infect.* 2006;12(4):315–21.
105. Gales AC, Castanheira M, Jones RN, Sader HS. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. agosto de 2012 [citado 7 de novembro de 2020];73(4):354–60. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>
 106. Sader HS, Farrell DJ, Flamm RK, Jones RN. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative organisms isolated from patients hospitalised with pneumonia in US and European hospitals: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2009-2012. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 1 de abril de 2014 [citado 3 de dezembro de 2020];43(4):328–34. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24630306>
 107. Hong Y-K, Lee J-Y, Ko KS. Colistin resistance in *Enterobacter* spp. isolates in Korea. *J Microbiol* [Internet]. 1 de junho de 2018 [citado 3 de dezembro de 2020];56(6):435–40. Available at: <https://pubmlst.org/ecloacae/>
 108. Chew KL, La M Van, Lin RTP, Teo JWP. Colistin and polymyxin B susceptibility testing for carbapenem-resistant and mcr-positive Enterobacteriaceae: Comparison of Sensititre, MicroScan, Vitek 2, and Etest with broth microdilution. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2017;55(9):2609–16. Available at: <https://doi.org/10.1128/JCM.00268-17>.
 109. Mammeri H, Nordmann P, Berkani A, Eb F. Contribution of extended-spectrum AmpC (ESAC) β -lactamases to carbapenem resistance in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* [Internet]. 2008;282(2):238–40. Available at: <https://academic.oup.com/femsle/article/282/2/238/455717>
 110. Chavda KD, Chen L, Fouts DE, Sutton G, Brinkac L, Jenkins SG, et al. Comprehensive genome analysis of carbapenemase-producing *Enterobacter* spp.: New insights into phylogeny, population structure, and resistance mechanisms. *MBio* [Internet]. 1 de janeiro de 2016 [citado 3 de dezembro de 2020];7(6). Available at: <http://mbio.asm.org/>
 111. Tavares CP, Pereira PS, Marques E de A, Faria C, de Souza M da PAH, de Almeida R, et al. Molecular epidemiology of KPC-2-producing Enterobacteriaceae (non-*Klebsiella pneumoniae*) isolated from Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. 1 de agosto de 2015 [citado 8 de novembro de 2020];82(4):326–30. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25935630/>
 112. Li D, Liao W, Huang H-H, Du F-L, Wei D-D, Mei Y-F, et al. Emergence of Hypervirulent Ceftazidime/ Avibactam-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates in a

- Chinese Tertiary Hospital. 2020; Available at: <http://doi.org/10.2147/IDR.S257477>
113. Kremer A, Hoffmann H. Prevalences of the *Enterobacter cloacae* complex and its phylogenetic derivatives in the nosocomial environment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* [Internet]. 1 de novembro de 2012 [citado 3 de dezembro de 2020];31(11):2951–5. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22648160/>
 114. Octavia S, Hsien Koh T, Tek Ng O, Marimuthu K, Venkatachalam I, P Lin RT, et al. Genomic Study of bla IMI-Positive *Enterobacter cloacae* Complex in Singapore over a Five-Year Study Period Downloaded from. 2020; Available at: <http://aac.asm.org/>
 115. Wagner L, Bloos F, Vylkova S. Bloodstream infection due to *Enterobacter ludwigii*, correlating with massive aggregation on the surface of a central venous catheter. *Infection* [Internet]. 1 de dezembro de 2020 [citado 21 de fevereiro de 2021];48(6):955–8. Available at: </pmc/articles/PMC7674343/>
 116. Shafeeq S, Wang X, Lünsdorf H, Brauner A, Römling U. Draft Genome Sequence of the Urinary Catheter Isolate *Enterobacter ludwigii* CEB04 with High Biofilm Forming Capacity. *Microorganisms* [Internet]. 5 de abril de 2020;8(4):522. Available at: www.mdpi.com/journal/microorganisms
 117. García-González T, Karina Sáenz-Hidalgo H, Silva-Rojas HV, Morales-Nieto C, Vancheva T, Koebnik R, et al. The Plant Pathology Journal *Enterobacter cloacae*, an Emerging Plant-Pathogenic Bacterium Affecting Chili Pepper Seedlings. *Plant Pathol J* [Internet]. 2018;34(1):1–10. Available at: <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.06.2017.0128>
 118. Moffatt JH, Harper M, Boyce JD. Mechanisms of Polymyxin Resistance. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology* [Internet]. Springer New York LLC; 2019 [citado 8 de novembro de 2020]. p. 55–71. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31364071/>
 119. Moreno LZ, Gomes VTM, Moreira J, de Oliveira CH, Peres BP, Silva APS, et al. First report of mcr-1-harboring *Salmonella enterica* serovar Schwarzengrund isolated from poultry meat in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* [Internet]. abril de 2019;93(4):376–9. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2018.10.016>
 120. Zeng K-J, Doi Y, Patil S, Huang X, Tian G-B. Emergence of the Plasmid-Mediated mcr-1 Gene in Colistin-Resistant *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*: TABLE 1. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 1 de junho de 2016 [citado 3 de dezembro de 2020];60(6):3862–3. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099>
 121. Li Y, Dai X, Zeng J, Gao Y, Zhang Z, Zhang L. Characterization of the global distribution and diversified plasmid reservoirs of the colistin resistance gene mcr-9. *Sci Rep* [Internet]. 2020;10(1):1–10. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020->

