

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISA AGGEU MAGALHÃES
MESTRADO ACADÊMICO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

WILLAMES MARCOS BRASILEIRO DA SILVA MARTINS

ESTUDO DE MECANISMOS DE RESISTÊNCIA E VIRULÊNCIA EM ISOLADOS
DE *Klebsiella pneumoniae* PRODUTORES DE CARBAPENEMASE

RECIFE

2014

WILLAMES MARCOS BRASILEIRO DA SILVA MARTINS

**ESTUDO DE MECANISMOS DE RESISTÊNCIA E VIRULÊNCIA EM ISOLADOS
DE *Klebsiella pneumoniae* PRODUTORES DE CARBAPENEMASE**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em saúde do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/FIOCRUZ-PE) como requisito básico para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biologia celular e Molecular

Orientador: Prof. Dr. Fábio André Brayner dos Santos.

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Márcia Maria Camargo de Moraes.

RECIFE

2014

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

- M386e Martins, Willames Marcos Brasileiro da Silva.
 Estudo dos mecanismos de resistência e virulência em isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de carbapenemase / Willames Marcos Brasileiro da Silva Martins. - Recife: [s.n.], 2014.
 168 p. : ilus.
 Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.
 Orientador: Fábio André Brayner dos Santos.
 Co-orientadora: Márcia Maria Camargo de Morais.
1. beta-Lactamases. 2. Antibacterianos. 3. Plasmídeos. 4. Virulência. 5. *Klebsiella pneumoniae*. I. Santos, Fábio André Brayner dos. II. Morais, Márcia Maria Camargo de. III. Título.

CDU 616.92

WILLAMES MARCOS BRASILEIRO DA SILVA MARTINS

**ESTUDO DE MECANISMOS DE RESISTÊNCIA E VIRULÊNCIA EM ISOLADOS
DE *Klebsiella pneumoniae* PRODUTORES DE CARBAPENEMASE**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em saúde do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/FIOCRUZ-PE) como requisito básico para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biologia celular e Molecular

Data de Aprovação: ____/____/____

Banca examinadora:

Prof Dr. Fábio André Brayner dos Santos
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ-PE

Prof^a Dr^a. Constância Flávia Junqueira Ayres
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ-PE

Prof Dr. Rodrigo Cayô da Silva
Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP

Dedico este trabalho aos meus pais e irmãos pelo constante e incondicional apoio, não importando o quão árdua fosse à caminhada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que me concedeu a oportunidade de finalizar mais essa importante etapa da longa caminhada acadêmica que optei seguir.

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães por ter fornecido sua estrutura física e os diversos funcionários que foram essenciais para a realização deste trabalho.

À Universidade de Pernambuco, em especial ao Instituto de Ciências Biológicas (ICB) e ao serviço de bacteriologia do Hospital Universitário Oswaldo Cruz, pelo auxílio nos experimentos fenotípicos.

Ao Laboratório de Engenharia Metabólica da UFPE coordenado pelo professor Dr. Marcos Morais pelo apoio nos mais diversos experimentos realizados.

Aos professores Rodrigo Cayô, Costância Ayres, Luiz Carlos Alves e Ana Catarina que gentilmente aceitaram compor minha banca avaliadora e que com carinho se propuseram a avaliar este trabalho.

Aos meus orientadores Fábio André Brayner dos Santos e Márcia Maria Camargo de Moraes, pela confiança, pelo convívio e pela gratificante orientação ao longo da caminhada. Obrigado por tudo, e saibam que foi uma honra poder compartilhar do conhecimento de ambos.

Ao Prof. Dr. Luís Carlos Alves, pela acolhida junto a seu grupo de pesquisa na FIOCRUZ-PE, pelo constante incentivo e cobrança que me fizeram ser um pós-graduando apto a enfrentar novos desafios e alcançar voos maiores.

A pesquisadora Prof^a Dr^a Ana Cristina Gales, assim como a todos os integrantes do Laboratório LEMC/ALERTA – UNIFESP pela colaboração e orientação durante a realização do estágio na instituição. Em especial, agradeço a Dr^a Raquel Girardello, Msc. Lorena Felhberg e Msc. Adriana Nicolleti pela orientação no período em que estive no laboratório ALERTA, assim como o carinho com qual me auxiliaram na escrita desta dissertação.

Aos amigos do Laboratório de Resistência Microbiana (LRM-UPE) pela colaboração, companheirismo ao longo da caminhada. Em especial, agradeço a Prof^a Dr^a Anna Carolina Almeida, pelo acompanhamento e incentivo desde o período de minha iniciação científica.

A todos os amigos do Laboratório de Biologia Celular e Molecular (LBCM-CPqAM), em especial, Amanda Aliança, Catarina Fernandes, Everton Moraes, Fernanda, Alberon, Grasielle Vaz, Elverson Melo e Nairomberg pelos momentos de estudo, discussões científicas, descontração, comilanças e companheirismo. Esses dois últimos anos foram mais que suficiente para me sentir parte desta grande família.

Aos amigos da primeira turma de pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde do CPqAM, em especial a Adriana Patrícia e Gabriel Gazzoni pelos momentos únicos vividos e as diversas horas de estudos compartilhadas.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa que possibilitou dedicação exclusiva para a realização deste trabalho.

Ninguém é tão grande que não possa aprender,
nem tão pequeno que não possa ensinar.

Esopo

MARTINS, Willames Marcos Brasileiro da Silva. **Estudo dos mecanismos de resistência e virulência em isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de carbapenemase**. 2014. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociência e Biotecnologia em Saúde) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2014.

RESUMO

Este estudo visou à caracterização molecular de mecanismos de virulência e resistência aos antimicrobianos em isolados de *K. pneumoniae* MDR provenientes de um hospital universitário em Recife-PE. Seis isolados de *K. pneumoniae* produtores de carbapenemase foram obtidos de pacientes hospitalizados na UTI de um hospital universitário do Recife. Os isolados apresentaram resistência a todos os antimicrobianos β -lactâmicos e quinolonas testados, mas sensibilidade a amicacina, polimixina B e tigeciclina, por meio de microdiluição em caldo. A tipagem molecular por PFGE revelou que os isolados são intimamente relacionados, apresentando três subclones distintos. Dois STs foram detectados, o ST340 e o ST11, ambos pertencentes ao CC258. Os genes bla_{KPC-2} e bla_{SHV-11} foram detectados em todos os isolados, seguido do gene $bla_{CTX-M-15}$ em quatro dos seis isolados e por fim os genes $bla_{CTX-M-2}$, $qnrB19$, $aac(6')-31$ em dois dos seis isolados. Os genes bla_{KPC-2} e $bla_{CTX-M-15}$ estavam presentes em um mesmo plasmídeo de aproximadamente 133 Kb pertencente ao IncI- γ em quatro isolados. Nos demais isolados os genes bla_{KPC-2} e $bla_{CTX-M-2}$ eram carregados também por um plasmídeo de, aproximadamente, 133 Kb, entretanto, não foi possível tipar o mesmo com as metodologia utilizada. O gene $qnrB19$ foi detectado sendo carregado por um plasmídeo de 15 Kb pertencente ao IncY. Todos os isolados apresentaram integron de classe 1, associado com a resistência aos aminoglicosídeos. Mutações na região QRDR de GyrA (Ser83Ile) e ParC (Ser80Ile) foram detectadas em todos os isolados analisados, sendo esse o principal mecanismo de resistência as quinolonas detectadas ao longo do estudo. Adicionalmente, a permeabilidade de membrana externa foi analisada, verificando-se a ausência da OmpK35 em todos os isolados e da OmpK36 em uma das amostras analisadas. A investigação dos genes de virulência revelou a presença de antígenos capsulares do tipo K2 entre os isolados. Genes codificadores das fímbrias do tipo I e III foram detectados, assim como genes envolvidos na síntese de LPS e operon da urease. A presença de micro-organismos multirresistentes e virulentos em unidades hospitalares reforça a necessidade de medidas para a rápida contenção de possíveis infecções hospitalares causadas por esses patógenos.

Palavras Chave: beta-lactamase; Antibacterianos; Plasmídeos; Virulência; *Klebsiella pneumoniae*.

MARTINS, Willames Marcos Brasileiro da Silva. **Study of resistance and virulence mechanisms of carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae***, 2014. Dissertation (Academic Master in Bioscience and Biotechnology in Health) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2014.

ABSTRACT

This study aimed to characterize the molecular mechanisms of virulence and antimicrobial resistance in MDR *K. pneumoniae* isolates from a Teaching Hospital in Recife-PE. Six isolates of carbapenemase-producing *K. pneumoniae* were obtained from patients hospitalized in the ICU of a Teaching Hospital in Recife (Pernambuco, Brazil). Susceptibility testing was performed by CLSI broth microdilution. The isolates were resistant to all β -lactams and quinolones tested. In contrast, susceptibility to amikacin, polymyxin B and tigecycline was detected. Molecular typing by PFGE revealed that the isolates were closely related, but did not belong to the same clone. Two different STs were detected in the isolates, ST340 and ST11, both belonging to CC258. The *bla*_{KPC-2} and *bla*_{SHV-11} genes were detected in all isolates, followed by *bla*_{CTX-M-15} gene in four out of six isolates and, finally, *bla*_{CTX-M-2}, *qnrB19*, *aac(6')-31* in two of six isolates. The *bla*_{KPC-2} and *bla*_{CTX-M-15} genes were present in the same 133 Kb plasmid belonging to IncI- γ in four isolates. In the remaining isolates *bla*_{KPC-2} and *bla*_{CTX-M-2} genes were also contained in plasmid of nearly 133 Kb. However, it was not possible to typecast this plasmid with the used methodology. The *qnrB19* gene was detected being carried by 15 Kb plasmid belonging to IncY. All isolates presented class 1 integron, harboring aminoglycosides resistance genes. Mutations in the QRDR region of GyrA (Ser83Ile) and ParC (Ser80Ile) were detected in all isolates analyzed, this being the main mechanism of resistance to quinolones detected in this study. Additionally, membrane permeability was analyzed by SDS-PAGE, verifying the absence of OmpK35 in all isolates. The OmpK36 was absent in only one isolate. The investigation of virulence revealed the presence of capsular antigens of type K1 between isolates. Genes encoding the fimbrial type I and III were detected, as well as genes involved in the synthesis of lipopolysaccharides and urease operon. The presence of multidrug resistant and virulent micro-organisms in hospitals, reinforces the need for measures for rapid containment of possible nosocomial infections caused by these pathogens.

Key words: beta-lactamase; Anti-Bacterial Agents; Plasmids; Virulence; *Klebsiella pneumoniae*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - <i>K. pneumoniae</i> cultivada em meio de cultura sólido.....	24
Figura 2 - Estrutura química dos diferentes β -lactâmicos.....	26
Figura 3 - Principais mecanismos de Resistência em Bactérias Gram negativas.....	31
Quadro 1 - Classificação das β -lactamases segundo Ambler e Jacoby; Bush.....	33
Figura 4 - Representação esquemática das membranas bacterianas e seus principais componentes.....	39
Figura 5 - Estrutura química das quinolonas.....	41
Figura 6 - Representação esquemática de um integron de classe 1.....	55
Figura 7 - Fímbrias visualizadas por microscopia eletrônica de varredura em isolados de <i>K. pneumoniae</i>	61
Quadro 2 - Sequência dos <i>Primers</i> utilizados para a amplificação dos genes de resistência aos β -lactâmicos	74
Quadro 3 - <i>Primers</i> utilizados para amplificação dos determinantes de resistência plasmidiais às quinolonas.....	75
Quadro 4 - <i>Primers</i> utilizados para investigação dos genes codificadores das metiltransferases.....	77
Quadro 5 - <i>Primers</i> utilizados para a detecção e mapeamento do integron de classe 1 e do transposon <i>Tn4401</i>	78
Quadro 6 - <i>Primers</i> utilizados na investigação dos genes de virulência.....	79
Quadro 7 - Grupos de incompatibilidade, sequências dos <i>primers</i> , temperaturas de anelamento e seus respectivos tamanhos de amplicon utilizados para a tipagem plasmidial das amostras estudadas	84
Quadro 8 - <i>Primers</i> utilizados para amplificação e sequenciamento dos genes das principais porinas em <i>K. pneumoniae</i>	87
Figura 8 - Gel de PFGE dos Isolados de <i>K. pneumoniae</i> produtores de carbapenemase.....	92
Figura 9 - Relação Filogenética entre os STs de <i>K. pneumoniae</i> que compõe o CC258.....	93

Figura 10 - Perfil plasmidial dos isolados de <i>K. pneumoniae</i> produtores de KPC.....	94
Figura 11 - Perfil plasmidial na presença dos marcadores de peso plasmidial.....	95
Figura 12 - Foto do gel de agarose referente à investigação da presença do gene <i>bla</i> _{KPC}	96
Figura 13 - Foto do gel de agarose da PCR multiplex para identificação dos genes ES β L.....	97
Figura 14 - Foto do gel de agarose da PCR para identificação do gene <i>qnr</i>	98
Figura 15 - Alinhamento das sequências de nucleotídeos e aminoácidos da região QRDR do gene <i>gyrA</i> nos isolados de <i>K. pneumoniae</i>	99
Figura 16 - Alinhamento das sequências de nucleotídeos e aminoácidos da região QRDR do gene <i>parC</i> nos isolados de <i>K. pneumoniae</i>	100
Figura 17 - Mapa com a caracterização dos integrons de classe 1 carregados pelos isolados bacterianos.....	102
Figura 18 - Mapeamento da região downstream do integron de classe 1 associado com o gene de β -lactamase <i>bla</i> _{CTX-M-2}	102
Figura 19 - Contexto genético associado ao gene <i>bla</i> _{KPC}	103
Figura 20 - Esquema dos resultados obtidos durante os experimentos de conjugação/transformação bacteriana.....	104
Figura 21 - SDS-PAGE dos isolados de <i>K. pneumoniae</i> produtores de carbapenemase.....	106
Quadro 9 - Análise das porinas nos isolados de <i>K. pneumoniae</i>	107
Figura 22 - Sequenciamento do gene da <i>ompk35</i> nos isolados KPN529, KPN530, KPN535 e KPN537.....	108
Figura 23 - Esquema do gene codificador da <i>ompk36</i> observados no isolado KPN529	109
Figura 24 - Gel de eletroforese da investigação do genes codificadores das Ompk35, Ompk36 e Ompk37.....	109

Quadro 10 - Presença/Ausência dos principais determinantes de virulência investigados.....	110
---	-----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Perfil de Sensibilidade dos isolados de <i>K. pneumoniae</i> produtores de carbapenemase e seus respectivos transformantes/transconjugantes.....	90
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAC	Acetiltransferase
AmpCs	Cefalosporinases cromossomais
ATCC	<i>American type culture collection</i>
BHI	Brain Heart Infusion
Ca	Cálcio
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>
CS	Sequência conservada
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetracético
ES β L	β -lactamase de espectro ampliado
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
Inc	Incompatibilidade
IS	<i>Insertion sequence</i>
Kb	quilobases
KDa	quilodalton
KPN	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
LB	Luria Bertani
M	Molar
mA	MiliAmper
mM	mili-Molar
MALDI-TOF MS	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time Flight Mass Spectrometry.</i>
M β L	Metalo- β -lactamase
MDR	Multidroga-resistência
Mg	Magnésio
μ g	micrograma
μ L	microlitro
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
N	Normal
OMP	<i>Outer membrane protein</i>

pb	Pares de base
pH	potencial hidrogeniônico
PBPs	<i>Penicillin-binding proteins</i>
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
PFGE	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>
QRDR	<i>Quinolone Resistance-Determining Regions</i>
qRT-PCR	Quantitative Reverse Transcriptase PCR
rpm	Rotação por minuto
RNA	Ácido ribonucleico
RND	<i>Resistance-Nodulation Division</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
STs	<i>Sequence Typing</i>
TC	Transconjugantes
TF	Transformantes
TSB	<i>Trypticase Soy Broth</i>
tRNA	RNA transportador
UTI	Unidade de terapia intensiva
V	Volts
XDR	<i>Extreme Drug Resistance</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	24
2.2 Antimicrobianos	25
2.2.1 Antimicrobianos β -lactâmicos.....	26
2.2.1.1 <i>Penicilinas</i>	27
2.2.1.2 Cefalosporinas	27
2.2.1.3 <i>Monobactâmicos</i>	28
2.2.1.4 <i>Carbapenêmicos</i>	28
2.2.2 Resistência Bacteriana aos Antimicrobianos.....	30
2.2.2.1 <i>Resistência Bacteriana aos Antimicrobianos β-lactâmicos</i>	31
2.2.2.2 <i>Produção de β - lactamases</i>	32
2.2.2.3 <i>β-lactamases de espectro ampliado (ESβL)</i>	33
2.2.2.4 <i>Resistência Bacteriana aos Carbapenêmicos</i>	35
2.2.2.5 <i>Carbapenemases</i>	35
2.2.2.6 <i>Diminuição da Permeabilidade Celular</i>	39
2.3 Quinolonas	40
2.3.1 Resistência às quinolonas.....	43
2.3.1.1 <i>Mutações na DNA girase</i>	43
2.3.1.2 <i>Mutações na Topoisomerase IV</i>	43
2.3.1.3 <i>Determinantes Plasmidiais de Resistência as Quinolonas</i>	44
2.4 Aminoglicosídeos	45
2.4.1 Resistência aos Aminoglicosídeos	47
2.4.1.1 <i>Acetiltransferases</i>	48
2.4.1.2 <i>Nucleotidiltransferases</i>	49

2.4.1.3 Fosfotransferases.....	49
2.4.1.4 16S rRNA metiltransferase.....	49
2.5 Opções Terapêuticas atuais para o tratamento de micro-organismos MDR .	50
2.5.1 Polimixinas	51
2.5.2 Tigeciclina	53
2.6 Elementos genéticos e sua associação com a resistência bacteriana	54
2.6.1 Integrons	54
2.6.2 Plasmídeos.....	56
2.6.3 Transposons.....	57
2.7 Virulência Bacteriana	59
2.7.1 Fatores de virulência em <i>K. pneumoniae</i>	59
2.7.1.1 Cápsula Polissacarídica	59
2.7.1.2 Mucoviscosidade.....	60
2.7.1.3 Fímbrias	61
2.7.1.4 Sistema de Captação de Ferro.....	62
3 JUSTIFICATIVA	64
4 OBJETIVOS	66
4.1 Objetivo Geral	67
4.2 Objetivos Específicos	67
5 METODOLOGIA	68
5.1 Considerações Éticas	69
5.2 Linhagens Bacterianas	69
5.3 Perfil de Sensibilidade aos Antimicrobianos	69
5.4 Tipagem Molecular e Relação Filogenética	70
5.4.1 Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE)	70
5.4.2 Multilocus Sequence Typing (MLST).....	71
5.5 Extração do DNA Bacteriano.....	72

5.6 Identificação Molecular de Genes de Resistência e Virulência	72
5.6.1 Condições de PCR	72
5.6.1.1 <i>Detecção dos genes de β-lactamase</i>	73
5.6.1.2 <i>Detecção dos Genes de Resistência às Quinolonas</i>	75
5.6.1.3 <i>Amplificação da região QRDR dos genes gyrA e parC</i>	76
5.6.1.4 <i>Investigação das metilases</i>	76
5.6.1.5 <i>Caracterização dos Elementos Genéticos</i>	77
5.6.1.6 <i>Amplificação dos Genes de Virulência</i>	78
5.7 Purificação e Sequenciamento dos Produtos de PCR	79
5.8 Extração do DNA Plasmidial	80
5.9 Transferência de Genes Plasmidiais de Resistência	80
5.9.1 Conjugação Bacteriana	81
5.9.2 Transformação Bacteriana	81
5.10 Localização dos Genes de Resistência	81
5.10.1 Southern Blot.....	81
5.10.2 PCR dos Transconjugantes/Transformantes.....	82
5.11 Análise do Grupo de Incompatibilidade Plasmidial	82
5.12 Análise da Permeabilidade de Membrana Externa	86
5.12.1 Extração das Proteínas de Membrana Externa.....	86
5.12.2 Análise dos Genes Codificadores das Principais Porinas em <i>K. pneumoniae</i>	87
6 RESULTADOS	88
6.1 Características Fenotípicas e de Isolamento das <i>K. pneumoniae</i>	89
6.2 Avaliação da Sensibilidade aos Antimicrobianos	89
6.3 Relação Clonal entre os Isolados	92
6.4 Multilocus Sequence Typing	92
6.5 Determinação do Perfil Plasmidial	93

6.6 Caracterização dos Mecanismos de Resistência Plasmidiais aos β-lactâmicos	95
6.6.1 Detecção do Gene <i>bla</i> _{KPC-like}	95
6.6.2 Detecção dos Genes de ES β L	96
6.7 Caracterização dos Mecanismos de Resistência às Quinolonas	97
6.7.1 Detecção do Gene <i>qnr</i>	97
6.7.2 Análise das regiões QRDR dos genes <i>gyrA</i> e <i>parC</i>	98
6.7.3 Investigação de Outros Determinantes de Resistência às Quinolonas	100
6.8 Caracterização de Mecanismos de Resistência aos Aminoglicosídeos	101
6.9 Caracterização do Contexto Genético Relacionado com os genes de Resistência	101
6.9.1 Mapeamento dos Integrons de Classe 1	101
6.9.2 Contexto genético do gene <i>bla</i> _{KPC}	103
6.10 Transferência dos principais determinantes de resistência	103
6.10.1 Perfil de Sensibilidade dos Transconjugantes/Transformantes	105
6.10.2 Determinação do Grupo de Incompatibilidade Plasmidial	105
6.11 Análise de Proteínas de Membrana Externa	105
6.11.1 SDS-PAGE	105
6.11.2 Análise Molecular dos Genes Codificadores das Porinas	107
6.12 Investigação Molecular dos genes de Virulência	110
7 DISCUSSÃO	111
8 CONCLUSÕES	111
REFERÊNCIAS	111
ANEXOS	111

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Com a introdução dos antibióticos na terapia clínica, rapidamente os primeiros casos de resistência bacteriana foram relatados. No decorrer dos anos, novos antimicrobianos começaram a ser sintetizados pela indústria farmacêutica e direcionados à terapia clínica. Em contrapartida, os micro-organismos acompanharam o surgimento de cada novo antimicrobiano, potencializando os mecanismos de resistência, tornando-se cada vez mais capazes de sobreviverem perante esses compostos. Para dificultar uma situação que demonstrava-se crítica (devido à evolução das enzimas que degradam antimicrobianos até então descritas – as β -lactamases), estudos demonstraram a importância da disseminação de genes de resistência entre diferentes espécies bacterianas, por meio de plasmídeos, processo denominado de conjugação bacteriana, o que dificultou ainda mais o controle das infecções hospitalares. A disseminação de genes de resistência por plasmídeos conjugativos dentro de uma unidade hospitalar, juntamente com a utilização indevida de antimicrobianos na terapia clínica empírica, foram e continuam sendo os principais fatores que propiciam surtos hospitalares causados por micro-organismos multirresistentes. Estima-se que em hospitais brasileiros, essas infecções causem a maior parte das mortes em pacientes com doenças crônicas.

Entretanto não são apenas os mecanismos de resistência plasmidiais, os principais responsáveis pelos altos níveis de resistência apresentados pelos isolados bacterianos. Mecanismos como alteração na permeabilidade da membrana externa bacteriana devido à perda de porinas, a hiperexpressão de sistemas de efluxo específicas à extrusão dos principais antimicrobianos utilizados na terapia clínica e mutações em genes cromossomais também apresentam papel crucial para o aumento dos níveis da resistência aos antimicrobianos.

Alguns autores investigam hipóteses que tentam explicar a razão da disseminação mundial de alguns clones de micro-organismos multirresistentes. A resposta pode estar relacionada com a virulência dos isolados bacterianos. Trabalhos têm relatado a co-expressão de diversos genes de virulência e resistência em isolados provenientes de ambientes hospitalares, fato esse que facilita a propagação e permanência do patógeno dentro deste ambiente.

Com a realização deste estudo espera-se um maior conhecimento sobre a natureza genética dos principais mecanismos de resistência e virulência de isolados

de *Klebsiella pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos e que desta maneira possibilite uma melhor forma de controle desses micro-organismos multirresistentes em ambientes nosocomiais.

2 REVISÃO DA LITERATURA

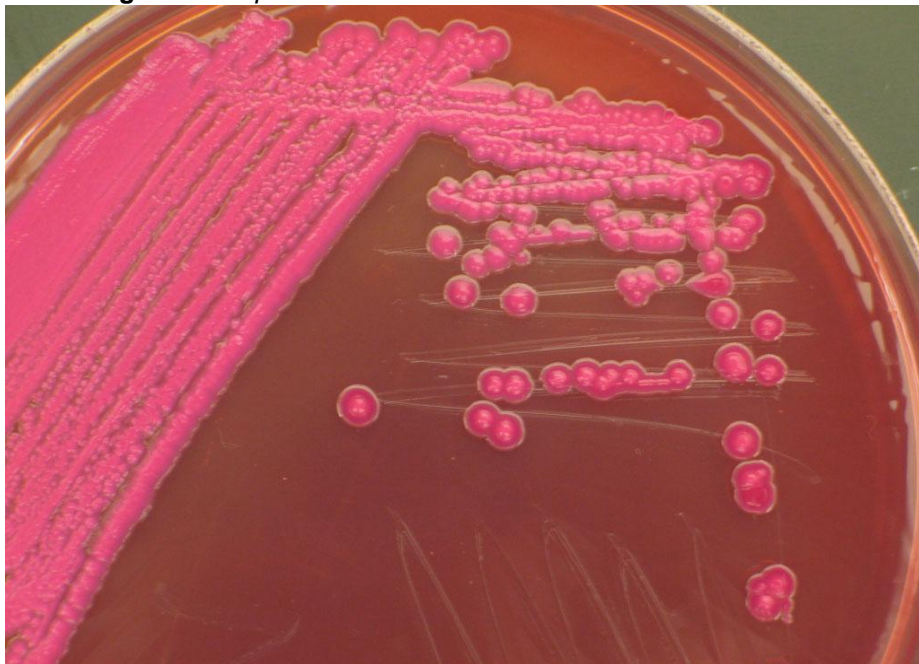
2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Klebsiella pneumoniae*

K. pneumoniae é um bacilo Gram negativo cujo tamanho varia de 0,3 a 1 μm de diâmetro e 0,6 a 6 μm de comprimento. É um micro-organismo imóvel, anaeróbico facultativo pertencente à família Enterobacteriaceae e está comumente associado à aquisição de infecções nosocomiais e comunitárias (SANTOS, 2011). O gênero *Klebsiella* foi descrito pela primeira vez em 1885 por Trevisan e foi designado em homenagem ao famoso microbiologista alemão Edwin Kleb, sendo dois anos mais tarde, em 1887, descrita a espécie *K. pneumoniae* (MARTINEZ *et al.*, 2004).

In vitro, *K. pneumoniae* apresenta melhor crescimento em condições aeróbicas, produzindo colônias grandes e mucoides quando cultivadas em meio de cultura sólido (Figura 1).

Figura 1 - *K. pneumoniae* cultivada em meio de cultura sólido.



Fonte: American Society for Microbiology (2005).

O aspecto apresentado pelas colônias se deve a grande produção de cápsula polissacarídica constituída pelo antígeno K. A cápsula da *K. pneumoniae* constitui o principal mecanismo de virulência desta espécie bacteriana, protegendo o micro-organismo da fagocitose e de fatores bactericidas presentes no soro e atuando

secundariamente na aderência ao epitélio, facilitando desta forma uma possível infecção (PODSCHUN; ULLMANN, 1998; SCHEMBRI *et al.*, 2005).

K. pneumoniae é um patógeno oportunista sensível à maioria dos antimicrobianos β -lactâmicos, apresentando resistência intrínseca apenas às aminopenicilinas (ampicilina e amoxicilina). Entretanto nas últimas décadas, isolados resistentes a esta classe de antimicrobianos estão sendo comumente reportados, e essa resistência está frequentemente associada à produção de enzimas capazes de hidrolisar o anel β -lactâmico desses antimicrobianos, as β -lactamases (PATERSON; BONOMO, 2005; PITOUT *et al.*, 2005).

2.2 Antimicrobianos

Antimicrobianos são drogas sintetizadas que apresentam a capacidade de inibir o crescimento de micro-organismos indicados para o tratamento de infecções. Podem ser bactericida, quando atuam provocando diretamente a morte dos micro-organismos, ou bacteriostáticos, quando atuam impedindo a replicação dos mesmos. Neste último caso, o sistema imune do hospedeiro é o maior responsável por debelar a infecção (DRAWZ; BONOMO, 2010; LIRAS; MARTÍN, 2006).

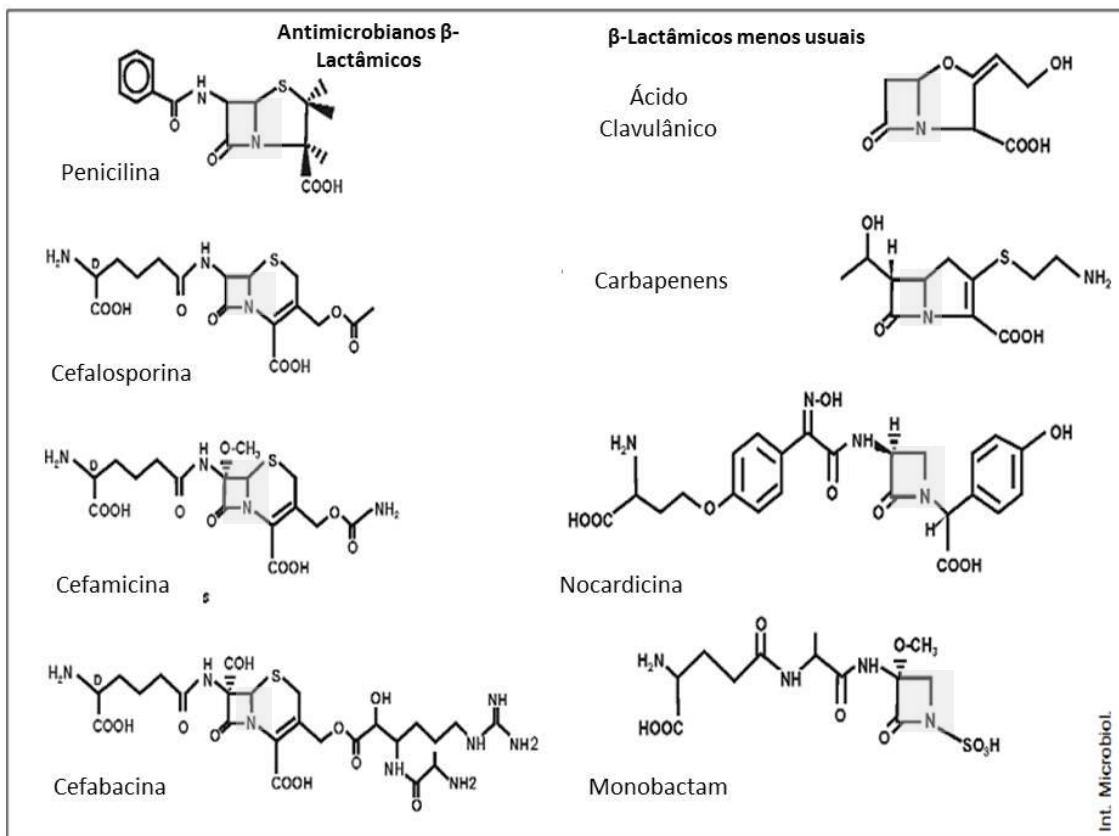
O uso indiscriminado desses fármacos na terapia clínica fez emergir a resistência bacteriana. Com o uso irracional, cepas cada vez mais resistentes foram selecionadas no ambiente, obrigando a indústria farmacêutica a sintetizar novos compostos com formulação química distinta, com o objetivo maior de burlar os mecanismos de resistência até então descritos (VILELA, 2009). A dificuldade na síntese de um único antimicrobiano que atuasse tanto em bactérias Gram positivas quanto em Gram negativas, também contribuiu para o desenvolvimento de um maior número de compostos químicos (DRAWZ; BONOMO, 2010; LIRAS; MARTÍN, 2006).

Atualmente, devido à diversidade de patógenos e mecanismos de resistência detectados em unidades hospitalares, o tratamento das infecções causadas por enterobactérias é realizado na maioria dos casos com β -lactâmicos ou quinolonas, em alguns casos associados aos aminoglicosídeos (MINARINI, 2008; PAPP-WALLACE *et al.*, 2011) .

2.2.1 Antimicrobianos β -lactâmicos

Os antimicrobianos β -lactâmicos são os mais comumente utilizados na terapia clínica para debelar infecções causadas por patógenos sensíveis, sendo bem tolerados pelo organismo humano (FLUIT *et al.*, 2001; LIRAS; MARTÍN, 2006). Inclui uma extensa família de diferentes grupos de compostos químicos, incluindo penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos, apresentando em comum em suas estruturas químicas o anel β -lactâmico (PAPP-WALLACE *et al.*, 2011) (Figura 2).

Figura 2 - Estrutura química dos diferentes β -lactâmicos.



Fo

nte: Adaptado de Liras e Martín (2006)

Nota: Em destaque o anel β -lactâmico, componente comum a todos antimicrobianos pertencentes a esta classe

De maneira geral, os antimicrobianos β -lactâmicos atuam se ligando às proteínas ligadoras de penicilinas - as PBPs (*Penicillin-Binding proteins*) impedindo as mesmas de realizarem a síntese de peptidoglicano, principais componentes da parede celular bacteriana. Com a ausência dessa ligação, a parede celular

bacteriana perde a sua estabilidade, ocasionando a morte do micro-organismo (LIRAS; MARTÍN, 2006).