122. Yuan Y, Li Y, Wang G, Li C, Xiang L, She J, et al. Coproduction of MCR-9 and NDM-1 by colistin-resistant *Enterobacter hormaechei* isolated from bloodstream infection. *Infect Drug Resist*. 2019;12:2979–85.
123. Chavda KD, Westblade LF, Satlin MJ, Hemmert AC, Castanheira M, Jenkins SG, et al. First Report of bla VIM-4 - and mcr-9 -Coharboring *Enterobacter* Species Isolated from a Pediatric Patient. Bradford PA, organizador. *mSphere* [Internet]. 11 de setembro de 2019;4(5):1–6. Available at: <https://msphere.asm.org/content/4/5/e00629-19>
124. Kananizadeh P, Oshiro S, Watanabe S, Iwata S, Kuwahara-Arai K, Shimojima M, et al. Emergence of carbapenem-resistant and colistin-susceptible *Enterobacter cloacae* complex co-harboring blaIMP-1 and mcr-9 in Japan. *BMC Infect Dis* [Internet]. 16 de dezembro de 2020 [citado 8 de novembro de 2020];20(1):282. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32299378/>
125. Sadek M, Nariya H, Shimamoto T, Kayama S, Yu L, Hisatsune J, et al. First genomic characterization of blavim-1 and mcr-9-coharbouring *Enterobacter hormaechei* isolated from food of animal origin. *Pathogens* [Internet]. 2020 [citado 8 de novembro de 2020];9(9):1–7. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32842587/>
126. Fukuda A, Sato T, Shinagawa M, Takahashi S, Asai T, Yokota S-I, et al. High prevalence of mcr-1, mcr-3 and mcr-5 in *Escherichia coli* derived from diseased pigs in Japan. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 1 de janeiro de 2018 [citado 3 de dezembro de 2020];51(1):163–4. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29180277>
127. Soliman AM, Maruyama F, Zarad HO, Ota A, Nariya H, Shimamoto T, et al. Emergence of a multidrug-resistant *Enterobacter hormaechei* clinical isolate from egypt co-harboring mcr-9 and blavim-4. *Microorganisms*. 2020;8(4):1–9.
128. Norgan AP, Freese JM, Tuin PM, Cunningham SA, Jeraldo PR, Patel R. Carbapenem- and colistin-resistant *Enterobacter cloacae* from Delta, Colorado, in 2015. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 1 de maio de 2016 [citado 3 de dezembro de 2020];60(5):3141–4. Available at: <https://aac.asm.org/content/60/5/3141>
129. Sekyere JO, Maningi NE, Modipane L, Mbelle NM. Emergence of mcr-9.1 in Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing Clinical Enterobacteriaceae in Pretoria, South Africa: Global Evolutionary Phylogenomics, Resistome, and Mobilome. 2020 [citado 27 de janeiro de 2021]; Available at: <http://msystems.asm.org/>
130. Mhaya A, Bégu D, Tounsi S, Arpin C. MgrB Inactivation Is Responsible for Acquired Resistance to Colistin in *Enterobacter hormaechei* subsp. *Steigerwaltii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1 de junho de 2020;64(6).

131. Wozniak JE, Chande AT, Burd EM, Band VI, Satola SW, Farley MM, et al. Absence of mgrB Alleviates Negative Growth Effects of Colistin Resistance in *Enterobacter cloacae*. *Antibiotics* [Internet]. 19 de novembro de 2020;9(11):825. Available at: www.mdpi.com/journal/antibiotics
132. Telke AA, Olaitan AO, Morand S, Rolain JM. SoxRS induces colistin hetero-resistance in *Enterobacter asburiae* and *Enterobacter cloacae* by regulating the acrAB-tolC efflux pump. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2017;72(10):2715–21. Available at: <https://academic.oup.com/jac/article/72/10/2715/4035777>
133. Cheng Y-H, Lin T-L, Pan Y-J, Wang Y-P, Lin Y-T, Wang J-T. Colistin Resistance Mechanisms in *Klebsiella pneumoniae* Strains from Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. maio de 2015 [citado 27 de janeiro de 2021];59(5):2909–13. Available at: <http://www.pasteur.fr/mlst/Kpneumoniae.html>
134. Pereira PS, De araujo CFM, Seki LM, Zahner V, Carvalho-Assef APDA, Asensi MD. Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: Spread of clonal complex 11 (ST11, ST437 and ST340). *J Antimicrob Chemother* [Internet]. fevereiro de 2013 [citado 7 de fevereiro de 2021];68(2):312–6. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23070735/>
135. Bartolleti F, Seco BMS, Capuzzo dos Santos C, Felipe CB, Lemo MEB, Alves TDS, et al. Polymyxin B Resistance in Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* , São Paulo, Brazil. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 1 de outubro de 2016 [citado 3 de dezembro de 2020];22(10):1849–51. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099>
136. Cai Y, Chen C, Zhao M, Yu X, Lan K, Liao K, et al. High prevalence of metallo- β -lactamase-producing *Enterobacter cloacae* from three tertiary hospitals in china. *Front Microbiol*. 2019;10(AUG):1–15.
137. Izdebski R, Baraniak A, Herda M, Fiett J, Bonten MJM, Carmeli Y, et al. MLST reveals potentially high-risk international clones of *Enterobacter cloacae*. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 1 de janeiro de 2015 [citado 1 de novembro de 2020];70(1):48–56. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25216820/>
138. Peirano G, Matsumura Y, Adams MD, Bradford P, Motyl M, Chen L, et al. Genomic epidemiology of global carbapenemase-producing *Enterobacter* spp., 2008–2014. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 1 de junho de 2018 [citado 7 de novembro de 2020];24(6):1010–9. Available at: <https://doi.org/10.3201/eid2406.171648>