2.2.1.1 Penicilinas

As penicilinas constituem o primeiro grupo de antimicrobianos indicados para uso na terapia clínica, revolucionando desta forma a medicina moderna, abrindo espaço para o tratamento eficaz de infecções de origem bacteriana (VILELA, 2009). Foi o primeiro antibiótico descoberto, em 1928 por Alexander Fleming, ao observar que colônias de *Staphylococcus spp.* eram inibidas por um fungo (*Penicillium notato*) que crescia na mesma placa. Anos após, o princípio ativo dessa inibição foi isolado, purificado, caracterizado e denominado de penicilina.

As penicilinas são compostas por um anel β -lactâmico e um anel de tiazolidina, que juntos dão origem ao ácido 6-aminopenicilânico (6-APA) (MARYN; GUDIOL, 2003). A detecção das penicilinases anos após a introdução das penicilinas, estimulou nas décadas seguintes o desenvolvimento de penicilinas quimicamente modificadas e que fossem inerte a ação das penicilinases até então descritas. Desta forma, diversas subclasses de penicilinas foram desenvolvidas, tais como: penicilinas penicilinase-resistentes, aminopenicilinas e penicilinas de espectro ampliado, que se diferenciam pela substituição das cadeias laterais na posição 6 do anel β -lactâmico (MARYN;GUDIOL, 2003).

2.2.1.2 Cefalosporinas

As cefalosporinas são fármacos cuja estrutura básica é constituída por um grupamento cefem, que consiste na junção de um anel dihidrotiocianídico e um anel β -lactâmico (MARYN; GUDIOL, 2003). Com a emergência da resistência bacteriana, as cefalosporinas apresentaram-se, inicialmente, como a solução para o tratamento de isolados bacterianos resistentes às penicilinas (VILELA, 2009). Entretanto, a resistência a esses compostos foi detectada poucos anos após sua introdução na terapia clínica, estimulando a indústria farmacêutica a produzir cefalosporinas com maior espectro de ação e mais resistentes à degradação enzimática. As cefalosporinas são classificadas em quatro gerações, cada qual composta por

diferentes cadeias laterais, conferindo desta forma diferentes propriedades farmacocinéticas, sendo as cefalosporinas de 4ª geração as de maior espectro de ação (MARYN; GUDIOL, 2003; DRAWZ, BONOMO, 2010).

2.2.1.3 Monobactâmicos

Os antimicrobianos monobactâmicos foram descobertos em 1975 e chamaram atenção por ser o primeiro β -lactâmico monocíclico. Ou seja, o anel β -lactâmico não está ligado a outro grupamento cíclico, como descrito nas penicilinas e cefalosporinas. Essa alteração na sua estrutura química lhe conferia até então uma maior vantagem sobre os outros antimicrobianos até então descritos, pois os mesmos eram bem mais resistentes à degradação enzimática pelas β -lactamases. Os monobactâmicos são derivados do ácido 3-aminomonobactâmico (3-AMA) e têm como principal representante o aztreonam (DRAWZ, BONOMO, 2010; MARYN; GUDIOL, 2003; VILELA, 2009).

2.2.1.4 Carbapenêmicos

Os carbapenêmicos são antimicrobianos que contém um anel β -lactâmico fusionado com um anel pirrolidínico compartilhando uma molécula de nitrogênio, sendo considerado os β -lactâmicos de maior espectro de ação (MARYN; GUDIOL, 2003). Em meio a uma intensa disseminação das β -lactamases de amplo espectro (ES β L), os carbapenêmicos demonstraram-se como drogas promissoras para o tratamento de infecções causadas por micro-organismos produtores de ES β L e/ou produtores de AmpC cromossomal, uma cefalosporinase induzível (MARYN; GUDIOL, 2003; PAPP-WALACE *et al.*, 2011; PEIRANO *et al.*, 2009). No fim dos anos 60, devido à ineficácia terapêutica dos antimicrobianos derivados da penicilina, uma nova série de fármacos começou a serem estudados e postos na terapia clínica, os inibidores de β -lactamases (PAPP-WALACE *et al.*, 2011). Os inibidores de β -lactamases são fármacos desenvolvidos para serem utilizados em terapia combinada, junto com outro β -lactâmico, já que atuam inibindo as β -lactamases produzidas pelo micro-organismo e não combatendo diretamente o mesmo (DRAWZ; BONOMO, 2010). Um dos primeiros inibidores desenvolvidos, o ácido

olivânico, apresentava em sua estrutura, a espinha dorsal de um antimicrobiano carbapenêmico. Entretanto, devido à baixa penetração na célula bacteriana e a instabilidade do ácido olivânico, a sua utilização na terapia clínica não foi proposta (DRAWZ; BONOMO, 2010; PAPP-WALACE *et al.*, 2011). Pouco tempo depois, dois importantes inibidores de β -lactamase foram descobertos: o ácido clavulânico e a tienamicina. A tienamicina é considerada o primeiro carbapenêmico, e demonstrou um potente espectro de ação antibacteriano e atividade frente às β -lactamases, e uma alta afinidade às PBPs chegando a apresentar atividade contra bactérias Gram negativas (inclusive *P. aeruginosa*), a alguns micro-organismos anaeróbios a algumas bactérias Gram positivas. Desta forma foi utilizado como modelo para elaboração de todos os outros carbapenêmicos (PAPP-WALACE *et al.*, 2011).

Apesar da boa atividade demonstrada pela tienamicina, a mesma não se concretizou como um potente antimicrobiano. Por se tratar de um produto natural obtido do *Streptomyces cattleya*, a tienamicina apresentava um processo de purificação bastante lento e demonstrou uma instabilidade quando presente em solução aquosa, o que resultava na degradação da molécula. Frente à emergência de isolados bacterianos resistente às cefalosporinas recém-disponíveis no mercado, as atenções foram voltadas ao desenvolvimento de outros carbapenêmicos, que fossem mais estáveis que a tienamicina e com atividade similar (FAINSTEIN *et al.*, 1982; PAPP-WALACE *et al.*, 2011).

Novos carbapenêmicos foram descobertos, com destaque inicial para o imipenem e panipenem. Ambos apresentaram atividade similar a tienamicina, entretanto eram mais estáveis em solução aquosa. O imipenem foi o primeiro carbapenêmico utilizado na terapia clínica (HASHIZUMI *et al.*, 1983). Anos depois, novos carbapenêmicos (meropenem, biapenem, ertapenem, doripenem, entre outros) começaram a ser sintetizados e recomendados para uso clínico (MANDELL *et al.*, 2009; PAPP-WALACE *et al.*, 2011). Atualmente quatro carbapenêmicos são recomendados para o tratamento de micro-organismos produtores de ES β L: imipenem, ertapenem, meropenem e doripenem (KANG *et al.*, 2004; MANDELL *et al.*, 2009; PAPP-WALACE *et al.*, 2011).

A eficiência dos carbapenêmicos se deve a sua elevada afinidade pelas PBPs do tipo 2, estabilidade frente as β -lactamases (inclusive as ES β Ls) e as

cromossômicas (AmpC), e uma excelente permeabilidade através da membrana externa bacteriana (WALTHER-RASMUSSEN; HOIBY, 2007).

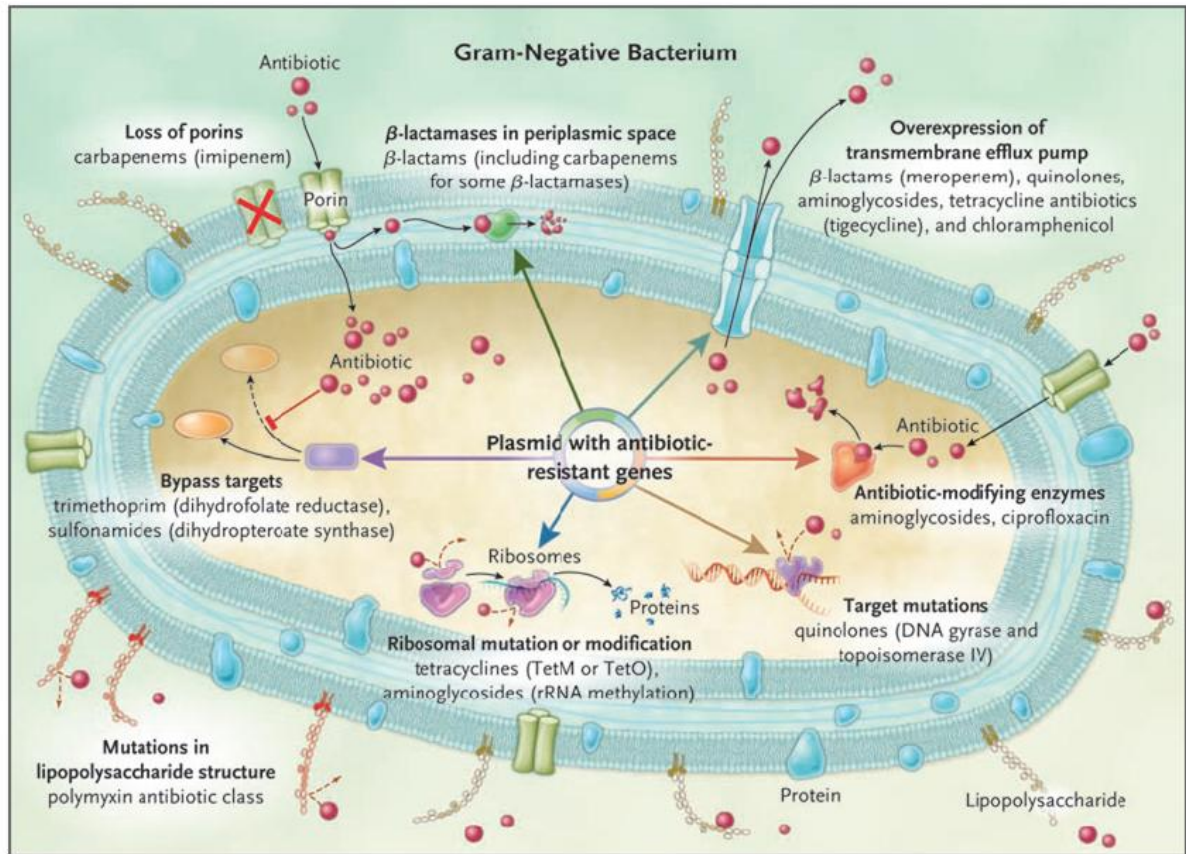
2.2.2 Resistência Bacteriana aos Antimicrobianos

Resistência bacteriana é a capacidade dos micro-organismos em resistir aos efeitos provocados por um determinado antimicrobiano (GIEDRAITIENÉ *et al.*, 2011). A euforia provocada pela descoberta da penicilina ainda na década de 40, provocou um uso indiscriminado dos antimicrobianos o que resultou numa disseminação da resistência bacteriana (VILELA, 2009). Estima-se que antes de 1946 cerca de 90% dos *Staphylococcus* spp. isolados em ambientes hospitalares eram sensíveis à penicilina (FINLAND, 1955). Ao longo de duas décadas foi possível perceber que cerca de 90% dos *Staphylococcus* spp. identificados nos ambientes hospitalares tinham se tornado resistentes às penicilinas (VILELA, 2009). Com a introdução de diversos antimicrobianos na terapia clínica nos anos subsequentes à detecção dos primeiros relatos de resistência às penicilinas, a pressão seletiva dentro das unidades hospitalares foi ainda maior. Isso facilitou a seleção de cepas multirresistentes e sua propagação foi quase que inevitável, já que medidas de contenção de infecções não eram comumente utilizadas em unidades hospitalares (GIEDRAITIENÉ *et al.*, 2011; QUEENAN; BUSH, 2007).

A associação entre o uso irracional de antimicrobianos e o posterior aparecimento de isolados bacterianos resistentes foi uma forte evidência do poderoso efeito seletivo dessa utilização irracional. Nos últimos anos, a taxa de detecção de bactérias MDR (Multidroga-resistente) tem aumentado em níveis alarmantes, e este aumento atribuído a uma combinação de características microbianas, pressão seletiva causada pela má utilização dos agentes antimicrobianos e a disseminação de genes de resistência (VILELA, 2009).

Existem diferentes mecanismos pelos quais um micro-organismo se torna resistente a um determinado antimicrobiano e a coexistência de mais de um mecanismo em um único isolado bacteriano contribui para o fenótipo MDR. Os principais mecanismos de resistência são: alteração da permeabilidade celular, alteração do sítio de ação do antimicrobiano, presença de sistemas de efluxo e degradação enzimática (ROSSI, 2011; VILELA, 2009) (Figura 3).

Figura 3 - Principais mecanismos de Resistência em Bactérias Gram negativas.



Fonte: Peleg e Huuper (2010)

2.2.2.1 Resistência Bacteriana aos Antimicrobianos β -lactâmicos

A emergência da resistência aos β -lactâmicos ocorreu logo depois da introdução do primeiro antimicrobiano na terapia clínica, a penicilina. Existem quatro mecanismos pelo qual os micro-organismos podem evitar a ação bactericida dos β -lactâmicos:

- a) Produção de β -lactamases: β -lactamases são enzimas capazes de hidrolisar o anel β -lactâmico dos antimicrobianos pertencentes a esta classe de fármacos, impedindo desta forma que o fármaco interaja com as PBPs (NAAS; POIREL; NORDMANN, 2008).
- b) Alterações nas PBPs: Alterações nas PBPs podem ser detectadas, e essas ocasionam uma diminuição na afinidade destas proteínas pelos antimicrobianos β -lactâmicos. É um mecanismo mais prevalente em bactérias Gram positivas, como o *S. aureus* e *Streptococcus pneumoniae* resistentes às penicilinas (CHAMBERS, 1997).

- c) Diminuição da Permeabilidade celular: A perda ou a diminuição da expressão de proteínas de membrana externa (porinas), que são as principais portas de entrada para os antimicrobianos na célula bacteriana, podem induzir um micro-organismo a um alto nível de resistência aos β -lactâmicos (DOMÉNECH-SÁNCHEZ, 2003; TSAI *et al.*, 2011).
- d) Hiperexpressão dos sistemas de efluxo: A hiperexpressão de sistemas de efluxo que tem como substrato os β -lactâmicos colabora ejetando o antimicrobiano, minimizando desta forma os danos causados pelo antimicrobiano (POOLE, 2005).

2.2.2.2 Produção de β -lactamases

As β -lactamases foram descritas pela primeira vez antes mesmo da utilização do primeiro β -lactâmico, o que reforça a teoria de que os antimicrobianos apenas selecionam micro-organismos resistentes (ABRAHAM *et al.*, 1940; VILELA, 2009). Foram descritas em diversas espécies bacterianas, com destaque para as enterobactérias, principais responsáveis pela disseminação dos genes de β -lactamase. As β -lactamases de espectro restrito são consideradas a principal causa da resistência bacteriana as penicilinas e algumas cefalosporinas, por romperem ligações indispensáveis para atividade dos β -lactâmicos, por hidroxilação irreversível da ligação amida, levando a inativação do antimicrobiano (BUSH, 2010; BUSH; JACOBY, 2010; SAMUELSEN *et al.*, 2004).

Para cada nova classe de antimicrobiano utilizada, novas β -lactamases emergem, sugerindo que as novas drogas têm selecionado novas variantes de β -lactamases, chegando a cerca de 890 tipos de β -lactamases descritas até o ano de 2010 (BUSH, 2010). Mutações nos genes codificadores das β -lactamases são as principais responsáveis por esse elevado número de enzimas descritas, o que demonstra o grande processo seletivo pelo qual passam os genes codificadores em função da constante pressão seletiva pelo uso contínuo de antimicrobianos (BUSH, 2010; WALTHER-RASMUSSEN; HOIBY, 2007).

Os genes de β -lactamase podem estar presentes no cromossomo bacteriano, inerente do organismo, ou podem ser mediados por plasmídeos, com grande potencial de disseminação na população bacteriana. As β -lactamases de maior

relevância clínica e de maior frequência em isolados nosocomiais de *K. pneumoniae* são denominadas de TEM e SHV (BUSH; JACOBY, 2010; NAAS; POIREL; NORDMANN, 2008).

As β -lactamases podem ser classificadas de acordo com suas propriedades funcionais e moleculares, ou através da similaridade proteica entre as diferentes β -lactamases (AMBLER *et al.*, 1991; BUSH; JACOBY, 2010). A classificação de Ambler organiza as β -lactamases em quatro grandes grupos de acordo com a similaridade na sequência de aminoácidos das diferentes enzimas. Já a classificação de Bush e Jacoby, baseia-se na propriedade funcional das enzimas e as organiza em quatro grupos (1-4) e subgrupos (a-f) (BUSH, 2010) (Quadro 1).

Quadro 1 - Classificação das β -lactamases segundo Ambler e Jacoby; Bush.

Classificação de Ambler	Classificação de Bush-Jacoby	Substrato Preferencial	Inibição pelo ácido Clavulânico	Enzimas representantes
A (Serino Penicilinas)	2 ^a	Penicilinas	+	PC1 em <i>S. aureus</i>
	2b	Penicilinas, Cefalosporinas de espectro estreito	+	TEM-1, TEM-2, SHV-1, SHV-11
	2be	Penicilinas, cefalosporinas de espectro estreito e estendido	+	SHV-2 a SHV-6, TEM-3 a TEM-26, CTX-Ms
	2br	Penicilinas	-	TEM-30, SHV-72
	2c	Penicilinas, Carbenicilina	+	PSE-1
	2e	Cefalosporinas de espectro estendido	+	FEC-1, CepA
	2f	Penicilinas, cefalosporinas carbapenêmicos	+/-	KPC2 a KPC17, SMEs, NMC-A, GES-5
B (Metallo- β -lactamase)	3	Todos os β -lactâmicos, exceto o aztreonam	-	IMPs, VIMs, NDM-1, SPM
C (Cefalosporinas)	1	Cefalosporinas	-	AmpC, CMYs, FOXs, ACTs, DHAs
D (Oxacilinas)	2d	Penicilinas, cloxacilina	+/-	OXA-1 a OXA-10

Fonte: Adaptado de Dhillon e Clark (2012)

2.2.2.3 β -lactamases de espectro ampliado (ES β L)

No início da década de 80, com a introdução das cefalosporinas de 3^a geração na terapia clínica, imaginou-se que esta seria a solução para o tratamento de infecções causadas por micro-organismos produtores de β -lactamase. Entretanto,

em 1983 foi reportada pela primeira vez a presença de um gene, carregado por plasmídeos, capaz de conferir resistência também às cefalosporinas de 3ª geração. Essas novas enzimas foram denominadas de β -lactamases de espectro ampliado (ES β L) (BRADFORD, 2001; BUSH, 2010; PATERSON; BONOMO, 2005; PITOUT; LAUPLAND, 2008).

Alguns genes de β -lactamases ao longo dos anos sofreram mutações pontuais em sua sequência nucleotídica dando origem às ES β L. Essas enzimas se destacam pela capacidade de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas de primeira, segunda e terceira geração (exceto as cefamicinas) e o aztreonam. Apesar da grande potência apresentada, as ES β Ls são inibidas pelos inibidores de β -lactamase (sulbactam, ácido clavulânico e tazobactam) (BUSH, 2010; PATERSON; BONOMO, 2005).

As ES β Ls são primordialmente produzidas por membros da família Enterobacteriaceae, em particular *K. pneumoniae* e *E. coli* (PITOUT; LAUPLAND, 2008). A literatura relata a produção destas enzimas também em isolados de *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*, entretanto com uma frequência bem mais baixa (DHILLON; CLARK, 2012). A emergência da disseminação destas enzimas em diferentes espécies bacterianas compromete o uso dos antimicrobianos β -lactâmicos no tratamento de infecções causadas por diversos membros da família Enterobacteriaceae, visto que este mecanismo está amplamente disseminado por todo mundo (BUSH, 2010; DHILLON; CLARK, 2012; JACOBY; BUSH, 2010).

Dentre as ES β Ls as cefotaximases (CTX-M), enzimas que apresentam como substrato preferencial a cefotaxima, são as mais prevalentes entre isolados de *K. pneumoniae* (BUSH, 2010; PITOUT *et al.*, 2005). Descobertas ainda na década de 90, acredita-se que as CTX-M tenham se originado a partir das enzimas KLUG-1 e KLUA-1 de *Kluyvera georgiana* e *Kluyvera ascorbata*, respectivamente, devido à alta similaridade apresentada (CANTÓN; COQUE, 2006). Atualmente, 148 variantes de CTX-M já foram descritas (CTX-M-1 a CTX-M-151) (<http://www.lahey.org/Studies>), sendo agrupadas em cinco diferentes grupos de acordo com a similaridade em suas sequências de aminoácidos. Desta forma são classificadas nos grupos CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 e CTX-M-25 (CANTÓN; COQUE, 2006). Este alto número de variantes deve-se as constantes mutações no gene codificador das cefotaximases, o *bla*_{CTX-M-like}, resultando em diferentes enzimas, com padrões

hidrolíticos distintos (CANTÓN, 2006; CERGOLLE-NOVELLA *et al.*, 2010; DHILLON; CLARK, 2012). Após sua detecção, as enzimas do tipo CTX-M logo se disseminaram por todo o mundo, sendo responsáveis por severos surtos de infecções causados por micro-organismos resistentes as cefalosporinas de amplo espectro (BUSH, 2010).

2.2.2.4 Resistência Bacteriana aos Carbapenêmicos

A resistência aos carbapenêmicos fez surgir um dos maiores problemas de saúde pública dos tempos atuais (PAPP-WALLACE *et al.*, 2011). Já não bastassem os diversos mecanismos de resistência disseminados por todos os continentes que já conferiam resistência as cefalosporinas de 3ª geração (principalmente as ES β L), a emergência de determinantes de resistência aos carbapenêmicos representou a retomada de uma guerra que já parecia ter chegado ao fim (CHANG, 2000). Os carbapenêmicos foram introduzidos na terapia clínica e logo recomendados ao tratamento de infecções causadas por micro-organismos produtores de ES β L (até então, mecanismo com maior espectro de ação), e devido a sua ampla utilização a presença de mecanismos de resistência foi reportada poucos anos após com a descoberta da hiperprodução de algumas β -lactamases cromossomais com atividade de cefalosporinase (AmpC) associada a uma diminuição na permeabilidade da membrana externa bacteriana (WALTHER-RASMUSSEN; HOIBY, 2007; YIGIT *et al.*, 2001). Ao longo dos anos diversas enzimas com atividade de carbapenemase começaram a ser descritas, chamando atenção para um possível mecanismo de resistência prestes a emergir. No início do século XXI foi reportada a presença de uma carbapenemase em um isolado bacteriano de *K. pneumoniae* com potente atividade contra as cefalosporinas até então descritas, a todos os carbapenêmicos utilizado na terapia clínica, mas sensíveis aos inibidores de β -lactamase disponíveis (VILELA, 2009; YIGIT *et al.*, 2001).

2.2.2.5 Carbapenemases

As carbapenemases representam a mais versátil família das β -lactamases, apresentando uma atividade incomparável de hidrólise frente às outras β -lactamases

descritas. São enzimas que apresentam a capacidade de hidrolisar significativamente no mínimo imipenem e/ou meropenem, junto com outros antimicrobianos β -lactâmicos (QUEENAN; BUSH, 2007; NORDMAN; POIREL, 2002).

De acordo com a classificação de Ambler, as carbapenemases podem ser divididas em três grupos:

a) Carbapenemases de Classe A: Também denominadas de carbapenemases serino-dependentes. Estas enzimas necessitam de uma molécula de serina em seu sítio ativo para desempenhar sua função. Apresentam notória habilidade em hidrolisar carbapenêmicos, cefalosporinas, penicilinas e o aztreonam, e todas são inibidas pelos inibidores de β -lactamase. As principais famílias das carbapenemase de classe A, são composta pelas enzimas: KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), SME (*Serratia marcescens* enzyme), NMC/IMI (Imipenem-hidrolizing β -lactamase), GES (Guiana extended spectrum) (ALBA *et al.*, 2005; BUSH, 2010; QUEENAN; BUSH, 2007; WALTHER-RASMUSSEN; HOIBY, 2007; YIGIT *et al.*, 2001).

b) Carbapenemases de Classe B: Também denominadas de metalo- β -lactamases (M β L) estas enzimas apresentam habilidade em hidrolisar carbapenêmicos e são resistentes aos inibidores de β -lactamase comercialmente disponíveis. São enzimas que necessitam de íons bivalentes (normalmente o zinco) para desempenhar sua função e são inibidas pelo EDTA. Adicionalmente a resistência apresentada aos carbapenêmicos, verifica-se que as enzimas pertencentes a esta classe hidrolisam cefalosporinas e penicilinas, mas não possuem atividade frente ao aztreonam. Dez subclasses de MBL já foram até então descritas: SPM-1 (São Paulo Metalo- β -lactamase), VIM-1 (Verona imipenemase), IMP-1 (imipenemase), NDM-1 (New Delhi metalo- β -lactamase), SIM-1 (Seoul imipenemase), GIM-1 (German imipenemase), AIM-1 (Australian imipenemase), KHM (Kyorin Hospital metalo- β -lactamase), DIM-1 (Dutch imipenemase), TMB (Tripoli MBL) (EL-SALIBI *et al.*, 2012; QUEENAN; BUSH, 2007; PICÃO *et al.*, 2009; POIREL *et al.*, 2011).

c) Carbapenemases de Classe D: As carbapenemases de classe D são compostas pelas enzimas do tipo OXA (hidrólise preferencial da oxacilina). Estas

enzimas hidrolisam alguns β -lactâmicos (não tão fortemente como as carbapenemases de classe A e B) e são fracamente inibidas pelo ácido clavulânico (WALSH, 2010).

As carbapenemases de classe A, são mais frequentemente reportadas em enterobactérias, incluindo *K. pneumoniae*. Acredita-se que pelo fato dos principais genes codificadores das carbapenemases de classe A, encontrarem-se localizados em plasmídeos, tenha favorecido sua disseminação principalmente na família Enterobacteriaceae, visto que o aparato de replicação plasmidial de bactérias geneticamente não relacionadas é distinto (CARATOLLI, 2009).

Em algumas espécies bacterianas como *P. aeruginosa* e *A. baumannii*, as carbapenemases de classe B já eram conhecidas e bastante reportadas, apresentando grande influência na resistência aos carbapenêmicos. Entre isolados de *K. pneumoniae*, a M β L IMP apresenta maior prevalência (GUPTA *et al.*, 2011). Atualmente, a carbapenemase do tipo NDM (carbapenemase de classe B) têm emergido, principalmente entre membros da família Enterobacteriaceae, sendo atualmente a principal MBL de interesse clínico a ser investigada (LASCOLS *et al.*, 2012; CARVALHO-ASSEF *et al.*, 2013; POIREL *et al.*, 2011).

Já entre as carbapenemases de classe D, a OXA-48, destaca-se entre isolados de *K. pneumoniae*, provenientes principalmente do continente Europeu. Até a presente data, esta enzima ainda não foi detectada em território brasileiro (KALPOE *et al.*, 2011; THOMAS *et al.*, 2013).

2.2.2.5.1 Carbapenemases do tipo KPC

As carbapenemases do tipo KPC foram descritas pela primeira vez por Yigit *et al.* (2001) em um isolado de *K. pneumoniae* datado de 1996. Este isolado apresentou resistência a todos os β -lactâmicos testados, mas na presença de ácido clavulânico observou-se uma redução dos CIMs anteriormente mensurados. A esta carbapenemase foi atribuído o nome de KPC, e verificou-se que a mesma era codificada por um gene plasmidial e este foi denominado de *bla*_{KPC} (YIGIT *et al.*, 2001).

De acordo com o banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), 16 variantes do gene *bla*_{KPC} já foram descritas (*bla*_{KPC-2} a

bla_{KPC17}) até a presente data, apresentando uma maior prevalência em enterobactérias, mas com descrições pontuais da presença deste gene também em não fermentadores (ALMEIDA *et al.*, 2012b; JÁCOME *et al.*, 2012; ROBLEDO *et al.*, 2010; VILLEGAS *et al.*, 2007).

Isolados carreando o gene *bla_{KPC}* apresentaram uma rápida disseminação mundial, já sendo detectados em todos os continentes. Essa rápida disseminação deve-se a presença do gene *bla_{KPC}* em plasmídeos altamente conjugativos e sua associação com elementos genéticos móveis do DNA, como os transposons. Apesar de sua disseminação entre diferentes espécies, isolados de *K. pneumoniae* são até então os mais associados com a presença do *bla_{KPC}*, o que dificulta o tratamento de infecções causadas por esse patógeno, já que *K. pneumoniae* exibe notória habilidade em acumular e transferir diferentes mecanismos de resistência. Normalmente isolados produtores de KPC são MDR, devido a presença de outros mecanismos de resistência nestes isolados (CUZÓN *et al.*, 2010; NAAS *et al.*, 2008; SHEN *et al.*, 2009).

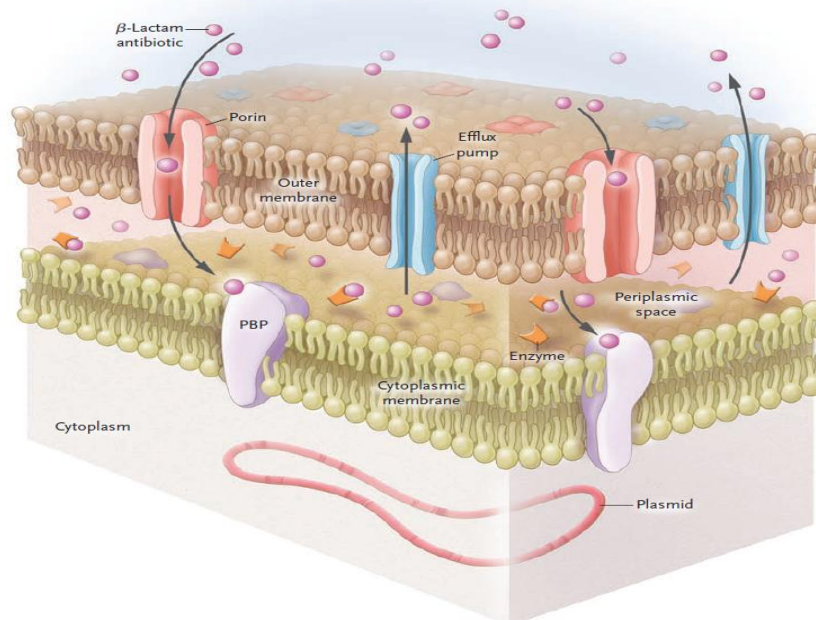
No Brasil, isolados produtores de KPC foram descritos desde 2009 tornando-se endêmico em território nacional, já sendo descritos nas cinco regiões do Brasil (ALMEIDA *et al.*, 2012a; ALMEIDA *et al.*, 2012b; MONTEIRO *et al.*, 2009; PEREIRA *et al.*, 2012; ROSSI, 2011). Até a presente data, apenas o alelo *bla_{KPC-2}* foi detectado em território brasileiro, entretanto, em isolados de *K. pneumoniae* com diferentes pulsotipos, *sequence types* e em diferentes plasmídeos, o que confirma a hipótese de que dentro do território brasileiro o *bla_{KPC-2}* está sendo amplamente disseminado entre isolados bacterianos e que essa disseminação não é apenas resultado da propagação de um clone inicialmente detectado (ANDRADE *et al.*, 2011; MONTEIRO *et al.*, 2009; PEREIRA *et al.*, 2012).

O tratamento de infecções causadas por micro-organismos produtores de KPC geralmente é realizado com tigeciclina ou polimixina B, já que normalmente ambos os antimicrobianos apresentam atividade *in vitro* e *in vivo* contra estes micro-organismos. Entretanto as opções terapêuticas ainda são limitadas, já que certos patógenos apresentam resistência intrínseca a estes dois antimicrobianos utilizados na terapia clínica, restando ao paciente o uso de terapia combinada para debelar a infecção (BRATU *et al.*, 2005; ROCHE *et al.*, 2009).

2.2.2.6 Diminuição da Permeabilidade Celular

A membrana externa das bactérias Gram negativas apresentam proteínas triméricas que servem como canais para a entrada de moléculas grandes na célula bacteriana (Figura 4). Estas proteínas são denominadas de porinas e também servem como porta de entrada para diversos antimicrobianos, que quando quimicamente formulados são desenvolvidos com um tamanho específico para que possa entrar por determinada porina bacteriana (DOUMITH *et al.*, 2009).

Figura 4 - Representação esquemática das membranas bacterianas e seus principais componentes.



Fonte: Price e Weinstein (2008).

Nota: As porinas são a principal porta de entrada dos antimicrobianos β -lactâmicos. Sua ausência ocasiona a diminuição no influxo do antimicrobiano, minimizando desta forma sua ação nas PBPs.

Mutações nos genes codificadores das porinas bacterianas originando OMPs com tamanho ou conformação distinta da original, ou a diminuição da expressão de porinas não mutadas são as principais maneiras para que se haja uma redução na permeabilidade da membrana externa bacteriana (DOMÉNECH-SÁNCHEZ *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2009).

K. pneumoniae expressa constitutivamente seis principais porinas (OmpA, 32 kDa; OmpK35, 35 kDa; OmpK36, 36 kDa; OmpK37, 37 kDa; PhoE, 39 kDa; LamB, 48 kDa). Duas destas proteínas são consideradas como principais para o metabolismo da *K. pneumoniae*. Estudos demonstram que a perda das OmpK35 e

OmpK36 estão relacionadas com a resistência bacteriana principalmente aos β -lactâmicos e diminuição da virulência nos isolados bacterianos. Experimentos comprovam que a diminuição da expressão ou perda da OmpK35 confere um aumento das CIMs para ceftazidima, enquanto alterações na expressão ou a perda da OmpK36 confere uma redução da sensibilidade à cefotaxima, cefamicinas e carbapenêmicos. O ertapenem pode ser particularmente afetado com a perda concomitante destas duas principais porinas (DOMÉNECH-SANCHEZ *et al.*, 2003; MARTINEZ-MARTINEZ *et al.*, 1999).

A perda de porinas geralmente está associada à inserção de fragmentos de DNA no meio dos genes codificadores das porinas (*ompK35* e *ompK36*) e essa inserção pode provocar diferentes resultados à célula bacteriana, variando de uma simples diminuição da expressão, ou até mutação gerando uma porina não-funcional (TSAI *et al.*, 2011).

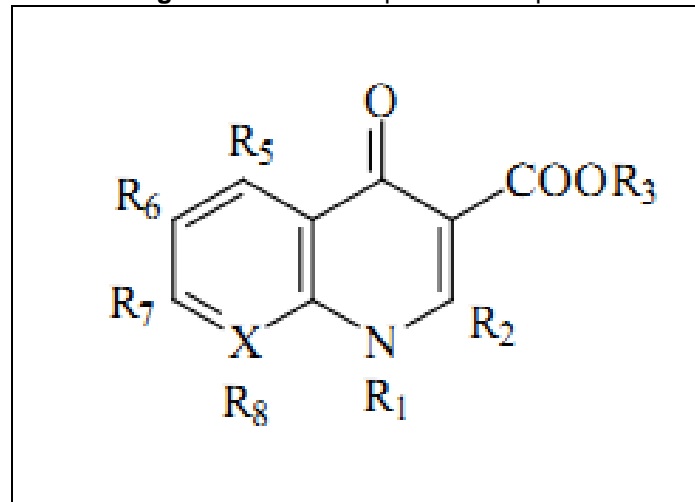
O efeito compensatório já foi visualizado em isolados resistentes aos carbapenêmicos. Outras porinas não relacionadas com o influxo de nutrientes e a entrada de antimicrobianos assumem o papel das porinas que por algum motivo não estão desenvolvendo adequadamente sua função. Desta forma, recentemente, uma nova porina envolvida com a sensibilidade aos carbapenêmicos foi descrita, a OmpK26. Acredita-se que na ausência da OmpK35 e OmpK36, a OmpK26 passe a ser expressa tentando desta forma suprir a deficiência das outras porinas afetadas (GARCÍA-SUREDA *et al.*, 2011a; GARCÍA-SUREDA *et al.*, 2011b).

Um alto nível de resistência aos carbapenêmicos só é garantido com a associação de diferentes mecanismos de resistência, já que estudos demonstram que isolados que portam exclusivamente um determinado mecanismo de resistência não apresenta CIM elevada para os carbapenêmicos (DOUMITH *et al.*, 2009; SHI *et al.*, 2012).

2.3 Quinolonas

As quinolonas constituem um grupo de antimicrobianos sintéticos com ação bactericida, desenvolvidos a partir de modificações na estrutura da 4-quinolona (EMMERSON; JONES, 2003; GUAN *et al.*, 2013; LESHER *et al.*, 1962) (Figura 4).

Figura 5 - Estrutura química das quinolonas.



Fonte: Minarini (2008)

A primeira quinolona descoberta foi o ácido nalidíxico em 1962, um subproduto resultado da síntese de purificação da cloroquina (composto utilizado no tratamento contra a malária), e foi disponibilizada para uso clínico em 1967 (EMMERSON; JONES, 2003; LESHER *et al.*, 1962). A utilização desta primeira classe de quinolonas era bem limitada, seu uso era apenas indicado nos casos de infecção do trato urinário, já que o ácido nalidíxico não apresentava amplo espectro de ação (atuava apenas contra bactérias Gram negativas, exceto *Pseudomonas spp.*), atingia baixas concentrações em nível de corrente sanguínea e apresentava alta CIMs (EMMERSON; JONES, 2003; WISER, 1984).

Como objetivo de ampliar o uso das quinolonas principalmente contra bactérias Gram negativas, muitas substituições nas cadeias laterais da 4-quinolona foram realizadas, dando origem às quinolonas de segunda geração. Embora modificações tenham sido realizadas, as quinolonas de segunda geração continuaram com seu uso restrito, já que as alterações realizadas na molécula de ácido nalidíxico não foram suficientes para aumentar o espectro de ação das quinolonas (BLONDEAU, 2004; SPANGLER *et al.*, 1996).

A terceira geração de quinolonas, marcada pela adição de uma molécula de flúor na posição R6 deu origem às fluoroquinolonas, e a partir daí as quinolonas tiveram um maior uso na terapia clínica (GUAN *et al.*, 2013). Algumas outras alterações foram realizadas na molécula original (como as substituições nas posições R1 e R8, de carbono para nitrogênio) que caracterizam as quinolonas de 3ª geração. A partir da terceira geração as quinolonas passaram a também atuar em

bactérias gram positivas e a maior solubilidade da molécula devido a sua fluoração, permitiu a esta classe de antimicrobiano ser utilizadas em soluções oftálmicas (APPELBAUM *et al.*, 2004; MOELLERING, 2005). Fármacos como ciprofloxacino, norfloxacino e levofloxacino são os principais representantes desta terceira geração. O ciprofloxacino, talvez a mais importante e mais utilizada fluoroquinolona, foi introduzida na terapia clínica em 1987 e no fim do século XX tornou-se o agente antimicrobiano mais utilizado em todo o mundo (APPELBAUM *et al.*, 2004; BALL, 2000; ROCHA, 2012).

Devido à emergência da resistência às quinolonas de 3ª geração foi necessário mais uma vez a modificação da estrutura química das quinolonas até então descrita. A adição do grupamento metóxi na posição R8 deu origem às quinolonas de 4ª geração, que têm como principais representantes o moxifloxacino e gatifloxacino (ALPPELBAUM; HUNTER, 2000). Estas alterações químicas permitiram uma redução do efluxo bacteriano e aumentou a potência das quinolonas contra *Staphylococcus spp.* e *Streptococcus spp.* resistentes a outras quinolonas (FUKUDA *et al.*, 2001, ROCHA, 2012).

As quinolonas atuam impedindo a replicação do DNA bacteriano, através da ligação com enzimas que participam do processo de replicação (MINARINI, 2008). A replicação do DNA é um processo vital a todo organismo para que ocorra a divisão celular, e é comandado por diversas proteínas incluindo as topoisomerases (LI, 2005; MINARINI, 2008). Em bactérias, a topoisomerase do tipo II (DNA girase) age sobre a fita de DNA que iniciará o processo de replicação. A função da DNA girase é promover a superhelicoidização negativa do DNA para que as proteínas que compõe a maquinaria de replicação possam ter acesso a fita de DNA (LI, 2005). A DNA girasse tem forma tetramérica e é composta essencialmente por quatro subunidades, duas subunidades A (GyrA) e duas subunidades B (GyrB). Outra topoisomerase essencial para o processo de replicação é a topoisomerase IV, responsável pela separação (decatenação) dos círculos ligados obtidos no fim da replicação do DNA bacteriano. Esta outra proteína também é composta por quatro subunidades, duas subunidades C (ParC) e duas subunidades E (ParE) (LI, 2005; MINARINI, 2008; ROCHA 2012).

As quinolonas capturam uma ou ambas as proteínas (DNA girase e topoisomerase IV) formando um complexo quinolona-proteína-DNA, ocasionando rupturas em uma única fita do DNA bacteriano, impedindo desta forma o mecanismo

de replicação do micro-organismo. Alguns autores relatam que em níveis de concentração elevados, a ruptura pode ocorrer nas duas fitas do DNA bacteriano (MINARINI, 2008; ROCHA, 2012).

2.3.1 Resistência às quinolonas

Devido à larga utilização das quinolonas, a seleção de cepas resistentes às quinolonas foi apenas uma questão de tempo. Diferentes mecanismos interagem para provocar o fenótipo de resistência às quinolonas. Dentre eles se destacam mutações cromossomais, hiperexpressão de sistemas de efluxo e aquisição de genes de resistência plasmidiais (ROCHA, 2012).

2.3.1.1 Mutações na DNA girase

A DNA girase (topoisomerase II) é essencial para o processo de replicação bacteriana e é um dos alvos das quinolonas. Mutações descritas no gene que codifica a subunidade A desta proteína (*gyrA*) geralmente estão localizadas em uma região designada de região determinante de resistência à quinolonas (QRDR) (MINARINI, 2008). Em *E. coli* a região QRDR está localizada entre os nucleotídeos 199 e 318. A presença de uma única mutação na região QRDR do gene *gyrA* é capaz de produzir resistência ao ácido nalidíxico. Entretanto para obter um alto nível de resistência às fluoroquinolonas são necessárias mutações adicionais em *gyrA*, ou em outro alvo, como o gene *parC* (DRLICA, 1994; MINARINI; DARINI, 2012).

Mutações nos códons 83 e 87 em *E. coli*, demonstram-se as mais comuns e importantes para a resistência às quinolonas. Isso porque esses códons interagem com os radicais R1 e R7 da estrutura das quinolonas (MINARINI, 2008).

Diferentemente do gene *gyrA*, o gene *gyrB* tem uma baixa taxa de mutação e pouca influência na resistência de enterobactérias às quinolonas. Particularmente a mutação localizada no códon 426 confere resistência a todas as quinolonas e mutações no códon 447, confere resistência apenas ao ácido nalidíxico (RUIZ, 2003; MINARINI, 2008; MINARINI; DARINI, 2012).

2.3.1.2 Mutações na Topoisomerase IV

As mutações na topoisomerase IV também ocorrem numa frequência bem mais baixa do que as detectadas no gene *gyrA*. As alterações mais comumente detectadas na região QRDR de isolados de *E. coli* são substituições nos códons 74, 80 e 84 (EVERETT *et al.*, 1996). As mutações em *parC* somente conferem resistência as quinolonas quando estão associadas também a mutações no gene *gyrA*. As mutações no gene *parE* são menos frequentes em bactérias Gram negativas, sendo poucas são as mutações neste gene descritas na literatura que conferem resistência às quinolonas (BREINES *et al.*, 1997).

Um estudo com enterobactérias provenientes do sudeste brasileiro evidenciou que as mutações em *parC* têm papel secundário na resistência bacteriana, e que geralmente isolados que apresentam alto nível de resistência às quinolonas carregam além das mutações na região QRDR dos genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* e *parE*, genes plasmidiais (MINARINI, 2008; MINARINI; DARINI, 2012).

2.3.1.3 Determinantes Plasmidiais de Resistência as Quinolonas

A disseminação dos mecanismos de resistência plasmidiais às quinolonas representa um grande desafio à saúde pública, uma vez que este antimicrobiano é amplamente utilizado, não apenas para o controle de infecções em ambientes hospitalares, mas também no tratamento de infecções comunitárias (HOPPER, 2001).

Os determinantes de resistência plasmidiais começaram a ser descobertos em 1994, quando Martinez-Martinez *et al.* (1998) reportaram a descoberta do gene *qnr*, gene este que estava relacionado com um discreto aumento da CIM para as quinolonas, em especial o ciprofloxacino, quando presente em isolados bacterianos (MARTINEZ-MARTINEZ; PASCUAL; JACOBY, 1998). Desde o primeiro relato, a investigação e a caracterização de determinantes plasmidiais responsáveis pelo fenótipo de resistência às quinolonas tem sido bastante reportados (MINARINI *et al.*, 2007, CASTANHEIRA *et al.*, 2007). Dentre os mecanismos plasmidiais até hoje descobertos, apresentam uma maior relevância a presença dos genes *qnr*, *aac(6')-Ib-cr*, *qepA*, *oqxA* e *oqxB* (ROBICSEK *et al.*, 2006).

Por sua maior disseminação, o gene *qnr* é considerado um dos principais mecanismos de resistência plasmidiais às quinolonas, apesar da sua baixa contribuição no nível de resistência do isolado bacteriano (ROBICSEK *et al.*, 2006).

O gene *qnr* é responsável por codificar uma proteína de mesmo nome (Qnr) de 218 aminoácidos, capaz de proteger a DNA girase e a topoisomerase IV da ligação às quinolonas. Estudos têm comprovado que a presença do gene *qnr* por si só não é capaz de ocasionar resistência as quinolonas, o que ocorre é apenas uma diminuição na sensibilidade dos isolados bacterianos a esta classe de fármacos. Entretanto, a associação deste determinante de resistência a mutações na região QRDR dos genes *gyrA* e *parC*, é capaz de ocasionar alto níveis de resistência às quinolonas, conferindo vantagem fenotípica na seleção de cepas resistentes (MINARINI, 2008; MINARINI; DARINI, 2012; ROBICSEK *et al.*, 2006).

Até a presente data, diferentes variantes da proteína Qnr foram descobertas, baseando-se na similaridade da sequência de aminoácidos destas proteínas. Sete variantes do QnrA (QnrA1 a QnrA7), 74 variantes de QnrB (QnrB1 a QnrB74), uma variante de QnrC, duas variantes de QnrD (QnrD1 e QnrD2), nove variantes do QnrS (QnrS1 a QnrS9) e cinco variantes do QnrVc (QnrVc1 a QnrVc6), foram até então descritas (lahey.org/qnrStudies). No Brasil diferentes alelos do gene *qnr* já foram reportados: *qnrA1*, *qnrB12*, *qnrB8*, *qnrB19*, *qnrS1*, *qnrVC1* (CASTANHEIRA *et al.*, 2007; FERRARI *et al.*, 2011; MINARINI *et al.*, 2007; MINARINI, 2008;; PAIVA *et al.*, 2012).

2.4 Aminoglicosídeos

Aminoglicosídeos são antimicrobianos que apresentam ampla atividade *in-vitro* contra diferentes bacilos Gram negativos como *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Proteus* spp., *Morganella* spp., *Serratia* spp., *Acinetobacter* spp. e *Pseudomonas* spp., assim como atividade contra alguns cocos Gram positivos, como *S. aureus* e alguns *Streptococcus* spp. (VAKULENKO; MOBASHERY, 2003). Esta classe de antimicrobiano foi descoberta ainda na década de 40, ao se isolar uma substância proveniente de *Streptomyces griseus*, que apresentava atividade bactericida contra o *Mycobacterium tuberculosis*, assim como diversas bactérias Gram positivas e Gram negativas (OLIVEIRA; CIPULLO; BURDMANN, 2006).

Estudos posteriores isolaram, purificaram e disponibilizaram para uso clínico o primeiro aminoglicosídeo, a estreptomicina, em 1944 (VAKULENKO; MOBASHERY, 2003). De maneira geral, os aminoglicosídeos derivam de *Streptomyces* spp.

(estreptomicina, neomicina e tobramicina), *Micromonospora* spp. (gentamicina), ou obtidos por semi-síntese (netilmicina, arbicacina, amicacina e isepamicina) (DURANTE-MAGONI *et al.*, 2009). Na prática clínica os antimicrobianos mais frequentemente prescritos são a tobramicina, amicacina e gentamicina enquanto a estreptomicina ainda é largamente utilizada para o tratamento da tuberculose, brucelose, tularemia e peste bubônica (PINSETTA, 2010). Convencionalmente a gentamicina é largamente utilizada em combinação com outra droga, muitas vezes resistente, em infecções causadas por *Enterococcus* spp., enquanto a amicacina é indicada para o tratamento de bacilos Gram negativos não fermentadores (principalmente *Pseudomonas* spp. e *Acinetobacter* spp.) (OLIVEIRA; CIPULLO; BURDMANN, 2006).

Os aminoglicosídeos são compostos catiônicos que apresentam mecanismo de entrada na célula ainda não bem elucidado (TAMMA; COSGROVE; MARAGASKI, 2012). Até o exato momento, especula-se que esse processo de entrada é constituído em três etapas. Na primeira etapa ocorre a adsorção do aminoglicosídeo na superfície bacteriana, através de interações eletrostáticas com o LPS bacteriano. Devido sua alta polaridade, a difusão através da membrana celular é difícil, levando os aminoglicosídeos a interagirem com o LPS que possibilita sua difusão em pequenas quantidades. As próximas etapas são dependentes do potencial de membrana celular (potencial *trans* membrana), gerado pela cadeia respiratória. Desta forma o oxigênio é essencial para a entrada dos aminoglicosídeos na célula bacteriana, já que moléculas de O₂ são aceptores de elétrons no fim da cadeia respiratória em micro-organismos aeróbios, não apresentando esta classe de antimicrobiano atividade contra micro-organismos anaeróbios (PINSETTA, 2010). Como mencionado anteriormente, o conjunto de mecanismos necessários para o influxo do antimicrobiano não está bem esclarecido, não ficando claro até o momento como ocorre a passagem da droga do espaço periplasmático para o citoplasma celular.

Todos os aminoglicosídeos apresentam o mesmo mecanismo de ação, agindo no ribossomo bacteriano, impedindo a tradução proteica (WACHINO; ARAKAWA, 2012). O ribossomo bacteriano é um complexo formado por três moléculas de RNA e mais de 50 proteínas. Consiste em duas subunidades que apresentam diferentes coeficientes de sedimentação, subunidade maior (50S) e subunidade menor (30S). A subunidade maior é composta pelas moléculas de RNA 5S e 23S e mais 33

proteínas, enquanto a subunidade menor é composta pelo RNA 16S e cerca de 20 proteínas (VAKULENKO; MOBASHERY, 2003). Ao chegar ao citoplasma, os antimicrobianos ligam-se ao sítio A da porção 16S da subunidade menor do ribossomo bacteriano (30S), porção esta que desempenha papel crucial para a alta fidelidade da tradução do material genético. Três importantes sítios de ligação para os tRNAs no ribossomo, o sítio A (para os aminoácidos), o sítio P (para os peptídeos) e o sítio E (responsável pela saída do tRNA). A ligação dos aminoglicosídeos no sítio A, impede a translocação do RNA transportador ao seu anti-códon específico impedindo desta forma a correta leitura da fita de RNA mensageiro ocasionando erros de tradução e conseqüentemente a morte bacteriana (PINSETA, 2010; VAKULENKO; MOBASHERY, 2003).

Por deslocarem íons de Ca^{2+} e Mg^{2+} presentes na membrana plasmática o que ocasiona uma desorganização temporária na membrana bacteriana, os aminoglicosídeos são comumente utilizadas em associação com antimicrobianos β -lactâmicos (principalmente os carbapenêmicos), visto que por alterarem a permeabilidade de membrana, podem agir como moduladores da resposta dos carbapenêmicos (OLIVEIRA; CIPULLO; BURDMANN, 2006; TAMMA; COSGROVE; MARAGASKI, 2012).

2.4.1 Resistência aos Aminoglicosídeos

Diversos mecanismos podem colaborar para a resistência aos aminoglicosídeos: i) diminuição da permeação do antimicrobiano; ii) diminuição da afinidade do antimicrobiano pelo ribossomo bacteriano; iii) inativação do fármaco por enzimas microbianas (PINSETA, 2010). O mecanismo de resistência aos aminoglicosídeos comumente encontrado em enterobactérias é a inativação enzimática, que é mediada por três classes de enzimas, as acetiltransferases (AACs), as nucleotidiltransferases (ANTs) e as fosfotransferases (APHs) (DOI; ARAKAWA, 2007). Estas enzimas são conhecidas como modificadoras de aminoglicosídeos e sua presença em bactérias Gram positivas e Gram negativas elevam os valores das CIMs em mais de 10 vezes, principalmente para a gentamicina (DURANTE-MAGONI *et al.*, 2009). Os antimicrobianos ao serem modificados pelas enzimas modificadoras passam apresentar pobre afinidade ao ribossomo bacteriano, ocasionando dessa forma a resistência a estas drogas

(VAKULENKO; MOBASHERY, 2003). Além de serem subclassificadas de acordo com as alterações que provocam na molécula de antimicrobiano, as enzimas modificadoras de aminoglicosídeos também são subdivididas levando em consideração a posição onde provocam esta alteração no antimicrobiano e no fenótipo conferido pela mesma (VAKULENKO; MOBASHERY, 2003; YAMANE *et al.*, 2005).

Diversas enzimas modificadoras de aminoglicosídeos são comumente reportadas em isolados produtores de KPC, colaborando desta forma para o perfil MDR dos isolados bacterianos. Esses genes normalmente estão contidos esses cassetes gênicos localizados principalmente em integron de classe 1, apresentando esse elemento genético papel crucial na disseminação dos genes codificadores dessas enzimas (GUIMARÃES *et al.*, 2013; MACHADO *et al.*, 2005; PEIRANO *et al.*, 2009; VINUÉ *et al.*, 2008).

2.4.1.1 Acetiltransferases

Acetiltransferases (AACs) são enzimas que catalisam a reação de acetilação de um dos grupamentos contidos na estrutura do antimicrobiano (PINSETA, 2010). São subdivididas em quatro famílias: AAC(1), AAC(3), AAC(2') e AAC(6'), apresentando todas as enzimas pertencentes a esta família semelhante mecanismo de ação (VAKULENKO; MOBASHERY, 2003). Propõe-se que as enzimas atuem após a ligação de uma molécula de Acetil-CoA (cofator) e a molécula de aminoglicosídeo, por ataque nucleofílico, modificando a estrutura química do antimicrobiano (PINSETA, 2010). A presença das acetiltransferases reduz a afinidade do antimicrobiano com a porção 30S do ribossomo bacteriano, reduzindo desta forma a sensibilidade aos aminoglicosídeos. Mensura-se que a presença dessas enzimas possa reduzir em até quatro vezes a afinidade entre antimicrobiano e ribossomo (PINSETA, 2010; VAKULENKO; MOBASHERY, 2003).

Dentre as bactérias Gram negativas, enzimas pertencente à família AAC(6') são as mais disseminadas. As 6'-acetiltransferases são enzimas de espectro ampliado capazes de modificar aminoglicosídeos clinicamente relevantes, como amicacina, gentamicina tobramicina e canamicina (DURANTE-MAGONI *et al.*, 2009).

2.4.1.2 Nucleotidiltransferases

As enzimas nucleotidiltransferases representam uma das menores classes de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, compreendendo até então cinco classes: ANT(2''), ANT(3''), ANT(4'), ANT(6) e ANT(9). Estas enzimas utilizam ATP como substrato secundário para a modificação de sua hidroxila nas respectivas posições: 2'', 3'', 4', 6 e 9. Apesar de representarem um pequeno grupo, as nucleotidiltransferases apresentam notória habilidade em modificar gentamicina e tobramicina (PINSETA, 2010; VAKULENKO; MOBASHERY, 2003).

2.4.1.3 Fosfotransferases

As fosfotransferases (APHs) são enzimas que utilizam ATP para fosforilar hidroxilas presente no antimicrobiano. A fosforilação dos aminoglicosídeos altera drasticamente sua capacidade de ligação com o sítio A no ribossomo. As APHs são subdivididas em sete classes, APH(3'), APH(2''), APH(3''), APH(4), APH(7''), APH(6) e APH(9) apresentando maior prevalência em bactérias Gram positivas (VAKULENKO; MOBASHERY, 2003).

Apesar da maior prevalência das enzimas modificadoras de aminoglicosídeos em bactérias Gram negativas, nos últimos anos a emergência de outra classe de enzimas vem chamando atenção nesses micro-organismos, as metilases. No Brasil, genes codificadores de metilases foram detectados em isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC-2 no estado de São Paulo (BUENO *et al.*, 2013).

2.4.1.4 16S rRNA metiltransferase

A metilação da porção 16S do RNA ribossomal contido na subunidade ribossomal 30S é um mecanismo de proteção desenvolvido pelos Actinomycetos para tornarem-se inertes aos aminoglicosídeos produzidos (DOI; ARAKAWA, 2007). O mecanismo de resistência consiste na adição de grupamentos químicos (grupos metil) ao ribossomo bacteriano por enzimas denominadas de metilases. A metilação dos nucleotídeos G1405 e A1508 no sítio A da subunidade 30S impede a ligação do aminoglicosídeo com a subunidade menor ribossomal. Dessa forma o aminoglicosídeo passa a não reconhecer seu sítio alvo, não se ligando ao ribossomo

e desta forma não impedindo a tradução do mRNA, garantindo um alto nível de resistência, principalmente a gentamicina, amicacina, tobramicina e arbicacina (DURANTE-MAGONE et al., 2009; WACHINO; ARAKAWA, 2012). Esse mecanismo já foi detectado em espécies bacterianas clinicamente relevantes como *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *E. coli* e *Klebsiella* spp. (WACHINO; ARAKAWA, 2012).

Em 2002, o primeiro gene responsável por codificar uma metilase foi descrito em um isolado de *Citrobacter freundii* na Polônia e designado de *armA* (GOLOBIEWSKI et al., 2007). Atualmente alguns outros genes codificadores de metilases (*npmA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *rmtE*, *rmtF*, *rmtG*) também foram descritos e relacionados com isolados produtores de carbapenemase (WACHINO; ARAKAWA, 2012). Grande parte destes genes está associada com elementos genéticos móveis, como integrons e transposons inseridos em plasmídeos, o que contribui para a disseminação desses determinantes de resistência (DOI; ARAKAWA, 2007; WACHINO; ARAKAWA, 2012). No Brasil as metilases *rmtD* e *rmtG* foram descritas em isolados bacterianos produtores de KPC no Brasil, limitando ainda mais as opções terapêuticas para o tratamento de infecções causadas por esses patógenos (BUENO et al., 2013).

2.5 Opções terapêuticas atuais para o tratamento de micro-organismos MDR

A disseminação mundial de carbapenemases (principalmente as do tipo KPC e NDM) em enterobactérias e de OXAs com atividade de carbapenemase no complexo *A. baumannii* e em outros micro-organismos não fermentadores, tem reduzido, significativamente, as opções terapêuticas para o tratamento de infecções causadas por esses patógenos (BUSH, 2010; JONES et al., 2013; WASH, 2010). Dados do SENTRY Antimicrobial Surveillance Program apontam que a taxa de micro-organismos *extreme-drug resistant* (XDR) ainda é baixa, mas com tendência ao aumento nos próximos anos (GALES et al., 2012). Devido às altas taxas de infecções por bactérias gram-negativas multirresistentes, associado ao fato do não desenvolvimento de novos antimicrobianos com diferente mecanismo de ação pela indústria farmacêutica, retornar a velhos antimicrobianos tem sido uma boa opção para driblar o emergente fenômeno da resistência bacteriana aos antimicrobianos (GIRARDELLO; GALES, 2012).

2.5.1 Polimixinas

Polimixinas são antimicrobianos polipeptídicos com atividade sobre várias bactérias Gram negativas (MENDES; BURDMANN, 2009). Descobertas em 1947, a partir da síntese por um microrganismo de solo, *Paenibacillus polymixa*, constituem um grupo de cinco substâncias intimamente relacionadas que receberam os nomes de polimixina A, B, C, D e E, apresentando a polimixina E, o nome de colistina por ser naturalmente produzida pelo *Bacillus colistinus* (FALAGAS; KASIAKOU, 2006). Apenas as polimixinas B e E foram disponibilizadas para uso devido à alta toxicidade das demais polimixinas. Ambas, apresentam a mesma atividade *in vitro*, com diferença apenas em sua composição química (BERGEN *et al.*, 2006). Essa classe de antimicrobianos tornou-se disponível para uso em 1962 para o tratamento de infecções graves causadas por bactérias Gram negativas. Devido à alta nefrotoxicidade ocasionada pelo seu uso prolongado, na década de 70 começaram a ser substituídas pelas cefalosporinas, sendo seu uso indicado apenas ao tratamento de infecções leves e formulações tópicas (FALAGAS; KASIAKOU, 2006; GIRARDELLO; GALES, 2012).

Uma boa atividade das polimixinas tem sido observada em estudos de vigilância realizados no Brasil. Jones *et al.* (2013) detectaram que 95% dos isolados de *K. pneumoniae* recuperados na América Latina no ano de 2011 apresentavam sensibilidade à colistina. Entretanto, sabe-se que algumas bactérias (*Burkholderia* spp., *Serratia* spp., *Proteus* spp., *Providencia* spp.) apresentam mecanismo de resistência intrínseco as polimixinas, não sendo indicado, desta forma, o tratamento de infecções causadas por esses patógenos com polimixinas (GIRARDELLO; GALES, 2012). As polimixinas não apresentam atividade contra bactérias Gram positivas, nem contra fungos e sua atividade bactericida manteve-se estável desde sua introdução no mercado (MENDES; BURDMANN, 2009).

As polimixinas são antimicrobianos anfipáticos que atuam nas membranas externa e citoplasmática do microrganismo. Apresentam ação semelhante à de detergentes catiônicos, por interação com componentes da membrana celular como os lipopolissacarídeos (LPS) e fosfolipídeos. Essa ligação resultará num deslocamento dos íons de Ca^{2+} e Mg^{2+} que agem estabilizando a membrana celular. A desestabilização da membrana implicará a ruptura da mesma, ocasionando perda do conteúdo citoplasmático, culminando na morte celular (HANCOCK, 1997). A

capacidade da polimixina em se ligar ao LPS bacteriano suscitou estudos que visem diminuir os impactos das septicemias com o tratamento prévio com polimixina, visto que o LPS bacteriano é responsável pelo desencadeamento da sepse e consecutivamente o choque séptico. Desta forma a polimixina poderia atuar minimizando os estímulos inflamatórios induzidos pelo LPS (FALAGAS *et al.*, 2006; VICENT *et al.*, 2005).

Dois diferentes fenótipos de resistência às polimixinas podem ser observados. O primeiro, denominado de resistência mutacional, que é considerada natural do microrganismo, pode ser atribuído a mutações no genoma bacteriano que promovem a elevação da CIM nestes isolados. Este fenótipo apresenta CIMs relativamente baixas, em torno dos pontos de corte estabelecidos pelo CLSI. O segundo mecanismo, denominado de adaptativo, é observado quando o uso de polimixinas estimula o aumento gradativo da CIM, podendo a mesma chegar a valores superiores a 128µg/mL. Apesar das altas CIMs, o mecanismo adaptativo gera um fenótipo que pode ser reversível na ausência de pressão seletiva. Apesar da não completa elucidação, sabe-se que a resistência a polimixina é mediada por alterações no lipídio A, componente do lipopolissacarídeo bacteriano. Estudos comprovam que essas alterações são controladas, normalmente, por sistemas de dois componentes (GIRARDELLO; GALES, 2012; GUNN, 2008).

Estudos posteriores sobre os mecanismos de resistência à polimixina em diferentes espécies bacterianas apontaram diferentes estratégias celulares para impedir a ação das polimixinas. Os primeiros estudos sobre resistência às polimixinas, realizados em isolados de *Salmonella enterica*, indicaram que as alterações na molécula de LPS, responsáveis por garantir a resistência a polimixina consistiam na adição de uma molécula de 4-amino-arabinose na porção do lipídio A do LPS, diminuindo desta forma a interação entre a polimixina e o LPS bacteriano (NAVARRE *et al.*, 2005). Em isolados de *A. baumannii*, alterações no LPS também foram identificadas ocasionando resistência às polimixinas. Diferentemente do mecanismo descrito em *Salmonella enterica*, verificou-se que a alteração do LPS em *A. baumannii* devia-se a adição de uma molécula de fosfoetanolamina ao lipídeo A (ARROYO *et al.*, 2011; MILLER *et al.*, 2011). Entre isolados de *K. pneumoniae*, além de alterações no lipídio A, a resistência as polimixinas também foi relacionada ao aumento da produção da cápsula polissacarídica, minimizando, dessa forma, a

interação entre o antimicrobiano e a superfície celular (CAMPOS *et al.*, 2004; GIRARDELLO; GALES, 2012; LLOLBET; TOMAS; BENGOCHEA, 2008).

Os sistemas de dois componentes (*Two Component Systems*) são sistemas globais de regulação gênica, utilizados por diferentes microrganismos para a expressão de fatores de resistência e virulência (GOODERHAN; HANCOCK, 2009). São responsáveis por mediar alterações no LPS bacteriano, através de uma cascata de reações que é desencadeada por fatores ambientais, tais como: presença de ferro, concentrações elevadas de cálcio, baixas concentrações de magnésio, ou ainda alteração no pH do meio (GIRARDELLO; GALES, 2012; GROISMAN; KAYSER; SONCINI, 1997). O sistema é formado pela associação de duas proteínas, a primeira é uma proteína sensor de histidina quinase que percebe os estímulos ambientais. Essa reação ativará uma segunda proteína que apresenta localização citoplasmática e que se autofosforila, promovendo desta forma a ativação ou repressão do gene alvo, desencadeando a resistência a polimixina (GOODERHAM; HANCOCK, 2009).

A detecção de isolados cada vez mais resistentes resultou no aumento do uso das polimixinas nos últimos anos. Em alguns locais do mundo, a emergência de isolados produtores de carbapenemase resistentes à polimixinas foi notada mais precocemente. Ko *et al.* (2007) relataram a presença de altas taxas de resistência a colistina entre isolados de *A. baumannii* MDR provenientes de hospitais da Coréia do Sul. Já entre isolados de *Klebsiella* spp., relatos de isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC foram reportados desde 2005 na Grécia e nos Estados Unidos, sendo hoje reportados em diversos locais do mundo, inclusive no Brasil (RAMOS *et al.*, 2014).

2.5.2 Tigeciclina

A tigeciclina é um antimicrobiano semi-sintético análogo à tetraciclina, que não é afetada pelos mecanismos de resistência até então descritos as tetraciclina, compondo desta forma uma nova classe de antimicrobiano, as gliciliclinas (DEAN *et al.*, 2003; RUZIN *et al.*, 2005). As gliciliclinas são derivadas da minociclina e apresentam um espectro de atividade ampliando contra diferentes patógenos Gram positivos e Gram negativos, incluindo *K. pneumoniae*. Sabe-se que algumas poucas espécies de bactérias Gram negativas apresentam sensibilidade reduzida a

tigeciclina, como: *P. aeruginosa*, *Proteus* spp., *Providencia* spp., *Morganella morganii* (RUZIN *et al.*, 2005).

O mecanismo de ação da tigeciclina é semelhante às tetraciclina, inibindo a tradução proteica bacteriana, através de sua ligação a subunidade 30S do ribossomo da bactéria, impedindo, desta forma, a entrada de tRNA no sítio ribossomal (RUIZ *et al.*, 2005). É indicada para o tratamento de infecções severas em tecidos moles e intra-abdominais, principalmente quando as infecções são ocasionadas por microrganismos resistentes aos β -lactâmicos. Propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas da droga revelam o baixo poder de penetração nos órgãos mais internos do corpo humano, podendo, dessa forma, ocasionar falhas terapêuticas devido à baixa concentração da droga no sítio da infecção (VELEBA; SCHEINEDRS, 2012). Embora a tigeciclina tenha sido somente aprovada pela “*Food and Drug Administration*” (FDA) para o tratamento de infecções de pele e partes moles, infecções intra-abdominais complicadas e pneumonia comunitária (Tygacil, bula do medicamento, 2007), esse antimicrobiano tem sido frequentemente utilizado no tratamento de infecções causadas por *A. baumannii* (CURCIO *et al.*, 2008).

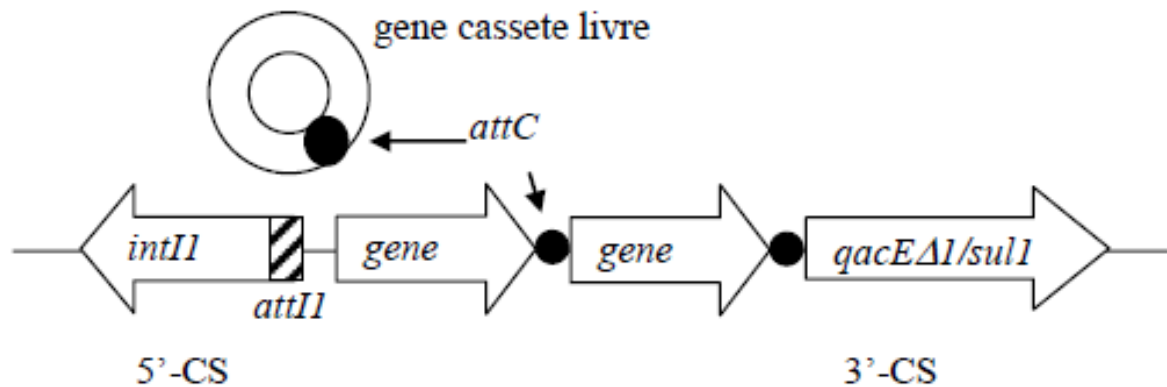
A resistência à tigeciclina normalmente é mediada por hiperexpressão de sistemas de efluxo da família RND (*Resistance Nodulation-Division*). Em *K. pneumoniae* a hiperexpressão do sistema de efluxo AcrAB-TolC é responsável por ejetar a tigeciclina da célula bacteriana. Em *K. pneumoniae* descreve-se que mutações no regulador *ramA*, ou repressor *ramR* podem estar envolvidas com a hiperexpressão do sistema AcrAB-TolC e ocasionar, conseqüentemente, a resistência à tigeciclina. Por se tratar de um sistema inespecífico, já que age sobre os β -lactâmicos, incluindo os carbapenêmicos, além das quinolonas, mutações nos genes reguladores colaboram para o fenótipo de MDR apresentado pelas bactérias que portam essas mutações (VELEBA; SCHEINEDRS, 2012).

2.6 Elementos genéticos e sua associação com a resistência bacteriana

2.6.1 Integrons

Os integrons são elementos genéticos do DNA bacteriano, capazes de integrar, rearranjar e retirar genes localizados em cassetes gênicos dentro de sua própria estrutura (STOKES; HALL, 1989). Diversas classes de integrons já foram descritas, baseando-se na similaridade genética do gene da integrase (*intI*). Cinco destas classes estão relacionadas à disseminação de genes de resistência bacteriana, sendo os integrons de classe 1 (*intI1*) os de maior prevalência hospitalar e detectados com maior frequência na família *Enterobacteriaceae* (BIKARD *et al.*, 2010). Já os integrons de classe 2 (*intI2*) são mais frequentemente detectados em bactérias Gram-negativas não fermentadoras. Alguns trabalhos relatam a possibilidade da coexistência destas duas classes de integrons em um mesmo isolado, colaborando desta forma com a resistência a outras classes de antimicrobianos (KADLEC *et al.*, 2008; MACHADO *et al.*, 2007). A estrutura do integron de classe 1 consiste na presença de dois segmentos conservados e uma região central denominada de variável (Figura 6) (MAZEL, 2000).

Figura 6 - Representação esquemática de um integron de classe 1.



Fonte: Picão (2009)

O primeiro segmento conservado é denominado “Segmento Conservado 5’ ” e é composto pelo gene da integrase de classe 1 (*intI1*), dois promotores, o *Pant* (promotor exclusivo da integrase de classe 1) e o *Pc* (promotor dos demais genes presentes no integron de classe 1), além do sítio de integração específico (*attI1*). O segundo segmento conservado é denominado “Segmento Conservado 3’ ” e é composto pelos genes: *qacEΔ1* (gene que confere resistência aos compostos quaternários de amônio e detergentes) e o *sul1* (gene que confere resistência as

sulfonamidas) (GILLINGS *et al.*, 2008; MAZEL, 2006; STOKES E HALL, 1989). Entre estes dois segmentos conservados localiza-se a região variável, podendo não apresentar cassetes gênicos ou variar de um a múltiplos cassetes, sendo a inserção destes totalmente relacionada à pressão seletiva imposta ao micro-organismo (CAMBRAY *et al.*, 2010; MAZEL, 2006). Desta forma, quanto maior for a pressão seletiva, maior será a necessidade de mecanismos distintos de resistência (HUANG *et al.*, 2009). Entre os cassetes gênicos presentes nesta região encontra-se o sítio de recombinação (*attC*), fragmento também conhecido como elemento de 59 pb' que participa ativamente do mecanismo *rolling-circle*, mecanismo pelo qual os diferentes cassetes gênicos são inseridos na região variável (CAMBRAY *et al.*, 2010). Por não possuírem promotores próprios, os genes localizados dentro dos cassetes gênicos na região variável dependem exclusivamente dos promotores do integron (*Pant* e *Pc*) para serem expressos, apresentando maior nível de expressão o cassete gênico que estiver mais próximo ao promotor (HUANG *et al.*, 2009)

A estrutura posterior à região conservada 3' varia de acordo com o isolado bacteriano. Alguns integrons podem apresentar uma sequência de inserção (IS) adjacente a região conservada 3', como a *ISCR1*, que, como toda IS, é móvel e insere-se em geral, juntamente com um gene de β -lactamase *downstream* ao gene *sul1'* permitindo ao gene de β -lactamase uma maior mobilidade dentro do genoma bacteriano (CAMBRAY *et al.*, 2010; POWER *et al.*, 2005).

2.6.2 Plasmídeos

Plasmídeos são fragmentos de DNA extracromossomais de fita dupla, que apresentam replicação independente da célula hospedeira (replicação autônoma) (CARATTOLI, 2009). Apesar de autônoma, a replicação plasmidial possuem importantes mecanismos que controlam o número de cópias daquele mesmo plasmídeo em uma célula bacteriana (LEAVITT *et al.*, 2010). Estão presentes em quase todas as espécies bacterianas, variando de tamanho, mas podendo chegar a várias centenas de quilobases (Kb). De maneira geral, os plasmídeos não carregam genes essenciais para desenvolvimento das células em ambientes com ausência de estresse para a mesma. Diferente disso carregam genes que conferem uma maior vantagem quanto à adaptação da bactéria em diferentes ambientes, carreando, por

exemplo, fatores toxina-antitoxina e genes de resistência a antibióticos (CARATTOLI *et al.*, 2005, CARATTOLI, 2009).

Os plasmídeos conferem as bactérias uma maior variabilidade genética, através da transmissão lateral desses elementos genéticos entre micro-organismos de mesma espécie, ou até mesmo de espécies distintas. A este processo se dá o nome de conjugação bacteriana. De acordo com a capacidade de o plasmídeos serem transmitidos através da conjugação bacteriana, os mesmos podem ser classificados em plasmídeos conjugativos e não conjugativos (CARATTOLI, 2009; CUZÓN *et al.*, 2011; LEAVITT *et al.*, 2010).

Diversos autores atribuem a rápida disseminação de importantes determinantes de resistência a antimicrobianos, à presença de plasmídeos conjugativos nestes isolados bacterianos. Essa rápida disseminação confere uma vantagem seletiva aos micro-organismos que adquiriram esses plasmídeos em ambientes onde há uma grande pressão seletiva, como o uso de antimicrobianos em unidades hospitalares (CARATTOLI, 2009; LEAVITT, *et al.*, 2010; QUEENAN, BUSH 2007)

Genes comumente associados à resistência a diversos antimicrobianos em enterobactérias, como *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} (ES β L), *bla*_{KPC} (gene de resistência aos carbapenêmicos), *bla*_{OXA} (gene de resistência aos β -lactâmicos), *qnr* (gene de resistência às quinolonas) são comumente reportados em grandes plasmídeos conjugativos. Muitas vezes detecta-se a presença de mais de um gene de resistência em um mesmo plasmídeo, o que colabora para a disseminação de micro-organismos MDR (CARATTOLI, 2009).

2.6.3 Transposons

Transposons são elementos genéticos com habilidade de se movimentar no genoma bacteriano através de um mecanismo denominado de transposição (PICÃO, 2009). Estes elementos genéticos existem em praticamente todos os organismos, entretanto sua função e seu mecanismo replicativo é melhor compreendida em bactérias, organismo cuja evolução genética se deve, em grande parte, a ação destes elementos (SIEFERT, 2009). É comum a detecção de um mesmo transposons bacteriano em bactérias de diferentes espécies, pressupondo desta

forma que uma intensa troca de material genético é algo que ocorre com regularidade entre células bacterianas (SKIPPER *et al.*, 2013).

Dois diferentes tipos de transposons (Transposons composto e transposon não-composto) estão relacionados a bactérias e sua presença na célula bacteriana pode proporcionar vantagem seletiva a mesma, visto que muitos dos transposons carregam genes de resistência aos antimicrobianos (SKIPPER *et al.*, 2013). Os transposons compostos normalmente são flanqueados por duas sequências de inserção idênticas, que apresentam papel crucial para a transposição do fragmento de DNA. Normalmente este tipo de transposons se transpõe por transposição não-replicativa, não deixando resquício do transposons no DNA alvo (SIEFERT, 2009). Já os transposons não compostos se caracterizam pela ausência das ISs flanqueando o transposon. A transposição é do tipo replicativa, não ocasionando a perda de nenhum fragmento de DNA. O transposon é replicado, e a nova cópia se mobilizará para alguma região do genoma. Devido a ausência das ISs, a transposição nesse tipo de transposon é dependente das IRs (*Inverted Repeats* ou Sequências Repetidas Invertidas) (SKIPPER *et al.*, 2013).

Diversos transposons já foram caracterizados e tiveram sua relação com a disseminação de genes de resistência estabelecidas. Devido a sua alta mobilidade no genoma bacteriano, comumente os transposons associam-se a plasmídeos conjugativos, facilitando também a mobilidade de genes de resistência entre diferentes micro-organismos (CUZÓN; NAAS; NORDMAN, 2011). Um exemplo clássico da associação dos transposons com a resistência bacteriana é o *Tn4401*. Naas *et al.* (2008) ao investigar o contexto genético envolvido com o gene *bla_{KPC}* descreveram a associação deste gene com um transposon. O *Tn4401* é um transposon derivado da família *Tn3*, que apresenta um tamanho de aproximadamente 10 Kb, delimitado por duas sequências invertidas repetidas imperfeitas de 39 pb. Apresenta em sua estrutura genes codificadores de transposases e resolvases, duas sequências de inserção (*ISKpn7* e *ISKpn6*) além do gene *bla_{KPC}* (NAAS *et al.*, 2012). Diversos autores atribuem ao *Tn4401* a alta mobilidade adquirida pelo gene *bla_{KPC}*, contribuindo desta forma para sua intensa disseminação (ANDRADE *et al.*, 2011; KITCHEL *et al.*, 2009; LEAVITT *et al.*, 2010; NAAS *et al.*, 2008; PICÃO *et al.*, 2013) .

2.7 Virulência Bacteriana

Virulência é a capacidade patogênica de um micro-organismo causar doença/lesão no hospedeiro (BRISSE *et al.*, 2009). Já para alguns autores, a virulência vai bem mais além do que a simples capacidade de causar doença, ela está diretamente relacionada com a mortalidade produzida por aquele patógeno (SCHEMBRI *et al.*, 2005, WU *et al.*, 2010). Apesar da discordância no conceito preciso do que venha ser a virulência, é de senso comum que o desfecho clínico de um paciente está relacionado com sua condição imunológica no momento do contato com o patógeno e com os possíveis fatores de virulência que esse patógeno apresenta (BRISSE *et al.*, 2009; SCHEMBRI *et al.*, 2005; WU *et al.*, 2010). Cada patógeno carrega consigo sua patogenicidade natural e os fatores de virulência seriam propriedades que aumentariam sua virulência (PODSCHUN; ULLMANN, 1998).

2.7.1 Fatores de virulência em *K. pneumoniae*

K. pneumoniae é responsável por uma série de doenças em humanos e em animais. Frequentemente é o patógeno hospitalar de maior detecção em infecções nos trato urinário, respiratório e na corrente sanguínea (PODSCHUN; ULLMANN, 1998, SCHEMBRI *et al.*, 2005). Infecções hospitalares são causadas por diversos clones de *K. pneumoniae*, sendo esse patógeno considerado oportunista, desde que afete pacientes debilitados. Em contraste, sérias infecções causadas pelo mesmo patógeno podem ser detectadas em pacientes saudáveis de comunidade, o que sugere participação ativa dos fatores de virulência (SIU *et al.*, 2011).

Fatores como: lipopolissacarídeos, sistemas de captação de ferro, adesinas fimbriais e não fimbriais, produção de biofilme e a capsula polissacarídica são comumente associados com a virulência em *K. pneumoniae* (BRISSE *et al.*, 2009; PODSCHUN; ULLMANN, 1998).

2.7.1.1 Cápsula Polissacarídica

A cápsula polissacarídica é abundante em isolados de *K. pneumoniae* e representa o principal mecanismo de virulência desta espécie. A cápsula tem função

de proteção contra a ação antibacteriana do soro além de dificultar a fagocitose dos micro-organismos por macrófagos (PODSCHUN; ULLMANN, 1998, SIU *et al.*, 2011).

Dentre os mais de 80 antígenos capsulares (K) já descritos em *K. pneumoniae*, quatro antígenos estão mais associados com isolados bacterianos mais virulentos. *K. pneumoniae* com os sorotipos K1, K2, K4 e K5 são mais virulentas do que os demais sorotipos, sendo menos virulentas os sorotipos com antígeno capsular superior ou igual a 6 (K6 a K77) (HENNEQUIN, AUREMAN *et al.*, 2012; PODSCHUN; ULLMANN, 1998; SIU *et al.*, 2011). Entretanto, em ambientes nosocomiais há uma prevalência dos sorotipos K1 e K2. Isolados K1 são frequentemente detectados em casos de pneumonias mais graves e abscessos piogênicos. Já os sorotipos K2, K3, K4 e K5 estão mais relacionados com casos de pneumonia adquirida por pacientes de comunidade (PODSCHUN; ULLMANN, 1998).

A tipagem do sorotipo da *K. pneumoniae* pode ser realizada através de reações imunológicas ou de técnicas moleculares. Nas reações imunológicas reações de aglutinação em látex são comumente utilizadas para a realização da tipagem. Soros contendo anticorpos contra antígenos específicos que compõem a cápsula polissacarídica são utilizados na reação antígeno-anticorpo. A Reação em cadeia da Polimerase (PCR) também pode ser utilizada para a identificação dos diferentes sorotipos, já que os diferentes antígenos capsulares são codificados por diferentes alelos gênicos. Com a utilização de iniciadores específicos seguido de sequenciamento do produto obtido é possível identificar qual dos genes está presente nos isolados bacterianos (RENNIE *et al.*, 1978, PAN *et al.*, 2008).

2.7.1.2 Mucoviscosidade

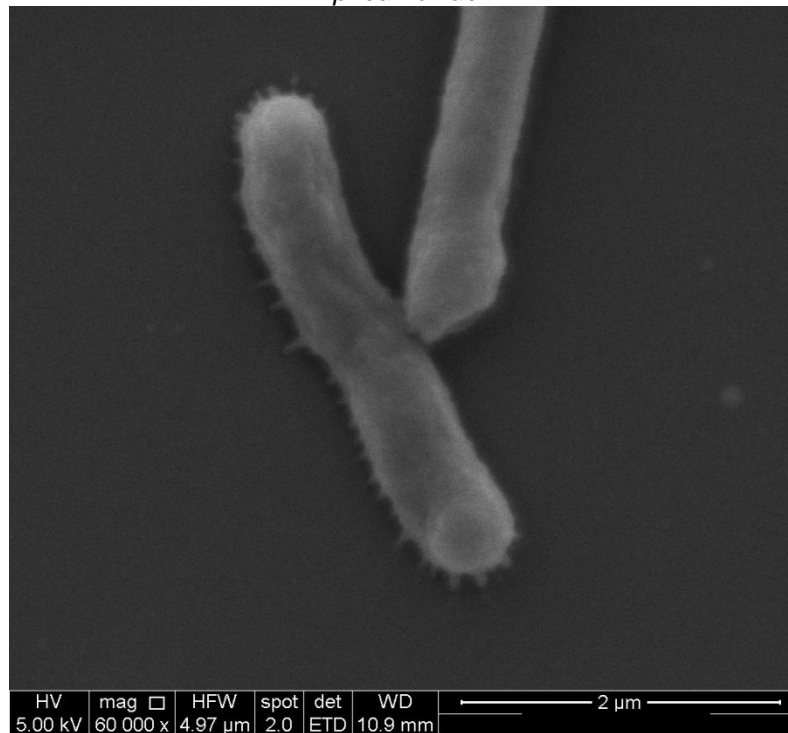
Algumas estirpes de *K. pneumoniae* possuem colônia mucoide de consistência viscosa. Isso pode ser atribuído a presença da proteína RmpA, que é codificada por um gene plasmidial denominado *mpA* que controla positivamente a síntese do polissacarídeo capsular (HSU *et al.*, 2011).

Isolados do sorotipo K1 apresentam uma proteína específica a esse sorotipo denominada de MagA, codificada pelo gene *magA*, que confere um fenótipo de hipermucoviscosidade em isolados de *K. pneumoniae* invasivas (HUNT *et al.*, 2011).

2.7.1.3 Fímbrias

A capacidade de uma bactéria em aderir nas superfícies dos tecidos hospedeiro é importante no desenvolvimento da infecção, sendo as fímbrias as principais responsáveis pela adesão bacteriana (SCHEMBRI *et al.*, 2005). As fímbrias são estruturas proteicas que se organizam em “*motifs* proteicos” localizados na membrana interna do patógeno, projetando-se para o lado citoplasmático da (Figura 7) célula (PODSCHUN; ULLMANN, 1998). Isolados de *K. pneumoniae* produzem dois principais tipos de fímbrias, as fímbrias do tipo 1 (FimH) e as fímbrias do tipo 3 (Mrk) (SCHEMBRI *et al.*, 2005).

Figura 7 - Fímbrias visualizadas por microscopia eletrônica de varredura em isolados de *K. pneumoniae*



Fonte: Elaborado pelo Autor

As fímbrias do tipo 1 são finas, rígidas e estão presentes em quase todos os membros da família Enterobacteriaceae, chegando a cerca de várias centenas de fímbrias na superfície de um único isolado bacteriano (KLEMM; SCHEMBRI, 2000). Esse tipo de fímbria já foi extensamente estudada em *E. coli*, mas pouco em *K. pneumoniae*, apesar da composição genética e regulação gênica serem correspondentes (PODSCHUN; ULLMANN, 1998). A propriedade adesiva da fímbria

do tipo 1 se deve à presença da proteína FimH codificada pelo gene *fimH* que está presente no *cluster fim*, e isolados que apresentam este tipo de fímbria estão mais relacionados com a urovirulência. Elas mediam a adesão aos receptores de manose presentes em diversos tecidos de tecidos humanos e animais, como mucosas ou células epiteliais do trato urinário, respiratório e intestinal (CONEL *et al.*, 1996; SCHEMBRI *et al.*, 2005). Já as fímbrias do tipo 3 são mais espessas e maiores, podendo seu tamanho atingir cerca de 4nm de largura e 2µm de comprimento (KLEMM; SCHEMBRI, 2000). É codificada pelo *cluster mrk*, mas é composta primordialmente por duas proteínas, a MrkA (principal subunidade) e MrkD (adesina). Estudos revelam que a fímbria do tipo 3 está diretamente relacionada com a produção do biofilme bacteriano (SCHEMBRI *et al.*, 2005; STRUVE; KROGFELT, 2003). Biofilmes são matrizes biológicas compostas por uma substância polimérica provenientes de bactérias que se dispõem em comunidades com alto grau de organização. A produção de biofilme é extremamente vantajosa às bactérias, pois oferecem às mesmas, proteção ao seu desenvolvimento favorecendo relações simbióticas mesmo em ambientes não favoráveis (HENNEQUIN *et al.*, 2012). Algumas proteínas que compõe o cluster *mrk* foram identificadas na via de maturação do biofilme em células bacterianas (BRISSE *et al.*, 2009).

2.7.1.4 Sistema de Captação de Ferro

O crescimento de um dado micro-organismo no tecido de seu hospedeiro é limitado pelo sistema imunológico do mesmo e pela quantidade de ferro disponível ao micro-organismo (BRISSE *et al.*, 2009). Em ambientes anaeróbios, o íon ferroso (Fe^{2+}) é prevalente, e o mesmo é importando para dentro das células bacterianas pelas porinas e por sistemas de transporte do tipo ABC. Entretanto em condições aeróbicas, o ferro é encontrado na forma de íon férrico (Fe^{3+}) e a sua entrada na célula requer sistemas específico para a entrada do mesmo (RUSSO *et al.*, 2011).

No hospedeiro, o ferro livre disponível, fator indispensável ao crescimento bacteriano, é baixo, pois geralmente encontra-se ligados a proteínas intracelulares como a hemoglobina, ferritina ou ligadas a proteínas extracelulares como a lactoferrina e transferrina (PODSCHUN; ULLMANN, 1998). Para garantir o suprimento de ferro necessário, algumas bactérias secretam substâncias quelantes, denominadas de sideróforos (do grego sidero = ferro, foros = transportador), que

solubilizam o ferro e auxiliam na importação deste ferro livre para a região citoplasmática do micro-organismo (BRISSE *et al.*, 2009). Os sideróforos apresentam uma afinidade 10 vezes maior aos íons férrico (Fe^{3+}) quando comparada as transferrinas ou lactoferrinas (STUCHI, 2012).

O ferro desempenha papel crucial na regulação de alguns fatores de virulência, entre eles a produção de biofilme. Estudos também relatam que a comunicação entre bactérias denominada de *quorum-sensing* também pode ser influenciada pelos níveis de ferro (BRISSE *et al.*, 2009). Considerando que a presença da molécula de ferro é indispensável para a formação do biofilme bacteriano, a manipulação ou interferência nos sistemas de captação de ferro pode ser uma forma eficaz para erradicar ou minimizar a formação de biofilmes em cepas infecciosas (STUCHI, 2012).

3 JUSTIFICATIVA

3 JUSTIFICATIVA

Isolados de *K. pneumoniae* são responsáveis por diversas infecções, nosocomiais, que dependendo do sítio anatômico afetado e do quadro imunológico do paciente podem comprometer o desfecho clínico do mesmo, ocasionando muitas vezes o óbito. O isolamento de cepas de *K. pneumoniae* produtoras de KPC em unidades hospitalares, dificulta ainda mais o tratamento dos pacientes, já que normalmente isolados que portam o gene *bla_{KPC}* são MDR devido ao acúmulo de diversos mecanismos de resistência. Esses isolados MDR podem ser detectados colonizando pacientes, que servem como reservatórios para o patógeno, podendo esta colonização evoluir para uma infecção. Outro ponto crítico, é que isolados que estão colonizando pacientes também podem estar carreando importantes genes de virulência, o que facilitará a disseminação do mesmo dentro do ambiente nosocomial, podendo ocasionar surtos de infecção hospitalar. O tratamento dessas infecções causadas por patógenos MDR é comprometido, já que há uma diminuição no número de opções terapêuticas, restando muitas vezes antimicrobianos nefrotóxicos, que se utilizados durante um longo período comprometem ainda mais o quadro clínico do paciente.

Diante do exposto, evidencia-se a necessidade da correta identificação dos mecanismos de resistência aos carbapenêmicos e a outras drogas de escolha, além da identificação de determinantes de virulência presentes na população de isolados de *K. pneumoniae* provenientes de pacientes colonizados, pois nos permitirá conhecer os mecanismos de resistência presentes na unidade hospitalar estudada e entender melhor como se dá a interação patógeno-hospedeiro. Desta forma almeja-se o sucesso de futuras condutas terapêuticas empíricas relacionadas a casos de infecção hospitalar, e conseqüentemente, a diminuição dos casos fatais relacionados às condutas errôneas ou tardias.

4 OBJETIVOS

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Caracterização molecular de isolados de *K. pneumoniae* produtores de carbapenemase quanto aos principais mecanismos de virulência e resistência aos antimicrobianos.

4.2 Objetivos Específicos

- a) Determinar o perfil de sensibilidade aos agentes antimicrobianos dos isolados bacterianos;
- b) Determinar a similaridade genética e a relação filogenética entre os isolados;
- c) Identificar os mecanismos de resistência aos β -lactâmicos, quinolonas e aminoglicosídeos presentes nos isolados de *K. pneumoniae* produtores de carbapenemase;
- d) Identificar genes de virulência nos isolados de *K. pneumoniae* inseridos no estudo;
- e) Determinar e caracterizar os principais elementos genéticos móveis associados com os principais genes de resistência detectados ao longo do estudo;
- f) Investigar a capacidade de transferência dos plasmídeos que carregam os principais determinantes de resistência detectados ao longo do estudo;

5 METODOLOGIA

5 METODOLOGIA

5.1 Considerações Éticas

O presente estudo integra um projeto de pesquisa maior denominado “Caracterização de isolados bacterianos multirresistentes a antibióticos na cidade de Recife, PE, Brasil”, aprovado pelo comitê de ética da Universidade de Pernambuco com Parecer de número 265.604 em 7 de maio de 2013, que tem como pesquisador responsável à Prof^a Dra. Márcia Maria Camargo de Moraes.

Declaramos também que durante a realização do estudo não houve contato dos participantes com os pacientes, já que as amostras foram fornecidas pelo laboratório de microbiologia do hospital universitário onde o estudo foi realizado. Em todo caso, foram seguidos os preceitos éticos determinados pelo Conselho Nacional de Saúde através da resolução 196/96 que regulamenta as diretrizes de pesquisas envolvendo seres humanos.

5.2 Linhagens Bacterianas

Seis isolados bacterianos utilizados no presente estudo foram obtidos pelo laboratório de bacteriologia do hospital universitário de onde as amostras foram provenientes, através de cultura de vigilância realizada em pacientes hospitalizados em uma de suas unidades de terapia intensiva durante um surto ocorrido nos dois primeiros dias de Dezembro do ano de 2011. Os isolados foram identificados utilizando técnicas bioquímicas, e posteriormente confirmadas pelo MALDI-TOF MS. A investigação quanto à produção de carbapenemase foi realizada através do teste de Hodge Modificado (ANDERSON *et al.*, 2007). Os isolados foram transferidos para criotubos de conservação (contendo TSB com glicerol 15%) e mantidos congelados a -80°C até seu posterior uso.

5.3 Perfil de Sensibilidade aos Antimicrobianos

A concentração inibitória mínima (CIM) dos agentes antimicrobianos ceftriaxona, ceftazidima, cefepime, cefotaxima, cefalotina, aztreonam,

amoxicilina/ácido clavulânico, amicacina, gentamicina, imipenem, meropenem, ertapenem, ciprofloxacino, gatifloxacino, ácido nalidixico, moxifloxacino, levofloxacino, piperacilina/tazobactam, tigeciclina e polimixina B, foi determinada pelos métodos da microdiluição em caldo e E-test, de acordo com as normas preconizadas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (CLSI, 2012). Os resultados foram interpretados segundo o documento MS23 (CLSI 2013), com exceção dos resultados das CIMs para tigeciclina, que por ausência de breakpoints no CLSI, foram interpretados segundo critérios do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST).

5.4 Tipagem Molecular e Relação Filogenética

A fim de determinar a relação genética entre os isolados bacterianos a técnica de *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) foi realizada. Já para verificar a relação filogenética entre os isolados, o MLST (*Multilocus Sequence Typing*) foi realizado.

5.4.1 Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE)

A técnica de PFGE foi realizada segundo o protocolo de padronização laboratorial para subtipagem molecular da rede PulseNet – USA/CDC, modificada para isolados de *K. pneumoniae*.

Uma suspensão bacteriana em 4mL de caldo TSB (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) foi realizada. Após 16 a 24 horas de incubação a 37°C, os tubos foram centrifugados a 5000rpm durante 15 minutos. Logo em seguida, o centrifugado foi diluído em 1 mL de solução salina (NaCl 0,8%) e transferidos para microtubos de 1,5mL de peso conhecido. Os tubos foram centrifugados a 15000rpm por aproximadamente 30 segundos e o sobrenadante foi cuidadosamente aspirado e desprezado.

Com a finalidade de determinar o peso do centrifugado (células), os tubos foram novamente pesados. O centrifugado foi diluído novamente em solução salina, dessa vez, na proporção 1:1, isto é, o volume de salina acrescentado equivale ao peso da massa celular. Um volume de 5µL dessa suspensão foi transferido para um novo tubo, contendo 300µL do tampão TEM (Tris 100mM, pH 7,5; NaCl 1M; EDTA 0,01M; NaCl 150mM, água destilada). A essa nova solução foi adicionado 340µL de

agarose de baixa temperatura de fusão (low melt) para a formação de pequenos blocos de agarose contendo o DNA cromossômico bacteriano (plugs). Os plugs foram incubados por um período de cinco horas em solução EC (Tris 6mM, pH 7,5; NaCl 1M; EDTA 0,01M; Brij 58 0,5%; Sarcosil 0,5%; Deoxicolato 0,2% e água destilada) à 37°C. Logo após a solução EC foi substituída por uma nova solução, ES (EDTA 0,4M, pH 9,3; Sarcosil 1%) contendo proteinase K (20mg/mL) e uma nova incubação, agora a 50°C foi realizada por um período de 12 horas. Após a incubação, os plugs foram lavados em solução CHEF-TE (Tris 0,1M, pH 7,5; EDTA 0,1M) e armazenados nessa solução até sua posterior digestão.

O DNA bacteriano foi digerido com a enzima de restrição XbaI (New England, Biolab) numa concentração de 10U por amostra durante um período de 12 a 18 horas a 37°C. A eletroforese em campo pulsado foi realizada no sistema CHEF-DR II (Bio-Rad, EUA) e o padrão de variação da corrente elétrica (*switch time*) foi de 5 a 60 segundos. A eletroforese foi realizada por 23 horas, em solução de TBE a 0,5X (Tris 0,089M; Ácido Bórico 0,089M; EDTA 0,002M) a uma temperatura de 13°C e uma corrente elétrica de 200V (6V/cm). O gel foi corado com brometo de etídio (0,08µg/mL) por uma hora, descorado em água destilada também por uma hora e logo após fotografado sob luz ultravioleta.

5.4.2 *Multilocus Sequence Typing* (MLST)

A técnica de MLST foi realizada para a determinação da sequência tipo (ST) dos isolados de *K. pneumoniae* inseridos no estudo. A técnica baseia-se na análise de fragmentos internos de sete genes *housekeeping* dos micro-organismos. Para *K. pneumoniae* a técnica de PCR foi realizada para a amplificação dos seguintes genes: *gapA* (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase), *infB* (fator II da iniciação da tradução), *mdh* (malato desidrogenase), *pgi* (fucose isomerase), *phoE* (fosfoporina E), *rpoB* (subunidade β da RNA polimerase B) e *tonB* (transdutor energético periplasmático). Os primers e condições de ciclagem utilizadas para amplificação destes genes foram obtidos através do site do Instituto Pasteur.

Após a visualização das amplificações gênicas em gel de agarose a 1,2%, os amplicons foram purificados e enviados a sequenciamento. As sequências nucleotídicas obtidas nos permitiram identificar os alelos de cada *locus* e com a combinação dos sete alelos foi possível inferir a sequência tipo (*Sequence Typing*)

dos isolados através da comparação com outras combinações alélicas depositadas no site do Instituto Pasteur.

5.5 Extração do DNA Bacteriano

O DNA genômico dos isolados bacterianos foi extraído seguindo as orientações do fabricante a partir do kit BRAZOL[®] (LGC Biotecnologia). Para isto, uma colônia fresca foi semeada em 2mL de meio Brain Heart Infusion (BHI) acrescido de 2 μ L de ampicilina a 100mg/mL e incubado a 37°C durante 24 horas. No dia seguinte 300 μ L do reagente BRAZOL[®] foram adicionados a 100 μ L do crescimento bacteriano e o sistema, depois de homogeneizado brandamente, foi misturado com 50 μ L de clorofórmio e logo após centrifugado a 12.000rpm a 4°C durante 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e transferido para novos tubos contendo 300 μ L de isopropanol absoluto gelado. Em seguida, o sistema foi novamente centrifugado a 10.000rpm durante 18 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e uma lavagem com 500 μ L de etanol a 95% foi realizada a fim de retirar os vestígios do Isopropanol. Após a evaporação de todo o etanol, 30 μ L de RNase foram adicionados ao sistema e o DNA quantificado por espectrofotometria para utilização nos experimentos de biologia molecular.

5.6 Identificação Molecular de Genes de Resistência e Virulência

Para a identificação molecular dos genes de resistência foi realizada a técnica de PCR. A presença dos genes que conferem resistência aos β -lactâmicos, quinolonas e aminoglicosídeos juntamente com os genes codificadores dos mecanismos de virulência analisados neste estudo foram investigados por PCR.

5.6.1 Condições de PCR

As reações para as PCRs uniplexs foram preparadas para um volume final de 25 μ L contendo 1U de Taq Polimerase (FERMENTAS), Tampão da Taq Polimerase 1X (FERMENTAS), 200 μ M de dNTP (FERMENTAS), 2mM de MgCl₂ (PROMEGA), 0,4 μ M de cada *primer* (Invitrogen) e 20ng do DNA bacteriano. Já para as PCRs

multiplexs, as reações foram preparadas para um volume final de 20µL contendo Master Mix (GoTaq® Green Master MIX, PROMEGA, Madison, EUA), água, DNA e *primers* numa concentração final de 1µM. Os termocicladores MyGENE™ Series Gradient Thermal Cycler (LongGene®), Eppendorf Mastercycle e Eppendorf AG Germany, foram utilizados para a realização das reações.

5.6.1.1 Detecção dos genes de β -lactamase

A investigação dos genes de β -lactamase foi realizada por diferentes PCRs uniplex e multiplex, como descrito no item 5.5. A primeira PCR multiplex investigou a presença dos genes codificadores de CTX-M, pertencentes aos clusters: *bla*_{CTX-M1/2}, *bla*_{CTX-M-8}, *bla*_{CTX-M-14}. Na segunda PCR multiplex, procedeu-se a investigação dos genes *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{GES}. Para a realização das PCRs multiplex, a seguinte ciclagem foi utilizada: 10 minutos a 94°C, 30 ciclos de amplificação contendo: 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 52°C e 1 minuto a 72°C, e 10 minutos a 72°C para extensão final. Os genes codificadores das metalo- β -lactamases (M β L) também foram investigados. Os genes *bla*_{VIM}, *bla*_{SIM}, *bla*_{GIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{NDM}, *bla*_{SPM} foram pesquisados por meio de PCR uniplex. A ciclagem utilizada para a realização da PCR multiplex para a detecção dos genes de M β L foi: 10 minutos a 95°C, 35 ciclos de amplificação contendo: 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 53°C e 1 minuto a 72°C, e 10 minutos a 72°C. PCR para identificação do gene codificador da carbapenemase KPC foi realizada através de PCR uniplex, utilizando a mesma ciclagem descrita para a PCR de MBL. Também foi realizada a pesquisa para os genes codificadores de AmpC plasmidiais, entretanto uma meticulosa metodologia foi utilizada para investigação destes genes. Após o isolamento, as colônias bacterianas frescas foram incubadas em 5mL de TSB acrescido de 5µL de ceftazidima 10µg/mL durante 20 horas com agitação vigorosa e constante. No dia seguinte o crescimento foi transferido para tubos de 1,5mL e centrifugado a 13.000rpm para a formação do sedimento. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspendido em 500µL de água estéril e posteriormente aquecido a 95°C durante 10 minutos. As amostras foram novamente centrifugadas, e 300µL do sobrenadante foram retirados. Um microlitro deste sobrenadante foi utilizado na reação de PCR. Os genes *bla*_{MOX}, *bla*_{CMY}, *bla*_{LAT}, *bla*_{DHA}, *bla*_{ACC}, *bla*_{ACT}, *bla*_{MIR} e *bla*_{FOX} foram investigados. Os *primers* utilizados ao longo das reações citadas anteriormente estão listados no quadro 2.

Quadro 2 - Sequência de *Primers* que serão utilizados para amplificação dos genes de resistência aos β -lactâmicos.

<i>Primer</i>	Sequência de Nucleotídeos (5' → 3')	Alvo	Tamanho do Amplicon (pb)	Referência
MCTX- 1/2-F MCTX- 1/2-R	ATG TGC AGY ACC AGT AA CGC TGC CGG TTT TAT CSC CC	Clusters <i>M1/2</i>	512pb	Este estudo
MCTX-8 F MCTX-8 R	AAC RCR CAG ACG CTC TAC TCG AGC CGG AAS GTG TYA T	Cluster <i>M-8</i>	333pb	Este estudo
MCTX-14 F MCTX-14 R	GGT GAC AAA GAG ART GCA ACG GAT TTA CAG CCC TTC GGC GAT GA	Cluster <i>M-14</i>	876pb	Este estudo
MGES F MGES R	AGC AGC TCA GAT CGG TGT TG CCG TGC TCA GGA TGA GTT G	<i>bla</i> _{GES-like}	750pb	POIREL <i>et al.</i> , 2000
MTEM F MTEM R	CCC TTA TTC CCT TTY TTG CGG AAC CAG CCA GCC WGA AGG	<i>bla</i> _{TEM-like}	650pb	NAGANO <i>et al.</i> , 2004
MSHV F MSHV R	CTT GAC CGC TGG GAA ACG G AGC ACG GAG CGG ATC AAC GG	<i>bla</i> _{SHV-like}	200pb	NAGANO <i>et al.</i> , 2004
KPC F KPC R	TCG CTA AAC TCG AAC AGG TTA CTG CCC GTT GAC GCC CAA TCC	<i>bla</i> _{KPC-like}	785pb	LOMAESTRO <i>et al.</i> , 2006
GIM-F1 GIM-R1	TCA ATT AGC TCT TGG GCT GAC CGG AAC GAC CAT TTG AAT GG	<i>bla</i> _{GIM-1}	72pb	MENDES <i>et al.</i> , 2007
VIMgen-F2 VIMgen-R2	GTT TGG TCG CAT ATC GCA AC AAT GCG CAG CAC CAG GAT AG	<i>bla</i> _{VIM-like}	382pb	MENDES <i>et al.</i> , 2007
SIM-F1 SIM-R1	GTA CAA GGG ATT CGG CAT CG TGG CCT GTT CCC ATG TGA G	<i>bla</i> _{SIM-1}	569pb	MENDES <i>et al.</i> , 2007
SPM-F1 SPM-R1	CTA AAT CGA GAG CCC TGC TTG CCT TTT CCG CGA CCT TGA TC	<i>bla</i> _{SPM-1}	789pb	MENDES <i>et al.</i> , 2007
IMPgen-F1 IMPgen-R1	GAA TAG RRT GGC TTA AYT CTC CCA AAC YAC TAS GTT ATC	<i>bla</i> _{IMP-like}	188pb	MENDES <i>et al.</i> , 2007
Pre-NDM-1 F Pre-NDM-1 R	GGC GTT AGA TTG GCT TAC ACC CTG GGT CGA GGT CAG GAT AG	<i>bla</i> _{NDM-1}	1146pb	Este estudo
CMY – 1F CMY – 1R	GCT GCT CAA GGA GCA CAG GAT CAC ATT GAC ATA GGT GTG GTG C	<i>bla</i> _{MOX1-2} , <i>bla</i> _{CMY1} , <i>bla</i> _{CMY8-11} , <i>bla</i> _{CMY19}	520pb	PÉREZ-PÉREZ; HANSON, 2002
CMY – 2F CMY – 2R	TGG CCA GAA CTG ACA GGC AAA TTT CTC CTG AAC GTG GCT GGC	<i>bla</i> _{CMY2-7} , <i>bla</i> _{CMY12-16} , <i>bla</i> _{CMY18} , <i>bla</i> _{CMY21-24} , <i>bla</i> _{CMY28-33} , <i>bla</i> _{CMY36-37} , <i>bla</i> _{LAT1-4}	464pb	PÉREZ-PÉREZ; HANSON, 2002
DHA – 1F DHA – 1R	AAC TTT CAC AGG TGT GCT GGG T CCG TAC GCA TAC TGG CTT TGC	<i>bla</i> _{DHA-1-3}	405pb	PÉREZ-PÉREZ; HANSON, 2002
AAC – F AAC – R	AAC AGC CTC AGC AGC CGG TTA TTC GCC GCA ATC ATC CCT AGC	<i>bla</i> _{ACC1-2}	346pb	PÉREZ-PÉREZ; HANSON, 2002
MAC – F MAC – R	TCG GTA AAG CCG ATG TTG CGG CTT CCA CTG CGG CTG CCA GTT	<i>bla</i> _{MIR1-4} , <i>bla</i> _{ACT1-3}	302pb	PÉREZ-PÉREZ; HANSON, 2002
FOX – F FOX – R	AAC ATG GGG TAT CAG GGA GAT G CAA AGC GCG TAA CCG GAT TGG	<i>bla</i> _{FOX1-7}	190pb	PÉREZ-PÉREZ; HANSON, 2002

Fonte: Elaborada pelo autor

Nota: Os primers desenhados para este estudo foram cedidos e tiveram suas reações padronizadas pelo laboratório ALERTA/UNIFESP.

5.5.1.2 Detecção dos Genes de Resistência às Quinolonas.

Para a detecção dos genes de resistência às quinolonas foi realizada uma PCR multiplex (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*) como proposto por Cattoir *et al.* (2007) e duas PCRs uniplex (*qnrC*, *qnrD*), utilizando *primers* específicos (Quadro 3).

Quadro 3 - *Primers* utilizados para amplificação dos determinantes de resistência plasmídias às quinolonas.

<i>Primer</i>	Sequência de Nucleotídeos (5' →3')	Alvo	Tamanho do Amplicon (pb)	Referência
<i>qnrA</i> - F <i>qnrA</i> – R	AGA GGA TTT CTC ACG CCA GG TGC CAG GCA CAG ATC TTG AC	<i>qnrA</i>	580pb	CATTOIR <i>et al.</i> , 2007
<i>qnrB</i> – F <i>qnrB</i> – R	GGM ATH GAA ATT CGC CAC TG TTT GCY GYY CGC CAG TCG AA	<i>qnrB</i>	264pb	CATTOIR <i>et al.</i> , 2007
<i>qnrS</i> – F <i>qnrS</i> – R	GCA AGT TCA TTG AAC AGG GT TCT AAA CCG TCG AGT TCG GCG	<i>qnrS</i>	428pb	CATTOIR <i>et al.</i> , 2007
<i>qnrC</i> – F <i>qnrC</i> – R	.GGG TTG TAC ATT TAT TGA ATC TCC ACT TTA CGA GGT TCT	<i>qnrC</i>	447pb	WANG <i>et al.</i> , 2009
<i>qnrD</i> – F <i>qnrD</i> – R	CGA GAT CAA TTT ACG GGG AAT A AAC AAG CTG AAG CGC CTG	<i>qnrD</i>	582pb	CAVACO <i>et al.</i> , 2009
<i>qepA</i> – F <i>qepA</i> – R	CGT GTT GCT GGA GTT CTT C CTG CAG GTA CTG CGT CAT G	<i>qepA</i>	403pb	POIREL <i>et al.</i> , 2011
<i>Aac(6')</i> lb -F <i>Aac(6')</i> lb-R	TTG CGA TGC TCT ATG AGT GGC TA CTC GAA TGC CTG GCG TGT TT	<i>aac(6')-lb</i>	482pb	POIREL <i>et al.</i> , 2011
<i>oqxA</i> - F <i>oqxA</i> –R	CTT GCA CTT AGT TAA GCG CC GAG GTT TTG ATA GTG GAG GTA GG	<i>oqxA</i>	868pb	LIU <i>et al.</i> , 2011
<i>oqxB</i> – F <i>oqxB</i> –R	GCG GTG CTG TCG ATT TTA TAC CGG AAC CCA TCT CGA T	<i>oqxB</i>	787pb	LIU <i>et al.</i> , 2011

Fonte: Elaborado pelo autor

As condições utilizadas para ambas as PCRs são as descritas em 5.4.1. Para a PCR multiplex foi utilizado a seguinte ciclagem: 10 minutos a 95°C, 35 ciclos de amplificação contendo: 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 54°C e 1 minuto a 72°C, e por fim 10 minutos a 72°C. Já para as PCRs uniplex foram utilizadas as mesmas condições com alterações em sua temperatura de anelamento, sendo respectivamente 52°C, 56°C para os genes *qnrC*, *qnrD*. Já para a investigação dos genes *qepA* e *aac(6')-lb* PCRs uniplex foram realizadas seguindo a mesma ciclagem utilizada para a investigação dos genes *qnr* entretanto com temperatura de anelamento de 53°C e 58°C, respectivamente.

Para amplificação dos genes *oqxA* e *oqxB*, PCRs uniplex foram realizadas utilizando as seguintes condições de ciclagem: 10 minutos a 95°C, 30 ciclos de amplificação contendo: 1 minuto a 95°C, 45 segundos a 60°C e 1 minuto a 72°C, e por fim 10 minutos a 72°C.

5.6.1.3 Amplificação da região QRDR dos genes *gyrA* e *parC*

Os primers *gyrA*-F 5'-TGCCAAGGCATCCACC-3', *gyrA*-R 5'-TGCCAAGGCATCCACC-3', *parC*-F 5'-TGCCAAGGCATCCACC-3' e *parC*-R 5'-TGCCAAGGCATCCACC-3' foram utilizados para amplificar a região QRDR dos genes cromossômicos *gyrA* e *parC* segundo Mammeri *et al.* (2005). A amplificação da região QRDR destes genes (aproximadamente 400 pb) foi iniciada pela desnaturação a 95°C durante 5 minutos, seguida por 30 ciclos de 95°C por 1 minuto, 55°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e extensão final a 72°C por 10 minutos.

5.6.1.4 Investigação das metilases

Os genes codificadores das 16S rRNA metiltransferases foram investigados a fim de justificar a resistência aos aminoglicosídeos. PCR multiplex para os genes codificadores das metilases ArmA, NpmA, RmtA, RmtB, RmtC, RmtD foi realizada utilizando a seguinte ciclagem: 94°C durante 5 minutos seguido de 35 ciclos de 94°C por 20 segundos, 52°C por 45 segundos, 72°C por 30 segundos e por fim 72°C durante 10 minutos. Os primers utilizados para a investigação das metilases estão contidos na quadro 4.

Quadro 4 - *Primers* utilizados para investigação dos genes codificadores das metiltransferases.

Primer	Sequência de Nucleotídeos (5' →3')	Alvo	Tamanho do Amplicon (pb)	Referência
rmtA- F rmtA – R	CTA GCG TCC ATC CTT TCC TC TTG CTT CCA TGC CCT TGC C	<i>rmtA</i>	315pb	DOI E ARAKAWA, 2007
rmtB – F rmtB – R	GCT TTC TGC GGG CGA TGT AA ATG CAA TGC CGC GCT CGT AT	<i>rmtB</i>	173pb	DOI E ARAKAWA, 2007
rmtC – F rmtC – R	CGA AGA AGT AAC AGC CAA AG ATC CCA ACA TCT CTC CCA CT	<i>rmtC</i>	711pb	DOI E ARAKAWA, 2007
rmtD – F rmtD – R	CGG CAC GCG ATT GGG AAG C CGG AAA CGA TGC GAC GAT	<i>rmtD</i>	401pb	DOI E ARAKAWA, 2007
armA – F armA – R	ATT CTG CCT ATC CTA ATT GG ACC TAT ACT TTA TCG TCG TC	<i>armA</i>	635pb	DOI E ARAKAWA, 2007
npmA – F npmA – R	GGA GGG CTA TCT AAT GTG GT GCC CAA AGA GAA TTA AAC TG	<i>npmA</i>	386pb	Este estudo

Fonte: Elaborado pelo autor

5.6.1.5 Caracterização dos Elementos Genéticos

Devido a grande associação dos genes de resistência com elementos genéticos móveis do DNA, realizamos a investigação da presença e da associação dos elementos genéticos (integron e transposon) com os principais genes de resistência detectados ao longo do estudo. A presença do integron de classe 1, assim como a caracterização do conteúdo (cassetes gênicos) contido na região variável do integron foram investigadas utilizando os *primers* específicos, seguido por sequenciamento. A relação do *Tn4401* com o *bla*_{KPC}, assim como o mapeamento das regiões que flanqueiam o mesmo foi investigada por PCR seguida de sequenciamento utilizando combinações de *primers* contidos no quadro 5.

Quadro 5 - Primers utilizados para detecção e mapeamento do integron de classe 1 e do *Tn4401*.

Primer	Sequência de Nucleotídeos (5' →3')	Alvo	Referência
Int1-F Int1-R	GGT CAA GGA TCT GAA TTT CG ACA TGC GTG TAA ATC GTC	<i>int1</i>	MAZEL <i>et al.</i> , 2000
5' CS 3'CS	GGC ATC CAA GCA GCA AG AAG CAG ACT TGA CCT GA	Cassetes gênicos	LÉVESQUE <i>et al.</i> , 1995
Sul1-F Sul1-R	TGG TGA CGG TGT TCG GCA GCG AAG GTT TCC GAG AAG GTG	3'CS (gene <i>sul1</i>)	POWER <i>et al.</i> , 2005
qacEΔ1F qacEΔ1B	ATC GCA ATA GTT GGC GAA GT CAA GCT TTT GCC CAT GAA GC	3'CS (gene <i>qacEΔ1</i>)	POWER <i>et al.</i> , 2005
F12D F12R	GTA TTG CGC CGC TCT TAG AC AAA CCA GCA TGG TTG GCT AC	<i>sul1+</i> <i>ISCR1</i>	POWER <i>et al.</i> , 2005
Tn7 Tn8	CCT CGC TGT GCT TGT CAT CC TGA CCC TGA GCG GCG AAA GC	<i>bla_{KPC}</i> + <i>ISKpn7</i>	NAAS <i>et al.</i> , 2008
Tn4401F Tn4401R	CTG TCT TGT CTC TCA TGG CC GAA GAT GCC AAG GTC AAT GC	<i>bla_{KPC}</i> + <i>ISKpn6</i>	NAAS <i>et al.</i> , 2008
ISKpn8F ISKpn8 R	TGG CCA GGA TGT ACA ACG TC TTA CGT AGA TCC GAG ACA CC	<i>ISKpn8</i>	SHEN <i>et al.</i> , 2009

Fonte: Elaborado pelo autor

5.6.1.6 Amplificação dos Genes de Virulência

Diferentes genes de virulência foram investigados ao longo do estudo por PCRs que serão realizadas como descrito no item 5.4.1. A detecção dos antígenos capsulares mais prevalentes em isolados nosocomiais, K1 e K2, foi realizada a fim de classificar os isolados de *K. pneumoniae* em K1, K2 ou não K1/K2. As fímbrias do tipo 1 e 3, foram investigadas através da amplificação dos genes codificadores da porção funcional de ambas as fímbrias (fimH - fímbria do tipo I, mrkD - fímbria do tipo 3). A investigação dos genes *rmpA* e *magA*, relacionados com o fenotípico de mucoviscosidade, *Kfu*, relacionado com o sistema de captação de ferro (sideróforo), *wabG*, relacionado com a biossíntese do LPS (Lipopolissacarídeo) e *uge*, relacionado com o operon da urease, foi realizada utilizando iniciadores contidos no quadro 6.

Quadro 6 - Primers utilizados na investigação dos genes de virulência.

Primer	Sequência de Nucleotídeos (5' →3')	Gene	Referência
magA - F magA - R	GGT GCT CTT TAC ATC ATT GC GCA ATG GCC ATT TGC GTT AG	<i>maga</i>	FANG <i>et al.</i> , 2004
mrkD-1 mrkD-2	TAT YGK CTT AAT GGC GCT GG TAA TCG TAC GTC AGG TTA AAG AYC	<i>mrkD</i>	BRISSE <i>et al.</i> , 2009
KfuBC - F KfuBC - R	GAA GTG ACG CTG TTT CTG GC TTT CGT GTG GCC AGT GAC TC	<i>Kfu</i>	MA <i>et al.</i> , 2005
fimH - F fimH - R	GCT CTG GCC GAT ACY ACS ACG G GCR WAR TAA CGY GCC TGG AAC	<i>fimH</i>	BRISSE <i>et al.</i> , 2009
K2_F K2_R	GAC CCG ATA TTC ATA CTT GAC AGA G CCT GAA GTA AAA TCG TAA ATA GAT GGC	<i>Wxy</i>	TURTON <i>et al.</i> , 2010
wabG - F wabG - R	ACC ATC GGC CAT TTG ATA GA CGG ACT GGC AGA TCC ATA TC	<i>wabG</i>	IZQUIERDO <i>et al.</i> , 2003
uge - F uge - R	GAT CAT CCG GTC TCC CTG TA TCT TCA CGC CTT CCT TCA CT	<i>Uge</i>	REGUE <i>et al.</i> , 2001
rmpA - F rmpA -R	AGT TAA CGT GAC TAC CTC TGT TTC TAC TTG GCA TGA GCC ATC TTT	<i>rmpA</i>	HSU <i>et al.</i> , 2011

Fonte: Elaborado pelo autor

5.7 Purificação e Sequenciamento dos Produtos de PCR

A purificação dos produtos obtidos a partir das PCRs realizadas ao longo do estudo foram realizadas utilizando Fenol. Para isto, foram adicionados 40µL de água dEPC (água livre de nucleasse) a 10µL do produto de PCR. O sistema foi homogeneizado e logo após 50µL de Fenol-Clorofórmico IAA na proporção de 1:1 foi adicionado ao sistema, que foi homogeneizado brandamente e centrifugado por 5 minutos a 4°C a 10.000rpm. Cerca de 30µL obtidos do sobrenadante foi precipitado em novos tubos contendo 90µL e 35µL de etanol 100% e isopropanol absoluto, respectivamente. Os tubos foram homogeneizados gentilmente e mantidos a -20°C por 18-20 horas.

Após este período, os tubos foram novamente homogeneizados e centrifugados por 15 minutos a 4°C a 12.000rpm. Logo após, o sobrenadante foi desprezado e lavado com aproximadamente 100µL de etanol gelado a 75%. Novamente o sistema foi centrifugado por 5 minutos a 12.000rpm, e o sobrenadante foi desprezado. Os tubos serão deixados invertidos em repouso, até a evaporação completa do etanol. Por fim, o DNA purificado foi ressuspensão em 10µL de água dEPC e enviado ao sequenciamento.

Os produtos de amplificação purificados foram submetidos a sequenciamento, utilizando o sequenciador 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). As sequências obtidas foram alinhadas e analisadas no programa BioEdit e comparadas a sequências disponíveis no GenBank.

5.8 Extração do DNA Plasmidial

Para a extração do DNA plasmidial, as linhagens foram cultivadas durante 16 horas a 37°C em Ágar Müeller-Hinton (MH) acrescido de ampicilina a 100 µg/mL. A extração plasmidial foi realizada segundo a metodologia proposta por Kieser (1984). Uma colônia da bactéria testada foi suspensa e homogeneizada em 500 µL da solução de Kieser (Sacarose 0,3 M, Tris-HCl 25 mM pH=8,0, EDTA 25 mM pH=8,0, verde de bromocresol 0,02%) adicionados previamente em tubos de 1,5 mL. A esta suspensão foi adicionado 250µL da solução de lise (NaOH 2N, SDS 10%) preparada no momento do uso. O sistema foi homogeneizado delicadamente por inversão de 6 a 8 vezes. Os tubos foram incubados em banho de água a 55°C durante 30 minutos. Após a incubação, os tubos foram deixados em temperatura ambiente durante 5 minutos, e logo após adicionou-se 250 µL de Fenol-Clorofórmio IAA seguido de uma agitação vigorosa. Os tubos foram centrifugados por 12 minutos a 4°C a uma rotação de 12.000 rpm. O sobrenadante foi retirado submetido à corrida eletroforética em gel de agarose a 0,7% durante três horas a 70V e 50 mA. As cepas *E. coli* 50192, *E. coli* 50193 e *E. coli* Top10 foram utilizadas como padrão de comparação para a determinação do tamanho dos plasmídeos presentes nos isolados de *K. pneumoniae*.

A extração dos plasmídeos também foi realizada pelo Kit da Qiagen utilizando o protocolo para Mini-Prep, a fim de se obter uma melhor visualização dos plasmídeos de baixo peso molecular. As etapas da extração foram realizadas segundo a recomendação do fabricante.

5.9 Transferência de Genes Plasmidiais de Resistência

5.9.1 Conjugação Bacteriana

Experimentos de conjugação foram realizados a fim de investigar a presença de plasmídeos conjugativos nos isolados e auxiliar na localização plasmidial dos principais genes de resistência. As análises foram feitas utilizando o meio Luria-Bertani (LB) e a *E. coli* J53(resistente a azida) como célula receptora. Culturas das células doadoras e receptoras foram misturadas, em fase logarítmica de crescimento, na proporção de 4:1. O sistema foi brandamente homogeneizado durante 3 horas. Após esta etapa 200µL do produto obtido foi semeado em placas de Chromágar (Oxoid) com azida e ampicilina ambas a uma concentração de 100µg/mL. As placas foram incubadas em estufa microbiológica a 37°C durante 16 horas. Nos isolados KPN535 e KPN537 a seleção ocorreu com acréscimo também de ciprofloxacino a uma concentração de 0,125µg/mL, visto que também se esperava transferir determinantes de resistência as quinolonas.

5.9.2 Transformação Bacteriana

Os experimentos de transformação bacteriana foram realizados já que em dois dos isolados do estudo os experimentos conjugação falharam. Os ensaios de transformação foram realizados por eletroporação, utilizando a célula receptora *E. coli* DH5α eletrocompetente previamente preparada. Foi misturado às células eletrocompetentes três microlitros da extração plasmidial. A mistura foi homogeneizada e transferida para uma cubeta de eletroporação, que foi submetida a pulso elétrico. Logo após, 1 mL de meio SOC (Invitrogen Carlsbad, USA) foi adicionado a cubeta que foi incubada em estufa microbiológica a 37°C durante 1 hora, para uma fase de recuperação celular. Em seguida, 200µL do caldo foram inoculados e placas de MacConkey (Oxoid) que continha 100µg/mL de ampicilina e incubadas a 37°C em estufa microbiológica durante 16 horas.

5.10 Localização dos Genes de Resistência

5.10.1 Southern Blot

A técnica de Southern Blot foi utilizada a fim de investigar a localização do gene *bla_{KPC-2}* e *qnrB19* nos diferentes plasmídeos detectados nos isolados bacterianos. Desta forma a primeira etapa consistiu na realização da extração e corrida do DNA plasmidial. Esta etapa foi realizada como mencionado no item 5.6. Após a eletroforese, realizou-se lavagens no gel com HCl 0,25M por cerca de 10 minutos, seguida de uma lavagem rápida com água destilada e por fim uma nova lavagem com NaOH 0,4N por 20 minutos. Após a desnaturação e neutralização, o DNA plasmidial foi transferido para uma membrana Hybond-N⁺ (Amersham Bioscience) com o auxílio de um sistema de transferência utilizando o tampão SCC 2X (NaCl 3M, Citrato de Sódio, NaOH 10M). A reação de hibridização foi realizada sobre a membrana com uma sonda construída para o gene *bla_{KPC}* e *qnrB* a partir do produto de PCR realizado com DNA extraído de um controle positivo.

5.10.2 PCR dos Transconjugantes/Transformantes

Para a investigação dos genes de resistência plasmidiais que foram transferidos por conjugação/transformação, PCRs para os genes de β -lactamase detectados nos isolados selvagens e para o integron foram realizados nos transconjugantes/transformantes. A extração do DNA genômico foi realizada como já descrito no tópico 5.3 e as reações de PCR foram montadas como descrito no tópico 5.4.1.

5.11 Análise do Grupo de Incompatibilidade Plasmidial

A identificação dos grupos de incompatibilidade dos plasmídeos dos transformantes/transconjugantes, foi realizada pela técnica de *Replicon Typing*, desenvolvida pela Carattoli *et al.*, 2005 e Gotz *et al.*, 1996. A técnica baseou-se na amplificação por PCR da origem de replicação de plasmídeos pertencentes a diferentes grupos de incompatibilidade. Para isso foram realizadas cinco PCRs multiplex e seis PCRs uniplex, com *primers* específicos para as diferentes origens de replicação.

As condições de ciclagem foram 5 minutos a 94°C, seguidos de 35 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 94°C, 1 minuto de anelamento com a temperatura específica de cada iniciador utilizado na reação (Quadro 7) e 1 minuto de extensão a

72°C. A extensão final foi realizada por 10 minutos a uma temperatura de 72°C. Os produtos amplificados foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose a 1,5%.

Quadro 7 - Grupos de incompatibilidade, sequências dos primers, temperaturas de anelamento e seus respectivos tamanhos de amplicon dos iniciadores utilizados para a tipagem plasmidial das amostras estudadas. (Continua)

Grupo de Incompatibilidade	Primers	Sequência (5'-3')	Tamanho do amplicon (pb)	Temperatura de anelamento	Referência
HI 1	HI1 FW	GGAGCGATGGATTACTTCAGTAC	471	60° C	CARATOLLI <i>et al</i> , 2005
	HI1 RV	TGCCGTTTCACCTCGTGAGTA			
HI 2	HI2 FW	TTTCTCCTGAGTCACCTGTTAACAC	644	60° C	CARATOLLI <i>et al</i> , 2005
	HI2 RV	GGCTCACTACCGTTGTCATCCT			
I 1	I1 FW	CGAAAGCCGGACGGCAGAA	139	60° C	CARATOLLI <i>et al</i> , 2005
	I1 RV	TCGTCGTTCCGCCAAGTTCGT			
X	X FW	AACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGAT	376	60° C	CARATOLLI <i>et al</i> , 2005
	X RV	TGAGAGTCAATTTTTATCTCATGTTTTA GC			
L/M	L/M FW	GGATGAAAACATCAGCATCTGAAG	785	60° C	CARATOLLI <i>et al</i> , 2005
	L/M RV	CTGCAGGGGCGATTCTTTAGG			
N	N FW	GTCTAACGAGCTTACCGAAG	559	60° C	CARATOLLI <i>et al</i> , 2005
	N RV	GTTTCAACTCTGCCAAGTTC			
FIA	FIA FW	CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG	462	60° C	CARATOLLI <i>et al</i> , 2005
	FIA RV	GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG			
FIB	FIB FW	GGAGTTCTGACACACGATTTTCTG	702	60° C	CARATOLLI <i>et al</i> , 2005
	FIB RV	CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT			
W	W FW	CCTAAGAACAACAAGCCCCCG	242	60° C	CARATOLLI <i>et al</i> , 2005
	W RV	GGTGCGCGGCATAGAACCGT			
Y	Y FW	AATTCAAACAACACTGTGCAGCCTG	765	60° C	CARATOLLI <i>et al</i> , 2005
	Y RV	GCGAGAATGGACGATTACAAAACCTT			

Tabela 6 - Continuação.

Grupo de Incompatibilidade	Primers	Sequência (5'-3')	Tamanho do amplicon (pb)	Temperatura de anelamento	Referência
P	P FW	CTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAA	534	60° C	CARATOLLI <i>et al.</i> , 2005
	P RV	TCACGCGCCAGGGCGCAGCC			
FIC	FIC FW	GTGAACTGGCAGATGAGGAAGG	262	60° C	CARATOLLI <i>et al.</i> , 2005
	FIC RV	TTCTCCTCGTCGCCAAACTAGAT			
A/C	A/C FW	GAGAACCAAAGACAAAGACCTGGA	465	60° C	CARATOLLI <i>et al.</i> , 2005
	A/C RV	ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTT			
T	T FW	TTGGCCTGTTTGTGCCTAAACCAT	750	60° C	CARATOLLI <i>et al.</i> , 2005
	T RV	CGTTGATTACACTTAGCTTTGGAC			
FIIAs	FIIs FW	CTGTCGTAAGCTGATGGC	270	60° C	CARATOLLI <i>et al.</i> , 2005
	FIIs RV	CTCTGCCACAACTTCAGC			
F _{repB}	F _{repB} FW	TGATCGTTTAAGGAATTTTG	270	52° C	CARATOLLI <i>et al.</i> , 2005
	F _{repB} RV	GAAGATCAGTCACACCATCC			
K	K/B FW	GCGGTCCGAAAGCCAGAAAAC	160	60° C	CARATOLLI <i>et al.</i> , 2005
	K RV	TCTTTCACGAGCCCGCCAAA			
B/O	K/B FW	GCGGTCCGAAAGCCAGAAAAC	159	60° C	CARATOLLI <i>et al.</i> , 2005
	B/O RV	TCTGCGTTCGCCAAGTTCGA			
Q	<i>repB</i> 1	TCGTGGTCGCGTTCAAGGTACG	1.160	62° C	GÖTZ <i>et al.</i> , 1996
	<i>repB</i> 2	CTGTAAGTCGATGATCTGGGCGTT			
	<i>oriV</i> 1	CTCCCGTACTAACTGTCACG	436	57° C	GÖTZ <i>et al.</i> , 1996
	<i>oriV</i> 2	ATCGACCGAGACAGGCCCTGC			
	<i>oriT</i> 1	TTCGCGCTCGTTGTTCTTCGAGC	191	57° C	GÖTZ <i>et al.</i> , 1996
<i>oriT</i> 2	GCCGTTAGGCCAGTTTCTCG				

Fonte: Elaborado pelo autor

5.12 Análise da Permeabilidade de Membrana Externa

A fim de investigar a hipótese de que uma diminuição na expressão das principais porinas de membrana externa em *K. pneumoniae* (OmpK35 e OmpK36), foi também responsável pela resistência aos carbapenêmicos, foi realizada aténica de SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) das proteínas de membrana externa do isolados avaliados.

5.12.1 Extração das Proteínas de Membrana Externa

A extração de proteínas de membrana externa (OmpKs) foi realizada segundo protocolo estabelecido por Martinez-Martinez *et al.* (2008), com algumas modificações. Inicialmente duas colônias frescas foram semeadas em 15mL de caldo LB e mantidas *overnight* a 37°C sob agitação. No dia seguinte, foram transferidos cerca de 10mL do crescimento bacteriano para novos tubos e o sistema foi centrifugado a 4.000rpm por 15 minutos a 4°C, a fim de se obter o pellet com o crescimento bacteriano. O sobrenadante foi eliminado, e o sedimento foi lizado com 1mL de Tris-Mg Buffer.

Após a lise, as células foram sonicadas por cinco ciclos de 30 segundos (parando 2 segundos a cada 10 segundos) e logo após, centrifugadas a 17.000rpm por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento suspenso em 800µL de sarcosil a 2%. O sistema permaneceu em repouso durante 30 minutos a temperatura ambiente, e logo após, centrifugado novamente a 17.000rpm por 30 minutos a 4°C.

Mais uma vez o sobrenadante foi descartado, o sedimento lavado com 1mL de Tris-Mg Buffer e novamente centrifugado a 17.000rpm a 4°C durante 30 minutos. Por fim, eliminou-se o sobrenadante, e mais uma vez um o sedimento foi ressuspendido em 30µL de Tris-Mg Buffer.

Antes da realização da SDS-PAGE, as amostras foram quantificadas utilizando a solução de Bradford e suas concentrações igualadas, baseando na amostra menos concentrada.

5.12.2 Análise dos Genes Codificadores das Principais Porinas em *K. pneumoniae*

A investigação de mutações na sequência nucleotídica dos genes codificadores das porinas, OmpK35, OmpK36 e OmpK37 foi realizada através de PCR seguida de sequenciamento com os *primers* listados no quadro 8. Para a amplificação dos genes *ompk35* e *ompk36* foram utilizados *primers* que também anelavam na região *upstream* e *downstream* aos respectivos genes. *Primers* internos foram confeccionados a fim de obter uma melhor qualidade no sequenciamento, visto que os genes amplificados apresentavam tamanho maior que 2 Kb.

Quadro 8 - *Primers* utilizados para amplificação e sequenciamento dos genes das principais porinas em *K. pneumoniae*.

<i>Primer</i>	Sequência de Nucleotídeos (5' →3')	Gene	Ta(°C)	Finalidade	Referência
Pré-OmpK35-F1	GGA TGG AAA GAT GCC TTC AGGCA	Contexto <i>ompk35</i>	58°C	PCR	Este Estudo
Pré-OmpK35-F2	AAT GAG GGT AAT AAA TAA TGA TGA AGC				
OmpK35-F	TGA TGA AGC GCA ATA TTC TGG	<i>ompK35</i>	59°C	PCR e Sequenciamento	Este Estudo
OmpK35-R	CCA GCC GCT TTG GTG TAA T				
OmpK35R Int	CTG AAG CCG TCG CCA TTC TG	<i>ompK35</i>	-	Sequenciamento	Este Estudo
OmpK36 FF	TTG TTG GAT TAT TCT GCA TTT TG	Contexto <i>ompK36</i>	60°C	PCR	Este Estudo
OmpK36 FR	TCT TAC CAG GGC GAC AAG AG				
OmpK36F Int	ACG ACG TAA CGT CCT GGA CC	<i>Ompk36</i>	-	Sequenciamento	Este Estudo
OmpK36R Int	CAG CAC TGA TGC CAT CAT AG				
OmpK-36_ext_R	CGA GGC TCC TCT TAC CAG GGC G	<i>Ompk36</i>	-	Sequenciamento	Este Estudo
OmpK37 F	CAT TCC GCA GAA TGA GAC GGC AAC	<i>Ompk37</i>	56°C	PCR e Sequenciamento	ANDERSON <i>et al.</i> , 2007
OmpK37 R	CGA CGA TGT TAT CGG TAG AGA TAC				

Fonte: Elaborado pelo autor

Nota: Os primers desenhados para este estudo foram cedidos e tiveram suas reações padronizadas pelo laboratório ALERTA/UNIFESP.

6 RESULTADOS

6 RESULTADOS

6.1 Características Fenotípicas e de Isolamento das *K. pneumoniae*

Dos isolados bacterianos fornecidos pelo setor de bacteriologia do Hospital Universitário Oswaldo Cruz, referentes a patógenos recuperados de pacientes hospitalizados em uma de suas UTIs no período de dezembro de 2011, seis apresentaram identificação bioquímica confirmada como *K. pneumoniae*. Os demais isolados, não- *K. pneumoniae*, não foram inseridos no estudo, já que o principal objetivo deste trabalho foi a caracterização molecular de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemase. Todos isolados de *K. pneumoniae* apresentaram teste de Hodge modificado positivo, sugerindo a possível produção de carbapenemase.

6.2 Avaliação da Sensibilidade aos Antimicrobianos

De acordo com os pontos de corte estabelecidos pelo CLSI para, os isolados estudados apresentavam um fenótipo MDR, com sensibilidade de 100% apenas à amicacina, à tigeciclina e à polimixina B. Os valores da CIM de cada antimicrobiano testado estão demonstrados na tabela 1. Dentre os antimicrobianos β -lactâmicos, altas CIMs para as cefalosporinas foi observada. Os isolados KPN531 e KPN532 apresentaram CIM para ceftazidima (cefalosporina de 3^a geração) inferiores aos demais isolados. Resistência aos β -lactâmicos na presença dos inibidores de β -lactamase também foi observada. Amoxicilina/ácido clavulânico e piperacilina/tazobactam foram testados nos isolados, apresentando CIMs iguais ou superiores a 256 $\mu\text{g/mL}$ para as duas combinações analisadas. A resistência aos antimicrobianos quinolônicos foi observada, apresentando valores elevados de CIM para as diferentes gerações de quinolonas analisadas. Os isolados KPN535 e KPN537 quando comparados aos demais isolados apresentaram CIMs superiores a pelo menos duas das quinolonas testadas (gatifloxacina e levofloxacina). O perfil de sensibilidade aos aminoglicosídeos revelou a sensibilidade à amicacina (16 $\mu\text{g/mL}$) e à gentamicina em quatro dos seis isolados (0,25 $\mu\text{g/mL}$), apresentando apenas a KPN535 e KPN537 resistência à gentamicina (64 $\mu\text{g/mL}$).

Tabela 1 - Perfil de sensibilidade dos isolados clínicos de *K. pneumoniae* (KPN 529 a KPN537) produtores de carbapenemase e seus respectivos transformantes/transconjugantes (TC KPN529, TC KPN530, TC KPN535, TC KPN537 ; TF KPN531 e TF KPN532) .

Isolados	Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)																			
	AMK*	GEN	AM/CL	CEF	FEP	CTX	CAZ	CRO	PIP/TZ	AZT	MER	ETP*	IPM	NAL	GAT	LVX	CIP	MOX*	TG	POLB
KPN529	1,5(S)	0,25(S)	>256(R)	>512(R)	>512(R)	>256(R)	256(R)	>128(R)	>512(R)	>256(R)	>16(R)	16(R)	>64(R)	>512(R)	16(R)	32(R)	>32(R)	16	0,5(S)	0,125(S)
TC KPN529	ND	0,5(S)	128(R)	>512(R)	32(R)	>256(R)	16(R)	>128(R)	256(R)	128(R)	4(R)	4(R)	32(R)	16(S)	32(R)	16(R)	≤0,03(S)	8	0,06(S)	0,06(S)
KPN530	1,5 (S)	0,25(S)	>256(R)	>512(R)	512(R)	>256(R)	128(R)	>128(R)	512(R)	>256(R)	>16(R)	16(R)	64(R)	>512(R)	16(R)	32(R)	>32(R)	16	0,5(S)	0,25(S)
TC KPN530	ND	0,5(S)	128(R)	>512(R)	32(R)	>256(R)	16(R)	>128(R)	256(R)	64(R)	4(R)	1(I)	16(R)	16(S)	32(R)	16(R)	≤0,03(S)	8	0,06(S)	0,06(S)
KPN531	8 (S)	0,25(S)	256(R)	>512(R)	>512(R)	>256(R)	64(R)	>128(R)	256(R)	>256(R)	>16(R)	4(R)	16(R)	256(R)	32(R)	32(R)	>32(R)	>32	1(S)	0,125(S)
TF KPN531	ND	0,5(S)	128(R)	256(R)	16(R)	>256(R)	16(R)	>128(R)	256(R)	128(R)	1(S)	1(I)	8(R)	16(S)	16(R)	16(R)	≤0,03(S)	8	0,125(S)	0,06(S)
KPN532	8(S)	0,25(S)	256(R)	>512(R)	>512(R)	>256(R)	64(R)	>128(R)	512(R)	>256(R)	>16(R)	4(R)	16(R)	256(R)	32(R)	32(R)	>32(R)	>32	1(S)	0,125(S)
TF KPN532	ND	0,5(S)	64(R)	256(R)	16(R)	>256(R)	16(R)	>128(R)	256(R)	128(R)	1(S)	1(I)	8(R)	16(S)	16(R)	16(R)	≤0,03(S)	8	0,125(S)	0,06(S)
KPN535	16(S)	64(R)	256(R)	>512(R)	>512(R)	>256(R)	128(R)	>128(R)	512(R)	>256(R)	>16(R)	16(R)	32(R)	>512(R)	64(R)	64(R)	>32(R)	>32	0,5(S)	0,125(S)
TC KPN535	2(S)	32(I)	64(R)	>512(R)	128(R)	>256(R)	32(R)	>128(R)	32(R)	64(R)	1(S)	1(I)	1(S)	128(R)	0,5(S)	0,5(S)	0,25(S)	2	0,125(S)	0,06(S)
KPN537	16(S)	64(R)	256(R)	>512(R)	512(R)	>256(R)	128(R)	>128(R)	512(R)	>256(R)	>16(R)	16(R)	32(R)	>512(R)	64(R)	>64(R)	>32(R)	>32	0,5(S)	0,125(S)
TC KPN537	2(S)	32(I)	64(R)	>512(R)	128(R)	>256(R)	32(R)	>128(R)	32(R)	64(R)	1(S)	1(I)	1(S)	128(R)	0,5(S)	0,5(S)	0,25(S)	2	0,125(S)	0,06(S)

ATCC <i>E. coli</i> 25922	0,06	0,12	4	0,03	0,25	2	0,06	0,03	1	0,06	0,06	0,006	0,12	4	≤0,06	≤0,06	≤0,03	0,016	0,125	0,06
<i>E. coli</i> J53	0,5	0,12	4	0,03	0,25	2	0,06	0,03	4	0,06	0,06	0,003	0,12	4	≤0,06	≤0,06	≤0,03	0,06	≤0,125	≤0,125
<i>E. coli</i> DH5α	0,25	0,25	2	2	0,5	≤0,125	4	0,06	2	0,06	0,25	0,006	0,5	2	0,125	0,125	0,006	0,25	0,06	≤0,125

Fonte: Elaborado pelo autor

Nota: ATCC *E. coli* 25922 - Controle sensível utilizado segundo as recomendações do CLSI 2012;

E. coli J53 – Célula receptora durante os experimentos de conjugação bacteriana;

E. coli DH5α – Célula receptora durante os experimentos de transformação bacteriana;

Legenda: AMK, Amicacina; GEN, Gentamicina; AMC, Amoxicilina/clavulanato; CEF, Cefalotina; FEP, Cefepime; CTX, Cefotaxima; CAZ, Ceftazidima; CRO, Ceftriaxona; TZP, Piperacilina/tazobactam; ATM, Aztreonam; MEM, Meropenem; ETP, Ertapenem; IPM, Imipenem; NAL; Ácido Nalidíxico; GAT, Gatifloxacina; LVX, Levofloxacina; CIP, Ciprofloxacino; MXF, Moxifloxacina; TGC, Tigeciclina; POLB, Polimixina B.

ND - Não Determinado

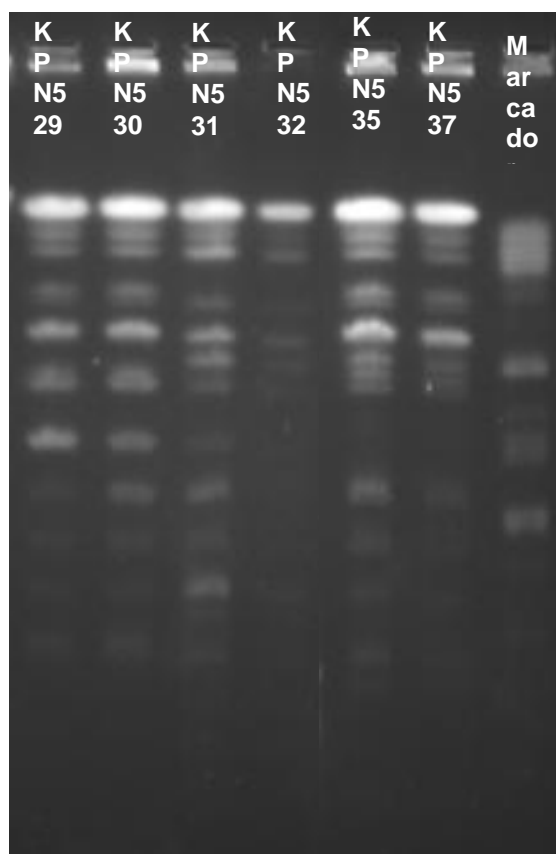
*MIC realizado por E-test.

(S) – Sensível, (I) – Intermediário, (R) – Resistente

6.3 Relação Clonal entre os Isolados

Segundo os critérios interpretativos de Tenover, a análise do PFGE revelou que os isolados eram intimamente relacionados, sendo os mesmos subdivididos em três subclones: KPN529 e KPN530 (A), KPN531 e KPN 532 (A1) e KPN535 e KPN537 (A2). Os isolados pertencentes ao mesmo pulso tipo apresentaram o mesmo perfil de restrição, sendo considerados desta forma clones. O perfil de restrição dos isolados encontra-se na figura 8.

Figura 8 - Gel de PFGE dos Isolados de *K. pneumoniae* produtores de carbapenemase.



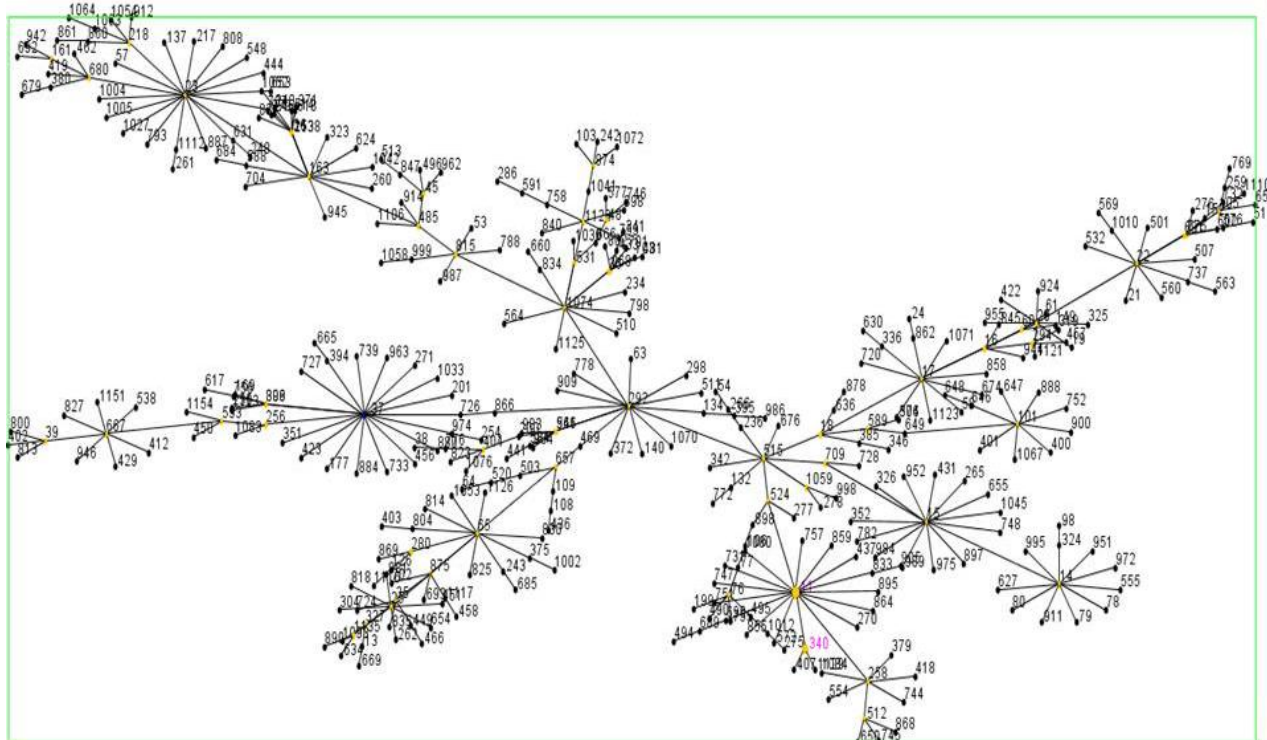
Fonte: Elaborado pelo autor

6.4 Multilocus Sequence Typing

De acordo com a determinação alélica dos sete genes constitutivos utilizados para determinação do ST dos isolados de *K. pneumoniae*, verificamos que dois STs foram detectados entre os isolados estudados. Seis genes constitutivos apresentaram o mesmo alelo nas seis cepas analisadas:

mdh (alelo 1), *gapA* (alelo 3), *rpoB* (alelo 1), *pgi* (alelo 1), *infB* (alelo 3), *phoE* (alelo 1). Mutações que conferissem mudança alélica só foram verificadas no gene *tonB*, onde o alelo 18 foi verificado em quatro isolados (KPN529, KPN530, KPN535 e KPN537) e o alelo 4 verificado em outros dois isolados (KPN531 e KPN532). A combinação alélica destes sete genes indicou que os isolados KPN529, KPN530, KPN535 e KPN537 pertenciam ao ST340, enquanto os isolados KPN531 e KPN532 ao ST11. Ambos os STs fazem parte do complexo clonal CC258, complexo este responsável pela disseminação de *K. pneumoniae* produtores de KPC por todo mundo. De acordo com os dados obtidos no MLST a árvore filogenética foi desenhada, onde foi verificado que ambos os STs apresentam relações filogenéticas com o ST258, ST este mais disseminado pelo mundo.

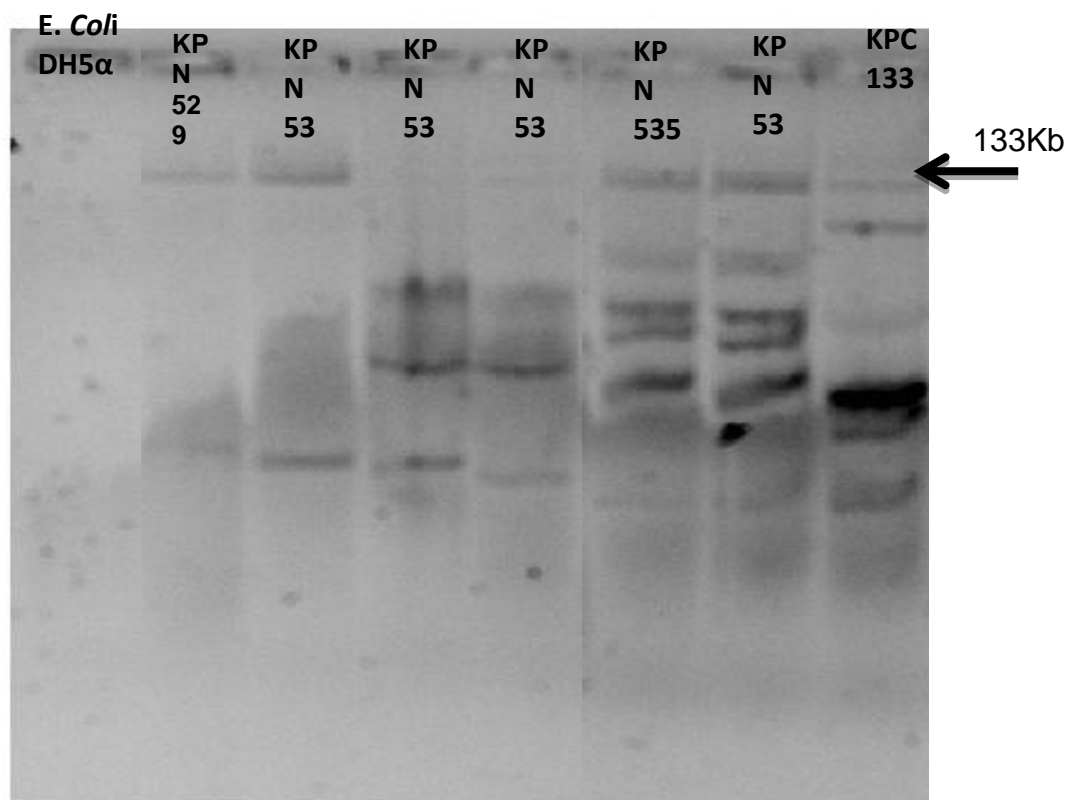
Figura 9 - Relação Filogenética entre os STs de *K. pneumoniae* que compõe o CC258.



6.5 Determinação do Perfil Plasmidial

A análise plasmidial revelou que os isolados apresentavam três perfis plasmidiais distintos, apresentando os isolados considerados clones pelo PFGE mesmo perfil plasmidial. O número de plasmídeos por isolado bacteriano variou de acordo com o perfil plasmidial verificados, apresentando os isolados KPN529 e KPN530 o menor número de plasmídeos (dois), enquanto os isolados KPN 535 e KPN537 apresentaram o maior número de plasmídeos (seis).

Figura 10 - Perfil plasmidial dos isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC.



Fonte: Elaborado pelo autor

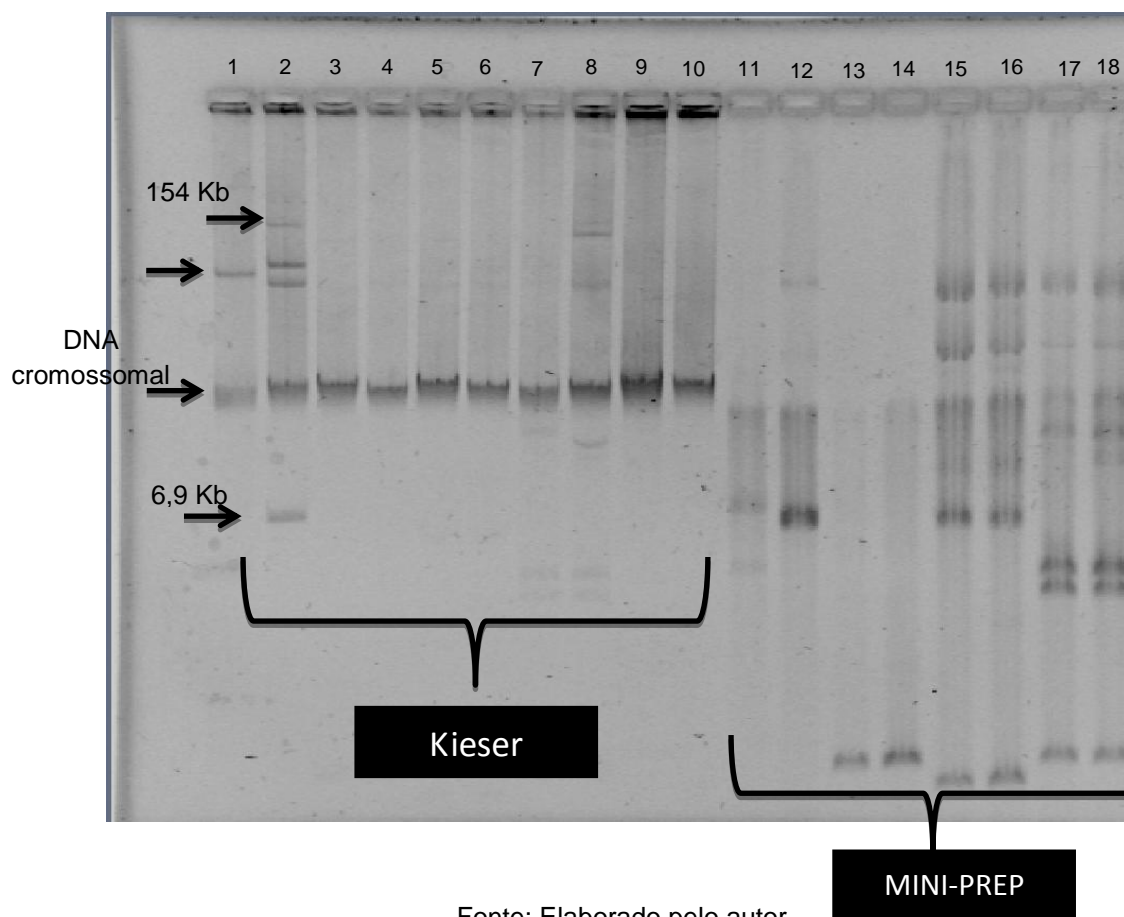
Legenda: *E. coli* DH5α, isolado utilizado como controle do DNA cromossomal; KPN529 a KPN537, isolados clínicos; KPC133, isolados de *K. pneumoniae* produtor de KPC com tamanhos de plasmídeos previamente conhecidos.

Nota: A metodologia utilizada não extrai DNA cromossomal. Na 1ª coluna a *E. coli* DH5α foi utilizada como controle do DNA cromossomal, que por sua vez não foi extraído. Em todos os isolados é possível identificar um plasmídeo de 133 kb.

Comparando o perfil plasmidial dos isolados clínicos com isolados de *E. coli* R861, *E. coli* 50192 e *E. coli* 50193 foi possível determinar o tamanho aproximado dos plasmídeos nas cepas. Na figura 10 estão representados os

tamanhos dos diferentes plasmídeos apresentados pelos isolados de *K. pneumoniae*, onde foi possível detectar que um plasmídeo de aproximadamente 133 kb estava presente em todos os isolados estudados.

Figura 11 - Perfil plasmidial na presença dos marcadores de peso plasmidial.



Fonte: Elaborado pelo autor

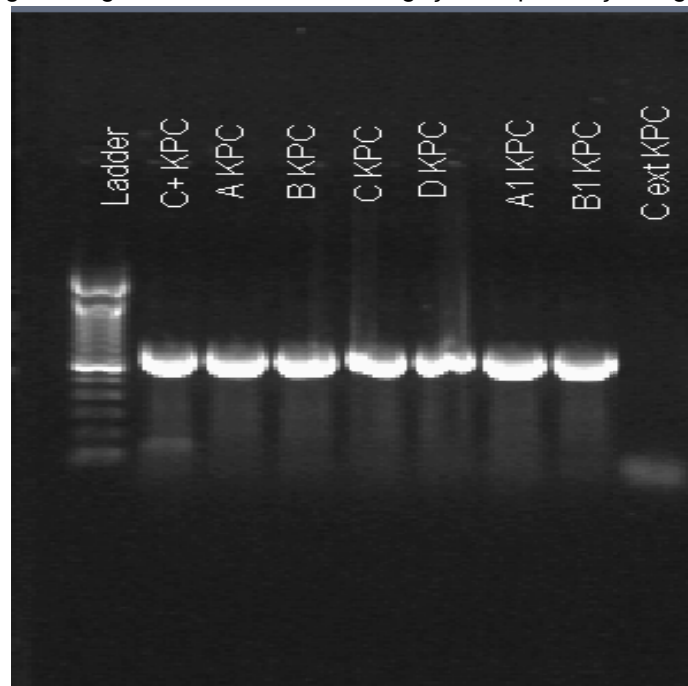
Legenda: 1 – *E. coli* 50192, 2 – *E. coli* R861, 3 a 8 – KPN529 a KPN537 (Extração pela metodologia de Kieser), 9 e 10 – Controles do DNA cromossomal, 11 – *E. coli* 50192 (MINI-PREP), 12 – *E. coli* R861 (MINI-PREP), 13 a 18 – KPN529 a KPN537 (MINI-PREP)

6.6 Caracterização dos Mecanismos de Resistência Plasmidiais aos β -lactâmicos

6.6.1 Detecção do Gene *bla*_{KPC-like}

Após a detecção de uma possível produção de carbapenemase no Teste de Hodge Modificado, PCRs para detecção de genes de carbapenemase foram realizadas. Em todos os isolados foi identificado o gene *bla*_{KPC-like} (Figura 12).

Figura 12 - Foto do gel de agarose referente à investigação da presença do gene *bla_{KPC}*.



Fonte: Elaborado pelo autor

Legenda: Ladder – Marcador molecular de 100pb; C+ KPC – Isolado utilizado como controle positivo; A - B1 – Isolados KPN529, KPN530, KPN531, KPN532, KPN535, KPN537, respectivamente; Cext – Controle negativo da reação de PCR.

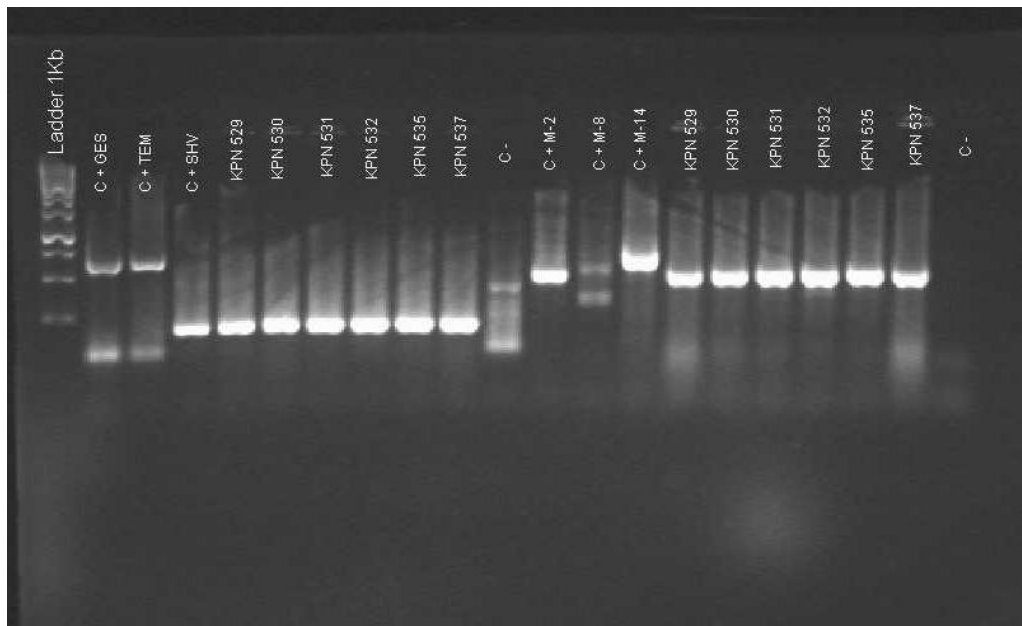
O sequenciamento dos produtos de PCR obtidos revelou que o gene detectado era o *bla_{KPC-2}*.

6.6.2 Detecção dos Genes de ES β L

Devido à alta associação de genes produtores de ES β L com micro-organismos KPC positivos, os genes mais prevalentes de ES β L foram investigados. Duas PCRs multiplex foram realizadas, a primeira para o gene *bla_{CTX-M}*, investigando seus três principais *clusters* CTX-M-2, CTX-M-8 e CTX-M-14. Já a segunda PCR multiplex investigou a presença dos genes *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}* e *bla_{GES}*.

Os seis isolados apresentaram os genes de β -lactamase *bla_{CTX-M}* (todos pertencentes ao cluster M1/M2), *bla_{SHV-like}*. O gene *bla_{TEM-like}*, apesar de muito prevalente em isolados de *K. pneumoniae* ES β L positivos não foi detectado (Figura 13).

Figura 13 - Foto do gel de agarose da PCR multiplex para identificação dos genes ESβL.



Fonte: Elaborado pelo autor

Análise de sequenciamento revelou que os isolados apresentavam diferentes variantes do gene *bla*_{CTX-M}. Os isolados KPN529, KPN530, KPN535 e KPN537 apresentaram o gene *bla*_{CTX-M-15}, gene este que codifica a enzima CTX-M-15, enquanto os isolados KPN531 e KPN532 apresentaram o gene *bla*_{CTX-M-2} que codifica a enzima CTX-M-2. Já a SHV detectada apresentou o mesmo alelo nos seis isolados, *bla*_{SHV-11}, que codifica a SHV-11 enzima esta de espectro restrito.

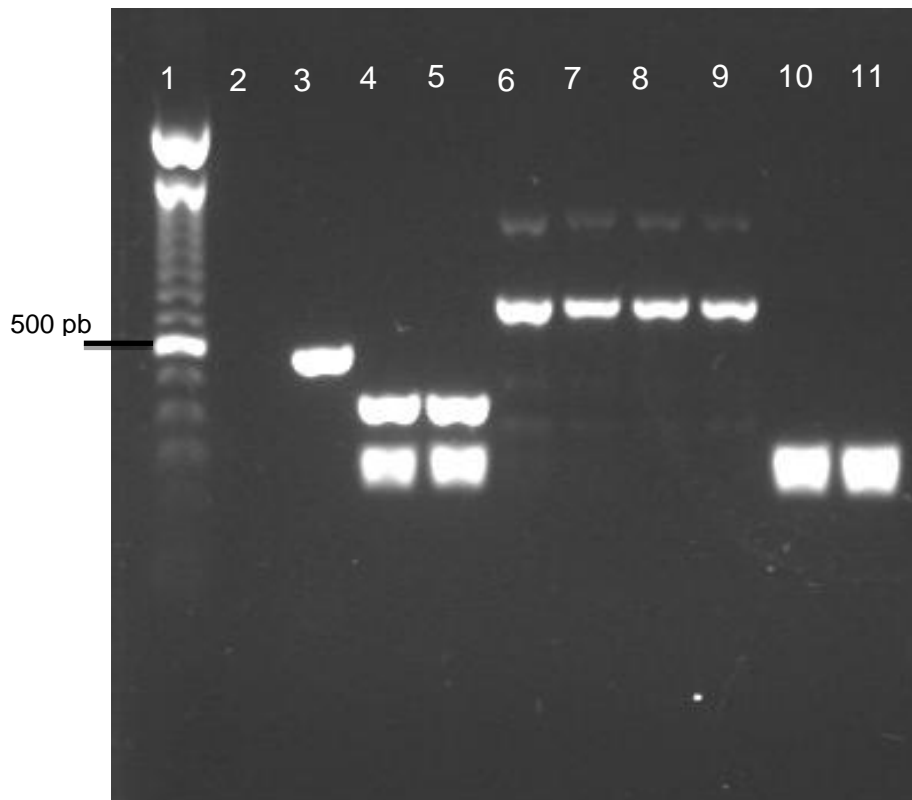
6.7 Caracterização dos Mecanismos de Resistência às Quinolonas

6.7.1 Detecção do Gene *qnr*

A presença do determinante *qnr* foi investigada através de uma PCR multiplex para investigar os genes *qnrA*, *qnrB* e *qnrS*, e PCRs uniplex para os genes *qnrC* e *qnrD*. Os isolados KPN535 e KPN537 apresentaram uma banda de 264pb na PCR multiplex, indicando a presença do gene *qnrB*. Os demais isolados foram negativos para as cinco variantes do gene *qnr* pesquisadas. As PCRs para os genes *qnrC* e *qnrD* foram realizadas sem controle positivo, visto que os autores que descreveram estas novas variantes do gene *qnr* não

disponibilizam cepas controles, entretanto os *primers* e as condições realizadas nas PCRs seguiram as recomendações dos autores.

Figura 14 - Foto do gel de agarose da PCR para identificação do gene *qnr*.



Fonte: Elaborado pelo autor

Legenda: Linha 1 – Marcador molecular de 100pb; Linha 2 – Controle Negativo; Linha 3 – Controle positivo para *qnrA* (fragmento de 580pb); Linhas 4 e 5 – Controle positivo para *qnrS* (fragmento de 428pb) e *qnrB* (fragmento de 264pb); Linhas 6 a 11 – Isolados clínicos de *K. pneumoniae* (KPN529, KPN530, KPN531, KPN532, KPN535, KPN537).

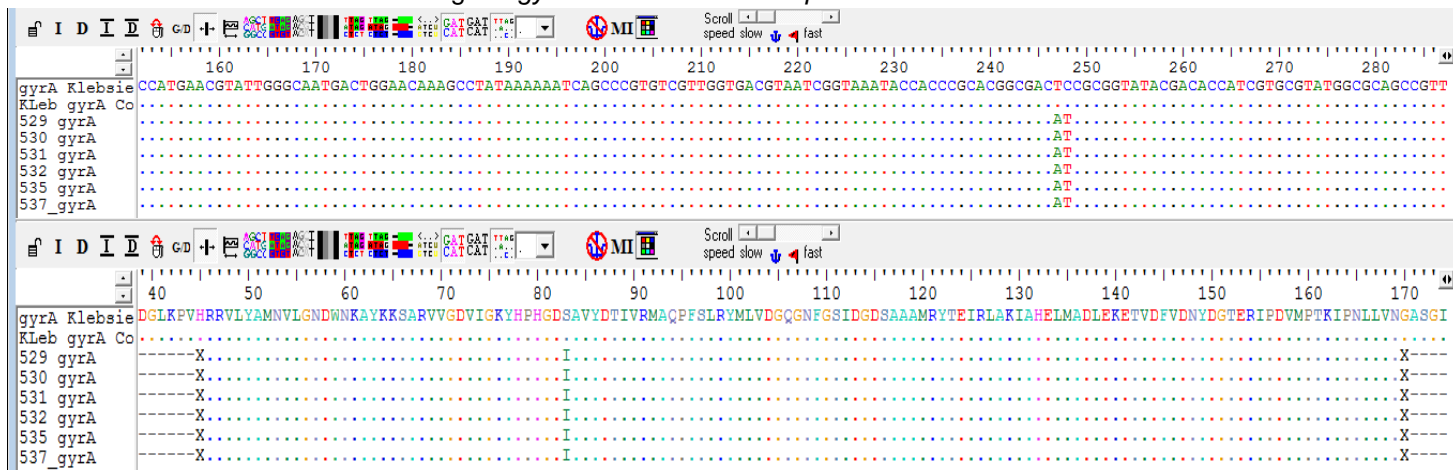
O produto obtido na reação de multiplex foi sequenciado, mas devido ao pequeno tamanho do fragmento não foi possível inicialmente determinar o alelo do *qnrB*. O iniciador *qnrB5/19R* foi desenhado e uma nova PCR seguida de sequenciamento foi realizada, evidenciado a presença da variante *qnrB19*.

6.7.2 Análise das regiões QRDR dos genes *gyrA* e *parC*

Com o objetivo de avaliar o envolvimento de mutações nas regiões QRDR dos genes *gyrA* e *parC* com a resistência as quinolonas, PCR seguida de sequenciamento foi realizada das regiões QRDR desses respectivos genes. Os isolados apresentaram a mesma sequência nucleotídica, na região

analisada, demonstrando todas desta forma duas substituições nos nucleotídeos 247 e 248 (T→A e C→T, respectivamente). As mutações citadas foram responsáveis pela alteração na cadeia polipeptídica, promovendo uma substituição de uma serina por uma isoleucina na posição 83 (Ser83Ile) (Figura 15).

Figura 15 - Alinhamento das seqüências de nucleotídeos e aminoácidos da região QRDR do gene *gyrA* nos isolados de *K. pneumoniae*.

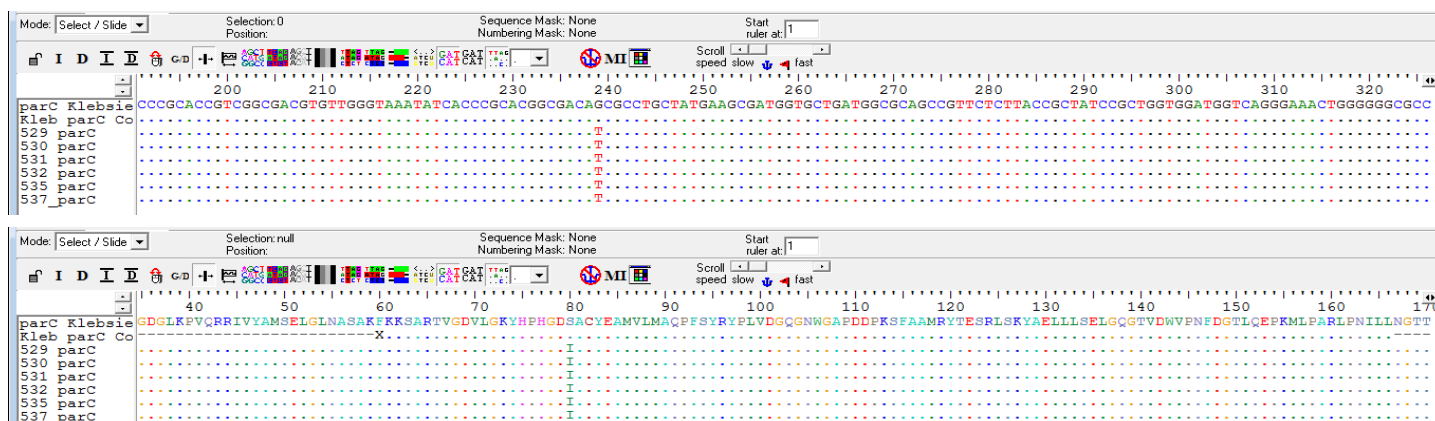


Fonte: Elaborado pelo autor

Legenda: *gyrA* Klebsiella – Sequência completa do gene/proteína *gyrA*/GyrA; Kleb *gyrA* controle – Sequência da região QRDR da ATCC de *K. pneumoniae* 13883; 529 a 537 *gyrA* – Isolados clínicos.

Assim como visto anteriormente, as seqüências das regiões QRDR do gene *parC* dos seis isolados foram idênticas. Uma mutação substituição na posição 239 (C→T) na cadeia nucleotídica foi responsável por alterar a seqüência de aminoácidos no códon 80 (Ser80Ile) (Figura 16).

Figura 16 - Alinhamento das seqüências de nucleotídeos e aminoácidos da região QRDR do gene *parC* nos isolados de *K. pneumoniae*.



Fonte: Elaborado pelo autor

Legenda: parC Klebsiella – Sequência completa do gene/proteína *parC*/*ParC*; Kleb parC controle – Sequência da região QRDR da ATCC de *K. pneumoniae* 13883; 529 a 537 parC – Isolados clínicos.

Para confirmar a presença destas mutações, duas diferentes PCRs seguidas de sequenciamento foram realizadas a fim de verificar se as mutações detectadas eram reprodutíveis ou apenas erro de incorporação da Taq DNA polimerase. Em ambas as análises, as mutações citadas persistiram, evidenciando desta forma a presença de mutações.

6.7.3 Investigação de Outros Determinantes de Resistência às Quinolonas

Os determinantes *qepA*, *aac(6')-Ib*, *oqxA* e *oqxB* foram investigados nos isolados bacterianos, a fim de verificar outro mecanismo de resistência as quinolonas. O gene *qepA* não foi identificado em nenhum dos isolados do estudo. Dois isolados (KPN535 e KPN537) apresentaram amplificação para o gene *aac(6')-Ib*. Entretanto o sequenciamento do produto obtido revelou a presença da variante *aac(6')-31*, gene este responsável por conferir resistência aos aminoglicosídeos. Os genes *oqxA* e *oqxB*, responsáveis por codificar o sistema de efluxo OqxAB foram amplificados, entretanto a técnica de qRT-PCR não foi realizada a fim de verificar o nível de expressão deste sistema de efluxo.

6.8 Caracterização de Mecanismos de Resistência aos Aminoglicosídeos

Apesar da sensibilidade verificada à amicacina em todos os isolados e a gentamicina em quatro deles, todas as cepas apresentaram genes de resistência aos aminoglicosídeos. Os isolados KPN529, KPN530, KPN535 e KPN537 apresentaram o gene *aadA2*, responsável por codificar uma adeniltransferase, enquanto os isolados KPN531 e KPN532 apresentaram os genes *aadA1* e *aac(6')-Iq* codificadores de uma adeniltransferase e uma acetiltransferase, respectivamente. Os isolados KPN535 e KPN537 ainda apresentaram adicionalmente o gene *aac(6')-31*. A maioria desses genes foram detectados sendo carregados por integrons, a única exceção foi a presença do gene *aac(6')-31* nos isolados KPN535 e KPN537 que não apresentava relação com o integron de classe 1. Nenhum isolado apresentou os genes codificadores das metilases investigados (*rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *armA*, *npmA*).

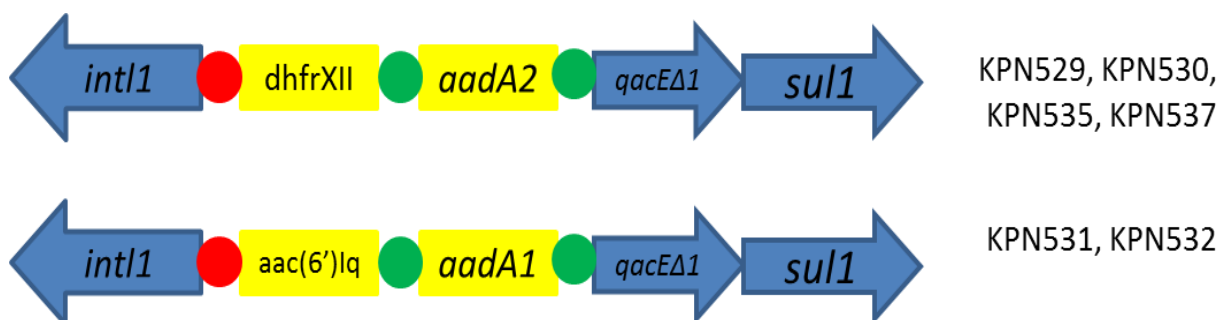
6.9 Caracterização do Contexto Genético Relacionado com os genes de Resistência

O contexto genético dos genes de resistência foi determinado por PCR com a combinação de diferentes primers, seguida de sequenciamento. Integrons, elementos de inserção e transposons foram detectados flanqueando ou carregando genes de resistência.

6.9.1 Mapeamento dos Integrons de Classe 1

Todos isolados apresentaram o integron de classe 1. Após o mapeamento do integron, foi possível detectar a presença de duas diferentes composições genéticas. Os isolados KPN529, KPN530, KPN535 e KPN537 compartilhavam da mesma estrutura de integron de classe 1, enquanto os isolados KPN531 e KPN532 compartilhavam outro integron de classe 1. Na figura X estão representadas as duas diferentes constituições genéticas de integrons detectadas.

Figura 17 - Mapa com a caracterização dos integrons de classe 1 carreados pelos isolados bacterianos.



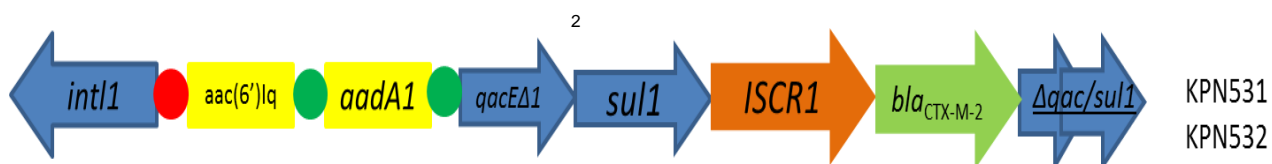
Fonte: Elaborado pelo autor

Legenda: Os círculos em vermelho representam o sítio de integração (*attI*); os círculos em verde representam o sítio de recombinação específica dos cassetes gênicos (*attC* ou fragmento 59pb); em amarelo os genes detectados dentro da região variável do integron. Os sentidos das setas indicam o sentido da expressão dos genes.

Os integrons apresentavam sua estrutura básica conservada, na região 5' o gene da integrase foi detectado, enquanto que na região 3' os genes *qacEΔ1* e *sul1*, responsáveis por conferir resistência aos compostos quaternários de amônio e sulfonamidas, respectivamente. Na região variável do integron (região de aproximadamente 2 kb nos isolados estudados) três diferentes genes foram detectados: *dhfrXII* (gene codificador de uma dihidrofolatoredutase), *aadA1*, *addA2* e *aac(6')-Iq*.

A presença do gene *bla_{CTX-M-2}* foi detectado associado a estrutura do integron de classe 1 nos isolados KPN531 e KPN532. O *bla_{CTX-M-2}* estava associado com o elemento de inserção ISCR1 numa região downstream a região conservada 3' do integron. Uma segunda região 3' conservada foi detectada, porém com a presença dos genes constituintes truncados.

Figura 18 - Mapeamento da região *downstream* do integron de classe 1 associado com o gene de β-lactamase *bla_{CTX-M-2}*.



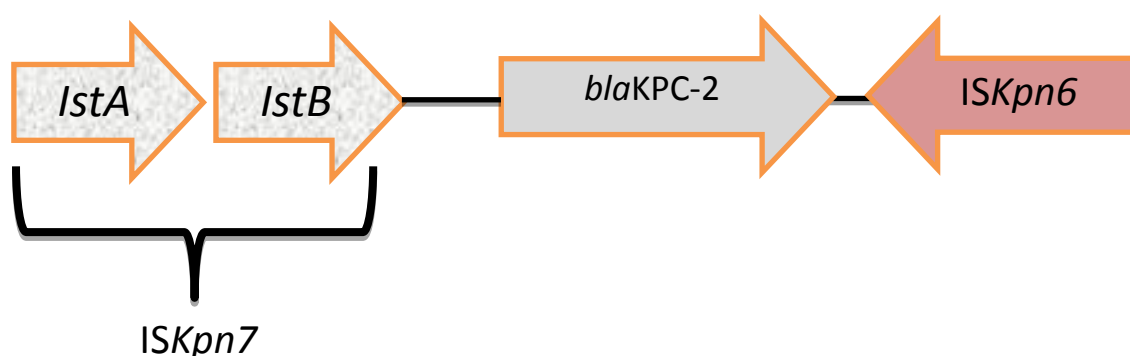
Fonte: Elaborado pelo autor

Nota: Mapeamento de toda estrutura do integron de classe 1. Observa-se a associação do *bla_{CTX-M-2}* com o elemento de inserção ISCR1.

6.9.2 Contexto genético do gene *bla_{KPC}*

A amplificação dos elementos genéticos comumente associados com o gene *bla_{KPC}* (*ISKpn*), foi realizada e evidenciou que os isolados estudados apresentavam parte do contexto genético francês descrito por Naas *et al.* (2008). *Upstream* ao gene *bla_{KPC}* foi detectado o elemento *ISKpn7* e *downstream* o *ISKpn6*, elementos estes que constituem o *Tn4401*.

Figura 19 - Contexto genético associado ao gene *bla_{KPC-2}*.



Fonte: Elaborado pelo autor

Legenda: O sentido das setas indica o sentido da transcrição. As regiões inter-gênicas estão representadas pelas linhas pretas.

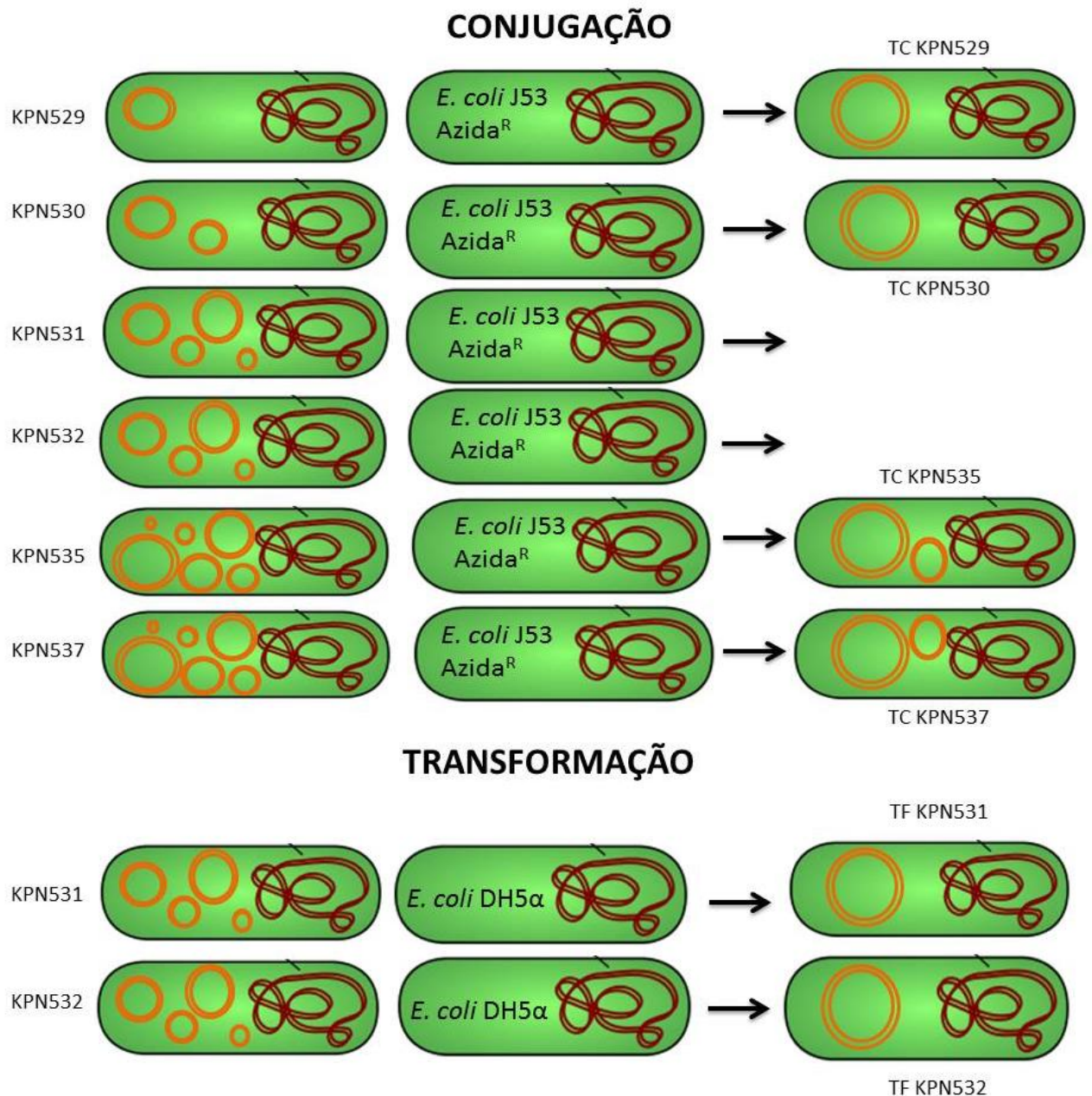
Nota: Apenas os elementos que flanqueiam o gene *bla_{KPC-2}* foram investigados. Para afirmar em que tipo de transposon se encontra o *bla_{KPC-2}* é necessário o mapeamento de toda estrutura do transposon.

6.10 Transferência dos principais determinantes de resistência

Experimentos de conjugação e transformação foram realizados a fim de verificar a transferência dos principais determinantes de resistência detectados nos isolados bacterianos. Quatro dos isolados apresentaram transconjugantes para o gene *bla_{KPC-2}* quando selecionados com ampicilina, sugerindo desta forma sua localização plasmidial deste gene. Estes isolados foram nomeados de TC KPN529, TC KPN530, TC KPN535 e TC KPN537. Os isolados KPN531 e KPN532 não apresentaram transconjugantes. Para estes isolados experimentos de transformação por eletroporação foram realizados, obtendo-se células transformantes nomeadas de TF531 e TF532.

PCRs para a investigação dos genes de resistência foram realizados nos isolados transconjugantes/transformantes e evidenciaram a transferência de alguns dos genes detectados nos isolados selvagens. Na figura 20 se encontra esquematizada a transferência de plasmídeos entre os isolados selvagens e as células receptoras utilizadas ao longo do estudo.

Figura 20 - Esquema dos resultados obtidos durante os experimentos de conjugação/transformação bacteriana.



Fonte: Elaborado pelo autor

6.10.1 Perfil de Sensibilidade dos Transconjugantes/Transformantes

A fim de verificar a influencia dos determinantes de resistência transferidos através da conjugação/transformação, o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos testados nos isolados selvagens foi determinado também para os transconjugantes/transformantes. Os resultados estão expressos na Tabela 1, com cada transconjugante/transformante abaixo de seu respectivo isolado selvagem.

6.10.2 Determinação do Grupo de Incompatibilidade Plasmidial

A técnica de *replicon typing* foi realizada a fim de determinar o grupo de incompatibilidade dos plasmídeos que foram transferidos pelos experimentos de conjugação/transformação. Os isolados TC KPN529 e TC KPN530 apresentaram um único plasmídeo de 133 kb que carregava os genes *bla*_{KPC-2} e *bla*_{CTX-M-15} que pertencia ao IncI- γ . Já nos transconjugantes TC KPN535 e TC KPN537 dois plasmídeos foram transferidos, um de 133 kb que carregava os genes *bla*_{KPC-2} e *bla*_{CTX-M-15}, pertencente ao IncI- γ e outro de 15 kb que carregava o *qnrB19* e o integron de classe 1, pertencente ao IncY. Os transformantes TF KPN531 e TF KPN532 apresentaram um plasmídeo único, não transferível por conjugação que também apresentava um tamanho de aproximadamente de 133 kb. Este plasmídeo carregava os genes *bla*_{KPC-2}, *bla*_{CTX-M-2}, além do integron de classe 1. Apesar do tamanho semelhante, os plasmídeos detectados nestes isolados não foram tipáveis com as metodologias utilizadas neste estudo.

6.11 Análise de Proteínas de Membrana Externa

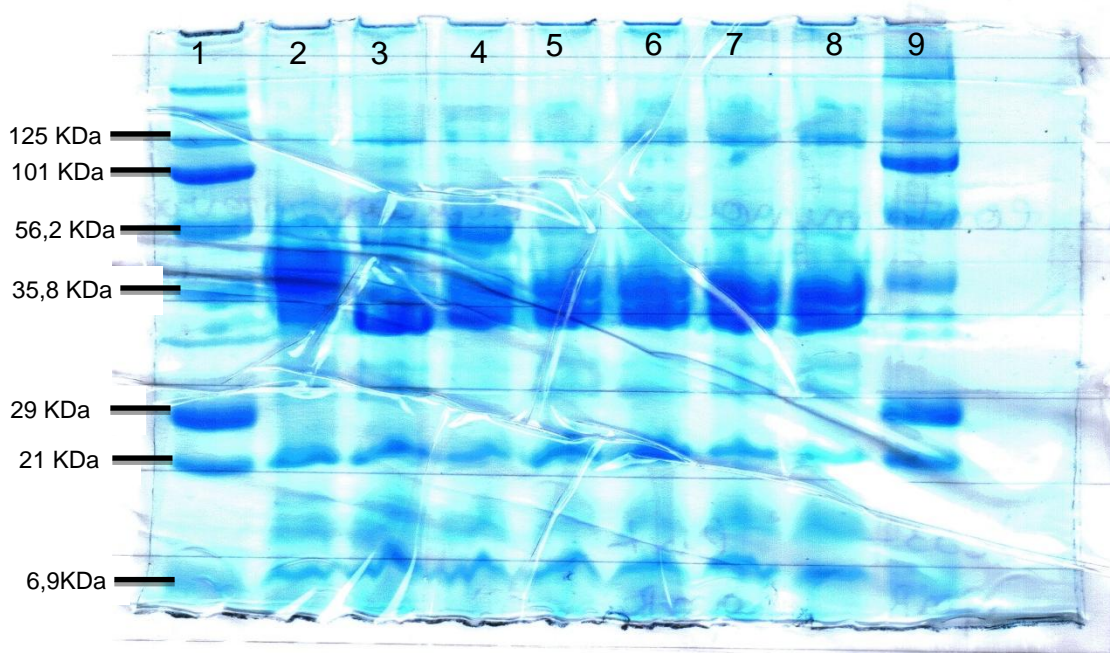
6.11.1 SDS-PAGE

A análise das proteínas de membrana externa através do SDS-PAGE, com base na comparação de duas *K. pneumoniae* utilizadas como controles revelou a presença/ausência de algumas das principais porinas detectadas em

K. pneumoniae. A OmpA, proteína essencial no metabolismo bacteriano, foi visualizada nos seis isolados. De acordo com a análise do gel de SDS-PAGE a proteína OmpA foi detectada em maior quantidade quando comparada com os isolados utilizados como controles. Outras porinas essenciais OmpK37, PhoE, LamB também foram detectadas nos seis isolados.

A OmpK35, porina associada com a resistência as cefalosporinas, quinolonas e alguns β -lactâmicos não foi detectada em gel de SDS-PAGE nos isolados inseridos no estudo, sugerindo desta forma uma perda ou diminuição na expressão no gene codificador desta proteína. Já a OmpK36 não foi visualizada apenas no isolado KPN529, permanecendo intacta nos demais isolados.

Figura 21 - SDS-PAGE dos isolados de *K. pneumoniae* produtores de carbapenemase.



Fonte: Elaborado pelo autor

Legenda: 1 – Marcador; 2 – Controle 193; 3 – KPN529; 4 – KPN530; 5 – KPN531; 6 – KPN532; 7 – KPN535; 8 – KPN537; 9 – Marcador.

6.11.2 Análise Molecular dos Genes Codificadores das Porinas

O contexto genético dos genes que codificam as principais porinas relacionadas com a resistência bacteriana (OmpK35, OmpK36 e OmpK37) foi investigado, revelando a presença de algumas mutações e presença de sequências de inserção associados com estas porinas. Os resultados estão compilados no Quadro 9.

Quadro 9 – Análise das porinas nos isolados de *K. pneumoniae*

Isolados	Análise das porinas no gel de SDS-PAGE		Sequenciamento dos genes de porina			Mutações Visualizadas		
	OmpK35	OmpK36	<i>ompk35</i>	<i>ompk36</i>	<i>ompk37</i>	OmpK35	OmpK36	OmpK37
KPN 529	Ausência	Ausência	IS1 (-5) ^a	IS903 (+726)	Sem IS	PM ^b	SM ^c	SM
KPN 530	Ausência	Presença	IS1 (-5)	Sem IS	Sem IS	PM	SM	SM
KPN 531	Ausência	Presença	Sem IS	Sem IS	Sem IS	PM	SM	SM
KPN 532	Ausência	Presença	Sem IS	Sem IS	Sem IS	PM	SM	SM
KPN 535	Ausência	Presença	IS1 (-5)	Sem IS	Sem IS	PM	SM	SM
KPN 537	Ausência	Presença	IS1 (-5)	Sem IS	Sem IS	PM	SM	SM
193	Presença	Presença	Sem IS	Sem IS	Sem IS	SM	SM	SM
194	Presença	Presença	Sem IS	Sem IS	Sem IS	SM	SM	SM

Fonte: Elaborado pelo autor

^a Tipo da IS detectada. Dentro do parêntese foi mencionada a posição de inserção da IS tomando como base a posição +1 no códon de iniciação da transcrição.

^bPM – Presença de Mutações; Todos os isolados apresentaram as mesmas mutações: Tre74Ile, Pro93Tre, Val183Ile, Gly211Ser, Val241Ile;

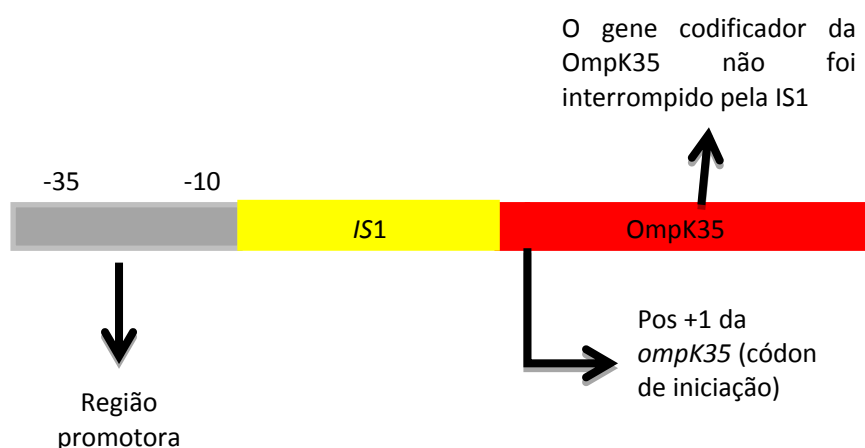
^cSM – Ausência de Mutações;

Os isolados 193 e 194 foram utilizados como controle;

Ao avaliar o a sequência nucleotídica do gene da *ompk35*, detectou-se a presença de algumas mutações na cadeia nucleotídica que alterou a cadeia de aminoácidos. Nenhuma das mutações observadas produzira um stop códon prematuro, inibindo dessa forma a transcrição do gene em questão. Os seis isolados apresentaram as seguintes mutações: Tre74→Ile; Pro93→Ter; Val183→Ile; Gly211→Ser; Val241→Ile.

Apesar de não possuírem um stop códon prematuro, não foi possível observar a presença da OmpK35 no gel de SDS-PAGE, levando-os a realizar a investigação do contexto genético da *ompk35*. Os isolados KPN529, KPN530, KPN535 e KPN537 apresentaram um amplicon num tamanho acima do esperado. O sequenciamento revelou a presença do elemento de inserção *IS1* na região (-5) upstream ao códon de iniciação (+1) (Figura 22). Essa inserção ocorreu entre o promotor e o códon de iniciação, alterando desta forma o frame de literatura resultando em uma proteína de membrana não funcional de tamanho diferente a 35KDa.

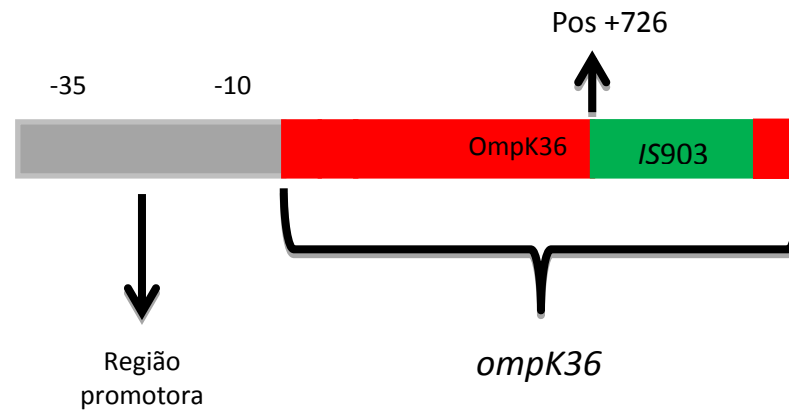
Figura 22 – Sequenciamento do gene *ompk35* dos isolados KPN529, KPN530, KPN535 e KPN537



Fonte: Elaborado pelo autor

O sequenciamento do gene da *ompK36* revelou a presença de mutações pontuais, mas silenciosas que não alteravam a sequência de aminoácidos. A pesquisa do contexto genético também foi conduzida, onde foi possível observar que o isolado KPN529 produziu um amplicon com um tamanho acima do esperado. O sequenciamento revelou a presença de uma sequência de inserção no meio do gene da *ompk36*. A *IS903* se inseriu na posição +726, no meio do gene codificador da porina, resultado na ausência da OmpK36 na membrana externa da KPN529 (Figura 23).

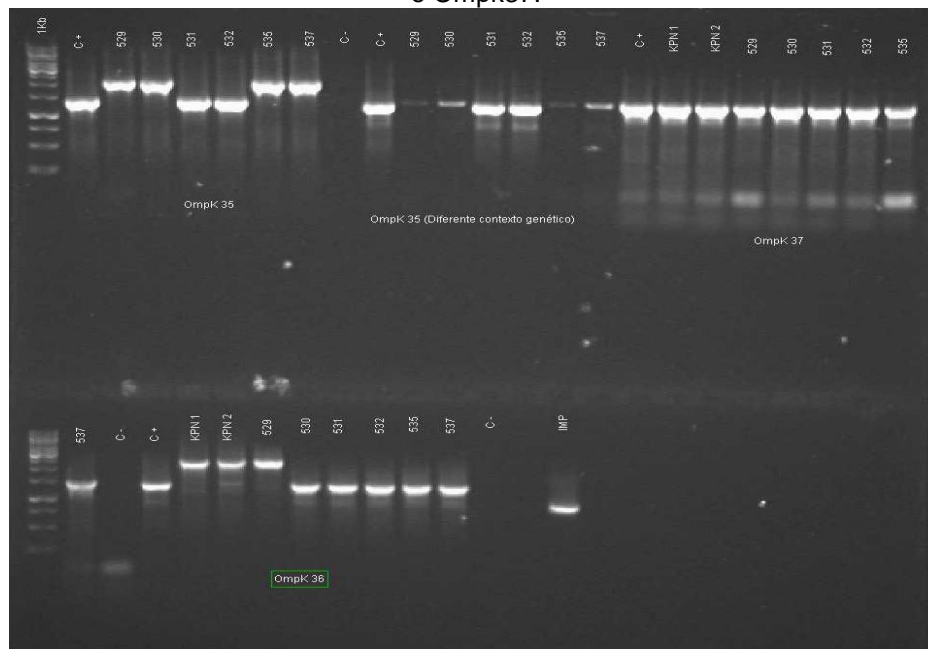
Figura 23 - Esquema do gene codificador da OmpK36 observado no isolado KPN529.



Fonte: Elaborado pelo autor

O gene da OmpK37 também foi sequenciado, entretanto nenhuma mutação foi verificada ao comparar a sequência nucleotídica obtida com sequências já depositadas no Pubmed de isolados de *K. pneumoniae* com as porinas intactas.

Figura 24 - Gel de eletroforese da investigação do genes codificadores das OmpK35, OmpK36 e OmpK37.



Fonte: Elaborado pelo autor

Nota: Contextos genéticos dos genes codificadores das principais porinas em isolados de *K. pneumoniae*. C+ (Isolado 193), KPN1 e KPN2 (Isolados de *K. pneumoniae* provenientes de Santa Catarina – Isolados não inseridos neste estudo) 529 a 537 (Isolados clínicos de *K. pneumoniae* inseridos no estudo). Na primeira coluna foi adicionado o marcador de 1 kb plus da Invitrogen.

6.12 Investigação Molecular dos genes de Virulência

Diferentes genes envolvidos com a virulência bacteriana foram investigados através de PCR seguida de sequenciamento. A presença, ou ausência dos genes está representada no quadro 10.

Quadro 10 - Presença/Ausência dos principais determinantes de virulência investigados.

Isolados	<i>magA</i>	<i>Wxy</i>	<i>fimH</i>	<i>mrkD</i>	<i>rmpA</i>	<i>wabG</i>	<i>uge</i>	<i>Kfu</i>
KPN529	-	+	+	+	-	+	-	-
KPN530	-	+	+	+	-	+	-	-
KPN531	-	+	+	+	-	+	+	-
KPN532	-	+	+	+	-	+	+	-
KPN535	-	+	+	+	-	+	-	-
KPN537	-	+	+	+	-	+	-	-

Fonte: Elaborado pelo autor
Legenda: + Presença; - Ausência

Os seis isolados pertenciam ao sorotipo K2 e apresentaram simultaneamente os dois tipos de fímbrias pesquisadas (Fímbrias do Tipo I – FimH; Fímbrias do Tipo III – MrkD). O gene *wabG*, envolvido com a síntese de lipolissacaídeo também foi identificado em todos os isolados. Apenas os isolados KPN531 e KPN532 apresentaram o gene *uge*, envolvido com a maturação e expressão do operon da urease.

7 DISCUSSÃO

7 DISCUSSÃO

K. pneumoniae nos últimos anos tem se demonstrado como um dos principais patógenos detectados em unidades hospitalares pela colonização ou infecção de pacientes, em diversos sítios, como: trato urinário, corrente sanguínea, trato respiratório inferior, sistema gastro-intestinal (SANTOS, 2011).

Dados do programa de vigilância SENTRY que avalia micro-organismos provenientes da América Latina, aponta *K. pneumoniae* como terceiro principal patógeno detectado nas infecções de corrente sanguínea, quarto principal patógeno causador de pneumonias e o quarto principal patógeno responsável por infecções relacionadas a pele. Em outro dado do mesmo programa verifica-se que cerca de 50% das *K. pneumoniae* recuperadas na América Latina no ano de 2011, apresentava o fenótipo de ES β L positivo, destacando desta forma a habilidade deste micro-organismos em adquirir e expressar mecanismos de resistência (GALES *et al.*, 2012; JONES *et al.*, 2013).

Por ser naturalmente um hospedeiro do trato gastro-intestinal humano, *K. pneumoniae* assim como outras enterobactérias são frequentemente recuperadas em estudos de vigilância epidemiológica realizadas em unidades hospitalares (JONES *et al.*, 2013). A presença desses micro-organismos carregando mecanismos de resistência, mesmo que colonizando pacientes, é um fator de risco, visto que esses micro-organismos podem atuar na disseminação de mecanismos de resistência dentro da unidade hospitalar. Os seis isolados obtidos durante o presente estudo foram provenientes de amostras obtidas de cultura de vigilância em cinco pacientes hospitalizados em uma mesma UTI. Todos os isolados foram identificados previamente como *K. pneumoniae* produtores de carbapenemase, sugestivo produtor de KPC. Apesar da colonização por um possível micro-organismo MDR, nenhuma profilaxia no sentido de controle da colonização foi realizada com estes pacientes. Papadimitriou-Olivgeres *et al.* (2013), ao analisar UTIs de um hospital universitário de grande porte na Grécia, detectaram que cerca de 74,5% dos pacientes foram colonizados por *K. pneumoniae* produtoras de KPC, principal carbapenemase detectada em todo mundo, após sua admissão nas unidades de terapia intensiva. Eles identificaram diversos fatores de risco para a predisposição de colonização por esses micro-organismos. Entre estes

fatores encontram-se: procedimentos invasivos realizado nos pacientes, alta pressão seletiva dos antimicrobianos e a má higienização das mãos dos profissionais de saúde. Sobre a pressão seletiva, estudos apontam que pacientes previamente tratados com carbapenêmicos, cefalosporinas de 3ª geração e quinolonas, apresentam uma maior propensão a desenvolver colonização por micro-organismos produtores de KPC (BARRER *et al.*, 2012; PAPADIMITROU-OLIVGERES *et al.*, 2013). Ao observar os dados clínicos prévios a colonização, verificamos que quatro dos cinco pacientes foram previamente tratados com um carbapenêmico ou quinolona para debelar infecções anteriores causadas por isolados multisensíveis.

A avaliação da similaridade genética por PFGE revelou que os isolados eram geneticamente relacionados, podendo ser detectados três subclones: A1, A2 e A3. Em quatro dos cinco pacientes, foi possível observar o mesmo micro-organismo (pulsotipos A1 e A2), sugerindo desta forma uma transmissão cruzada entre pacientes internados naquela UTI, ou a aquisição deste patógeno em fonte comum de contaminação. A correta higienização das mãos dos profissionais de saúde, assim como a correta manipulação e assepsia dos instrumentos utilizados para prestação de atendimento dentro de unidades de terapia intensiva, deve ser intensificada, a fim de diminuir a incidência de transmissão de micro-organismos entre pacientes, visto que *K. pneumoniae* consegue sobreviver durante grande período em condições de baixa umidade, como as fornecidas em superfície de materiais e pele (BARBOSA, 2009; WEBBER *et al.*, 2007). Com a emergência de novos mecanismos de virulência, faz-se necessário que as unidades hospitalares estejam sempre em vigilância à contínua aplicação das barreiras de contenção, a fim de diminuir a propagação de micro-organismos MDR.

O perfil de sensibilidade foi realizado segundo as recomendações do CLSI (2012) e interpretado segundo as recomendações do CLSI (2013). Os isolados apresentaram resistência aos três carbapenêmicos testados (ertapenem, meropenem e imipenem), assim como as cefalosporinas de 1ª, 2ª, 3ª e 4ª geração, confirmando desta forma o fenótipo sugerido pelo laboratório de bacteriologia de onde as amostras foram provenientes, onde os micro-organismos foram indicados como produtores de carbapenemase. Adicionalmente, os isolados apresentaram alto nível de resistência às

quinolonas, aos β -lactâmicos e à combinação de β -lactâmicos e inibidores de β -lactamase. Segundo Hirsch e Tam (2010), devido a capacidade de acúmulo de diferentes mecanismos de resistência, isolados de *K. pneumoniae* provenientes de unidades hospitalares apresentam resistência a antimicrobianos de diversas classes, limitando desta forma as opções terapêuticas.

Observações empíricas sobre bactérias resistentes provenientes da mesma região onde foi realizado nosso estudo revelaram que isolados produtores de carbapenemase detectados em Recife, inicialmente apresentavam-se sensíveis aos aminoglicosídeos, o que poderia ser justificado pela ausência de um mecanismo capaz de ocasionar resistência a esta classe de antimicrobiano na região. Entretanto nos últimos anos, já é possível perceber um aumento no nível de resistência a esta classe de antimicrobianos (ALMEIDA *et al.*, 2012 ALMEIDA *et al.*, 2013, JÁCOME *et al.*, 2013). Em nosso estudo, os isolados KPN535 e KPN537 apresentaram resistência apenas a um dos aminoglicosídeos testados, a gentamicina (CIM 64 μ g/mL). Este fato chama atenção para uma possível disseminação de genes que conferem resistência a esta classe de antimicrobianos, visto que os aminoglicosídeos são frequentemente utilizados em terapia de associação de fármacos para o combate de micro-organismos produtores de KPC.

Durante os primeiros anos de disseminação da KPC pelo mundo, a literatura sugeria que apesar da resistência apresentada aos β -lactâmicos, havia sensibilidade às polimixinas e à tigeciclina entre isolados produtores de carbapenemase (BRATU *et al.*, 2005; HIRSCH; TAM, 2010). Atualmente, a disseminação de cepas KPC positivas resistentes a polimixina B ou tigeciclina tem se demonstrado um grave problema para o controle de infecções de micro-organismos MDR, visto que ambas as drogas são muitas vezes a única opção terapêutica, para o tratamento de infecções causadas por micro-organismos produtores de KPC. Pereira *et al.* (2012) ao estudar 113 micro-organismos produtores de KPC provenientes de diferentes estados brasileiros detectaram altas taxas de resistência à polimixina B (15%) e tigeciclina (49%). Cerca de 70% dos isolados resistentes a polimixina B e tigeciclina foram provenientes do Rio de Janeiro, o que pode ser justificado pela alta taxa de utilização desses antimicrobianos nos hospitais deste Estado. Apesar dessa emergência na

resistência a polimixina B e tigeciclina, nossos isolados apresentaram sensibilidade às duas classes de antimicrobianos, que pode ser justificado devido à baixa utilização desses fármacos na prática clínica do hospital de onde as amostras foram coletadas (Comunicação Pessoal – CCIH do hospital estudado).

A escolha da melhor opção terapêutica para debelar uma infecção causada por um micro-organismo MDR vai muito além do perfil de sensibilidade apresentado pela bactéria. É necessário unir os dados clínicos do paciente com o perfil de sensibilidade do micro-organismo, para desta forma optar por um tratamento menos agressivo, visto que a polimixina B e a tigeciclina apresentam alta toxicidade e causam efeitos colaterais.

Nas enterobactérias, a resistência aos carbapenêmicos normalmente é mediada pela produção de carbapenemase. Em *K. pneumoniae* destaca-se a presença das serino-carbapenemase do tipo KPC. Entretanto outros tipos de carbapenemases já foram descritas no gênero *Klebsiella spp.* no Brasil, levando-nos a inicialmente realizar a pesquisa dos genes de β -lactamase mais comumente detectados em enterobactérias.

A investigação dos genes de β -lactamase revelou a presença dos genes bla_{KPC} , bla_{CTX-M} , e bla_{SHV} nos seis isolados inseridos no estudo. A detecção do gene bla_{KPC} , confirmou a presença da carbapenemases do tipo KPC nestes isolados. Apesar de não recomendado pela ANVISA, o teste de Hodge modificado, metodologia pela qual as amostras produtoras de carbapenemases foram triadas, demonstra-se uma importante ferramenta na investigação de micro-organismos produtores de KPC em unidades hospitalares.

O sequenciamento do fragmento obtido na amplificação do gene bla_{SHV} , revelou a presença do alelo bla_{SHV-11} . A SHV-11 é uma enzima de espectro restrito derivada da SHV-1, intrínseca em isolados de *K. pneumoniae* responsável pela hidrólise de penicilinas e cefalosporinas de espectro restrito (oximino-cefalosporinas). Cuzon *et al.* (2010) em estudos com isolados produtores de KPC provenientes de diferentes países, detectou a alta frequência do bla_{SHV-11} dentre os demais genes que codificam β -lactamases. Veras *et al.* (2011) em estudo sobre a prevalência de SHV em isolados provenientes do Recife, demonstrou uma alta prevalência do gene bla_{SHV} em suas amostras, com uma variabilidade maior de alelos, quando comparado ao

detectado em nosso estudo. Essa maior variabilidade pode ter sido obtida devido ao maior número amostral e a escolha de isolados provenientes de infecções nosocomiais, de comunidade e amostras da microbiota normal humana. No mesmo hospital onde foi realizada nossa investigação, Vilela (2009) realizou um estudo de prevalência das principais β -lactamases no período de 2002 a 2005, e observou que a SHV foi a enzima mais detectada entre isolados de *K. pneumoniae* produtores de β -lactamase neste período.

O sequenciamento do fragmento obtido na amplificação do gene *bla*_{CTX-M}, revelou a presença de dois diferentes alelos entre as amostras estudadas. Os isolados KPN529, KPN530, KPN535 e KPN537 (isolados mais relacionados no PFGE) carregavam o gene *bla*_{CTX-M-15}, enquanto os isolados KPN531 e KPN532 o gene *bla*_{CTX-M-2}. A cefotaximase CTX-M é a ES β L de maior prevalência em todo mundo, sendo rapidamente detectada nos cinco continentes logo após sua descoberta. A identificação de *K. pneumoniae* produzindo CTX-M, ocasionou vários surtos de infecções por todo o mundo, tornando desta forma a *K. pneumoniae* ES β L positiva um dos grandes problemas de saúde pública durante décadas (DHILLON; CLARK., 2012). Diferentes tipos de CTX-M estão disseminadas, desta forma a prevalência de um alelo específico varia de acordo com a região de onde a amostra é proveniente. Estudos prévios apontavam a maior prevalência da CTX-M-2 na América Latina, em especial no território brasileiro (CUZÓN *et al.*, 2010). Estudos realizados no Brasil também sugeriam uma maior prevalência da CTX-M-2 na década passada. Clímaco *et al.* (2010) ao avaliar a prevalência da CTX-M em diferentes clones de *K. pneumoniae* provenientes de um hospital terciário em Ribeirão Preto/SP, observaram a maior prevalência da CTX-M-2 no período de 2000 a 2006, sugerindo desta forma que a grande quantidade de micro-organismos produzindo a CTX-M-2 não se tratava da disseminação de um mesmo clone. Diferente disto, o estudo sugere que a localização do gene *bla*_{CTX-M-2} em plasmídeos promíscuos e mobilizáveis, tenha facilitado a propagação deste gene entre isolados brasileiros. Em diferentes regiões do Brasil, o panorama de prevalência da CTX-M-2 manteve-se durante meados dos anos 2000, apresentando uma alta incidência em estudo realizado por Lopes *et al.* (2010) na cidade do Recife e prevalência de 72% entre isolados de enterobactérias

ES β L positivas entre os anos de 2000 e 2005, em estudo conduzido por Minarini *et al.* (2009) no Estado de Minas Gerais.

Dados fornecidos por Seki *et al.* (2013) revelam uma interessante mudança do alelo codificador da CTX-M predominante no território brasileiro. Ao analisar 231 enterobactérias provenientes de cinco hospitais distintos do Rio de Janeiro, verificou-se uma maior prevalência da CTX-M-15 entre as espécies: *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Enterobacter cloacae*. A variante *bla*_{CTX-M-15} foi descrita pela primeira vez no Brasil, no estado de São Paulo, em isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* detectadas em 2006, e rapidamente detectada em outros estados brasileiros, incluindo Pernambuco (ALMEIDA *et al.*, 2012; CERGOLE-NOVELLA *et al.*, 2010). A detecção de um maior número de isolados portando o *bla*_{CTX-M-15} em nosso estudo, alerta-nos sobre a mudança do alelo predominante da CTX-M no território brasileiro, como sugerido por Seki *et al.* (2013). Diferente da maior parte das CTX-M, a CTX-M-15 apresenta significativo poder hidrolítico contra a ceftazidima e o mesmo poder de hidrólise frente às demais cefalosporinas. Ao comparar o perfil de sensibilidade dos seis isolados a ceftazidima, verificamos que a presença da CTX-M-15 eleva os valores da CIM para esta droga (≥ 128 $\mu\text{g/mL}$), quando comparada a isolados que produzem CTX-M-2 (64 $\mu\text{g/mL}$). Visto que a enzima CTX-M-15 apresenta um maior poder hidrolítico, quando comparada a CTX-M-2, a presença da CTX-M-15 pode estar colaborando para a seleção de micro-organismos cada vez mais resistentes aos β -lactâmicos no Brasil. Relatos indicam que isolados de *K. pneumoniae* resistentes às quinolonas pertencentes ao ST11 foram responsáveis pela disseminação do gene *bla*_{CTX-M-15} pelo mundo (DAMJANOVA *et al.*, 2008; OTEO *et al.*, 2009). Diferente do sugerido, detectamos que os isolados que carregavam o gene *bla*_{CTX-M-15} em nosso estudo pertenciam ao ST340, enquanto os isolados que carregavam o *bla*_{CTX-M-2} pertenciam ao ST11. Este fato pode ser justificado pela intensa troca de material genético entre organismos de mesma espécie pertencentes a diferentes STs, devido à alta pressão seletiva ocasionada pela larga utilização dos antimicrobianos β -lactâmicos.

O sequenciamento do gene *bla*_{KPC} revelou a presença do alelo *bla*_{KPC-2} nos seis isolados de nosso estudo. A carbapenemase KPC tornou-se endêmica em diferentes regiões do mundo, limitando as opções terapêuticas das

infecções a antimicrobianos não β -lactâmicos, visto que a KPC hidrolisa todos os antimicrobianos β -lactâmicos. Dezesesseis variantes da enzima KPC foram até então descritas (KPC-2 a KPC-17), apresentando a KPC-2 uma maior disseminação global.

Desde 2005, os Estados Unidos enfrentam diversos casos de infecções mediadas por enterobactérias produtoras de KPC. Bratu *et al.* (2005) ao analisar amostras provenientes de 251 pacientes hospitalizados em Nova York, detectaram que cerca de 30% destes micro-organismos produziam a enzima KPC. Mais de 90% dos isolados detectados apresentavam a KPC-2, enquanto uma pequena parcela, considerada insignificante para a época, apresentava a KPC-3. Em outro estudo também de caráter epidemiológico, Kitchel *et al.* (2009), estudaram a prevalência e analisaram o perfil clonal de isolados de *K. pneumoniae* também nos Estados Unidos. Os autores detectaram que mais de 50% dos isolados detectados produziam a KPC-3. Especula-se que apesar das mutações pontuais, as enzimas KPC-2 e KPC-3 não apresentam grandes diferenças em seu poder hidrolítico, e que a disseminação da KPC-3 nos Estados Unidos pode ser resultado da seleção de algum clone epidêmico que melhor se adaptou aos hospitais americanos (ALBA *et al.*, 2005; LE *et al.*, 2010). Em outros locais do mundo, como em parte da Europa, principalmente na Itália e em Israel, também é possível detectar a disseminação de isolados bacterianos produtores de KPC-3. Diferentes surtos ocasionados por *K. pneumoniae* pertencentes ao ST258 pertencentes ao mesmo clone foram detectados e caracterizados (GIANI *et al.*, 2009; NAVON-VENEZIA *et al.*, 2009).

Diferente do ocorrido em outros países, apenas a KPC-2 foi detectada até a presente data no Brasil. O primeiro relato da presença da KPC no Brasil, realizado por Monteiro *et al.* (2009) em um isolado de *K. pneumoniae* detectado em Recife foi apenas o início da detecção de isolados produtores de carbapenemase do tipo KPC no país. Poucos anos após, a identificação desses micro-organismos se tornou endêmica no território brasileiro, sendo responsável por diversos surtos e óbitos em diferentes regiões do país. Pereira *et al.* (2012) analisaram 113 isolados de *K. pneumoniae* produtoras de KPC provenientes das 5 regiões do Brasil. Todos os isolados carregavam o gene *bla*_{KPC-2}, e uma variedade de STs foi detectada entre os isolados. Corroborando

com outros trabalhos internacionais, a maior parte dos STs detectados no Brasil compõe o Complexo Clonal (CC) 258, complexo clonal este, principal responsável pela disseminação de isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC pelo mundo, com maior número de isolados pertencentes ao ST11. Em outro estudo realizado na região sudeste do país, Andrade *et al.* (2011), detectaram a presença do gene *bla*_{KPC-2} em diferentes enterobactérias, destacando desta forma a disseminação do gene entre diferentes espécies bacterianas. Entre os isolados de *K. pneumoniae*, uma predominância do ST258 foi observada. Apesar da diferença entre os STs detectados entre os isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC, Andrade *et al.* (2011), assim como Pereira *et al.* (2012) detectaram uma variedade clonal entre os isolados, sugerindo desta forma a presença de diferentes clones produtores de KPC. Entre os micro-organismos produtores de KPC do nosso estudo, quatro deles pertenciam ao ST340, enquanto dois aos ST11, ambos STs pertencentes ao CC258. Pelos dados fornecidos na literatura, não existe relação direta entre a produção de KPC em *K. pneumoniae* e um ST específico, dada a variabilidade genética dos micro-organismos e a intensa troca de material genético entre os mesmos. O que se pode concluir sobre a relação entre isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC e o ST dessas amostras detectadas no Brasil, é a presença apenas de STs que compõe o CC258 entre as amostras brasileiras (ANDRADE *et al.*, 2011; CASTANHEIRA *et al.*, 2012; NICOLETTI *et al.*, 2012; PEREIRA *et al.*, 2012).

Apesar da descoberta do gene *bla*_{KPC} em isolados de *K. pneumoniae* e sua rápida propagação nesta espécie, vários relatos da detecção deste gene em outras espécies foram descritos em diferentes lugares do mundo. No Brasil, a variedade de espécies produtoras de KPC impressiona, sendo detectada a enzima nas diferentes espécies: *K. oxytoca*, *S. marcescens*, *E. cloacae*, *Pseudomonas putida*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Citrobacter freundii*, *Aeromonas* spp., *Kluyvera georgiana* (ALMEIDA *et al.*, 2012; ALMEIDA *et al.*, 2013; DEL PELOSO; BARROS; SANTOS, 2010; JÁCOME *et al.*, 2013; LEÃO *et al.*, 2011; PICÃO *et al.*, 2013; RASHEED *et al.*, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2012; ZAVASCKI *et al.*, 2009). Até nosso conhecimento, outras espécies já foram detectadas produzindo KPC em isolados provenientes de amostras brasileiras, entre elas: *Providencia stuartii*, *Providencia rettgeri*, *Morganella morganii* (AIRES, 2013;

SILVA, 2013). Muitas dessas espécies detectadas como produtoras de KPC foram isoladas em Recife. Este fato nos alerta para a intensa disseminação do gene *bla*_{KPC} entre diferentes micro-organismos nos hospitais pernambucanos, o que pode ser resultado da não utilização das barreiras de contenção nas unidades hospitalares de Recife, assim como a má utilização dos antimicrobianos. Guimarães *et al.* (2013) detectaram a disseminação clonal de isolados de *S. marcescens* produtoras de KPC provenientes de diversos sítios em um hospital privado do Recife. A detecção da KPC em algumas espécies, implica na redução das opções terapêuticas para o tratamento de infecções, visto que, patógenos como *S. marcescens* apresentam resistência intrínseca às polimixinas, restando para o tratamento aminoglicosídeos e tigeciclina, normalmente.

A presença do *bla*_{KPC} em diferentes espécies, certamente deve ser atribuída a sua localização em plasmídeos promíscuos, conjugativos e com grande capacidade de replicação em uma grande quantidade de hospedeiros. Essa característica plasmidial pode justificar a disseminação do gene codificador da KPC em tantas espécies dentro de um curto período de tempo. Mathers *et al.* (2011) ao analisar diferentes enterobactérias produtoras de KPC provenientes de um hospital na Virgínia, Estados Unidos, detectaram um plasmídeo altamente conservado, nomeado de pUVA01, detectado na maior parte dos isolados. Este plasmídeo foi considerado promíscuo pelos autores do estudo e agente responsável pela transmissão horizontal dos determinantes de resistência dentro da unidade hospitalar estudada. Em um estudo brasileiro, Andrade *et al.* (2011) detectaram um plasmídeo de 130 kb responsável por carrear o gene *bla*_{KPC}, e outros mecanismos de resistência, entre isolados de *K. pneumoniae* provenientes de diferentes hospitais da região sudeste. Estes estudos apenas confirmam a hipótese de que plasmídeos são os principais responsáveis pela disseminação de mecanismos adaptativos, algo que já é sugerido há diversos anos pela comunidade científica (CARATOLLI, *et al.*, 2005; CARATOLLI, 2009).

Isolados provenientes de ambientes nosocomiais normalmente apresentam um número elevado de plasmídeos devido à necessidade de adaptação no meio a que estão submetidas. A alta taxa de exposição aos antimicrobianos e os sucessivos eventos de recombinação que estão

constantemente ocorrendo na célula bacteriana, promovem desta forma a seleção de plasmídeos que comportam diferentes genes de resistência. Os isolados de *K. pneumoniae* em nosso estudo, apresentaram um número variável de plasmídeos (2 a 6 plasmídeos). Nos isolados que apresentavam um maior número de plasmídeos, detectamos um maior número de genes de resistência. Esta relação já era esperada, já que por definição, sabe-se que plasmídeos não carregam genes essenciais para o metabolismo bacteriano, apenas estão envolvidos carregando e expressando genes adaptativos que conferirão alguma vantagem seletiva ao micro-organismo (CARATOLLI, 2009). Também detectamos a presença de diferentes genes de resistência em um mesmo plasmídeo. Os isolados KPN529, KPN530, KPN535 e KPN537 apresentavam um plasmídeo de 133 kb responsável por carrear os genes *bla*_{KPC-2} e *bla*_{CTX-M-15}, enquanto os isolados KPN531 e KPN532 um plasmídeo também de 133 Kb que carregava *bla*_{KPC-2} e *bla*_{CTX-M-2}. A associação dos genes codificadores das enzimas KPC e CTX-M em um mesmo plasmídeo é comumente reportada, contribuindo desta forma para a elevação das CIMs aos β-lactâmicos nos isolados que carregam este tipo de plasmídeo (ALMEIDA *et al.*, 2012; BARANIAK *et al.*, 2011; CUZÓN *et al.*, 2010; MONTEIRO *et al.*, 2008).

A ferramenta de tipagem plasmidial proposta por Caratolli *et al.* (2005), auxiliou na identificação de plasmídeos capazes de se replicar em diferentes hospedeiros. A classificação dos plasmídeos em diferentes grupos de incompatibilidade (*Inc groups*) contribuiu para a melhor compreensão da disseminação de diferentes plasmídeos entre diferentes espécies bacterianas produtoras da carbapenemase do tipo KPC e de outros genes de resistência. Assim como a análise de MLST, o estudo dos grupos de incompatibilidade plasmidial revelou a presença de uma diversidade de plasmídeos carregando o gene *bla*_{KPC}. Entretanto, esta nova forma de tipagem, alterou o foco de uma análise que levava em conta apenas as características cromossômicas dos isolados bacterianos (MLST) e passou a se concentrar nas características genéticas dos elementos que carregam os genes de resistência. Nossos isolados, apesar de detectados no mesmo período de tempo na UTI da unidade hospitalar estudada, apresentaram dois diferentes plasmídeos responsáveis pela disseminação da KPC. O plasmídeo de 133 kb dos isolados KPN529,

KPN530, KPN535 e KPN537 pertenciam ao grupo de incompatibilidade IncI- γ , enquanto o plasmídeo responsável pela disseminação da KPC nos isolados KPN531 e KPN532 (também de 133 kb) não foi tipado pelas técnicas utilizadas neste estudo, sendo classificado como não-tipável. Apesar do tamanho semelhante dos plasmídeos de nosso estudo, é evidente que pelos dados apresentados (diferentes grupos de incompatibilidade plasmidial e diferentes alelos codificadores da CTX-M) que uma alta variabilidade genética é observada entre plasmídeos que carregam determinantes de resistência. Em estudo prévio, Cuzón *et al.* (2010) ao analisarem os grupos de incompatibilidade de *K. pneumoniae* produtoras de KPC detectaram a presença de um plasmídeo de 12 kb pertencente ao IncL/M em quatro isolados provenientes do Brasil. A baixa variabilidade nos grupos de incompatibilidade detectado, certamente deve-se ao pequeno número amostral utilizado pelos autores e pelo fato dos quatro isolados serem resultado de uma disseminação clonal, visto que este dado não representa o real panorama da distribuição dos Inc Groups dos plasmídeos que carregam o *bla*_{KPC} no Brasil. Diferente do estudo anterior, Andrade *et al.* (2011), ao trabalhar com diferentes enterobactérias produtoras de KPC, visualizaram uma maior variabilidade nos grupos de incompatibilidade plasmidial, assim como no tamanho dos plasmídeos que carregavam o *bla*_{KPC}. Detectou-se uma maior prevalência de plasmídeos com 130 kb em isolados de *K. pneumoniae* pertencentes ao Inc FIIIs em isolados provenientes do estado de São Paulo. Ao analisarem outras enterobactérias como *E. cloacae*, *S. marcescens* e *C. freundii* isolados no Rio de Janeiro, os autores perceberam que diferentes plasmídeos eram responsáveis pela disseminação do *bla*_{KPC} nestes micro-organismos. Plasmídeos que variavam de tamanho (20, 60 e 50 kb, respectivamente) foram detectados nesses isolados de outras espécies. Os plasmídeos de 60 kb e 50 kb detectados na *S. marcescens* e *C. freundii*, pertenciam ao Inc L/M. Não foi possível tipar o plasmídeo de 20 kb detectado no *E. cloacae*, mesmo fato que ocorreu com dois de nossos isolados. Alguns plasmídeos não são tipáveis pelas metodologias sugeridas por Gotz *et al.* (1996) e Caratolli *et al.* (2005), especialmente em estudos realizados fora do continente Europeu. Provavelmente, o contexto genético de plasmídeos detectados em outras regiões do mundo, difere do utilizado por Caratolli *et al.* (2005) no

desenvolvimento de sua metodologia, já que a autora utilizou micro-organismos provenientes de um banco de cepas isoladas na Europa. Faz-se necessário um estudo do contexto genético dos plasmídeos não tipáveis identificados no Brasil, a fim de construir alguma ferramenta que auxilie na identificação dos grupos de incompatibilidade desses plasmídeos.

Uma alta variabilidade genética, também é observada entre os plasmídeos que carregam genes de resistência provenientes de Recife. Estudos identificaram uma variedade de grupos de incompatibilidade relacionados ao gene *bla_{KPC}*. Os IncFI, IncW, IncK foram detectados carregando o *bla_{KPC-2}* em plasmídeos de diferentes tamanhos, provenientes de diferentes hospitais em Pernambuco (ALMEIDA *et al.*, 2012a; ALMEIDA *et al.*, 2012b; ALMEIDA *et al.*, 2013; GUIMARÃES *et al.*, 2013). Almeida *et al.* (2012b), através dos dados clínicos do paciente estudado, caracterização molecular da resistência e principalmente, pela análise do grupo de incompatibilidade, descreveram a transmissão horizontal *in vivo* de um plasmídeo portador de KPC entre isolados de *K. pneumoniae* e *E. coli*. Outros estudos locais, também detectaram a presença do *bla_{KPC}* em seus isolados, entretanto pela ausência de dados mais aprofundados no que diz respeito ao contexto genético dos elementos que carregam este gene de resistência, não é possível traçar uma relação local entre grupo de incompatibilidade e detecção da KPC.

Outras β -lactamases já detectadas no Brasil foram investigadas, mas não detectadas em nossos isolados. Interessantemente, não verificamos a presença do genes *bla_{TEM}* e *bla_{OXA}* em nenhum dos nossos isolados. As β -lactamases TEM-1 e OXA-9 são comumente reportadas associadas a micro-organismos produtores de KPC, devido a associação do gene *bla_{KPC}* com o *Tn4401*, transposon esse da família Tn3 que carrega naturalmente os genes codificadores da TEM-1 e OXA-9 (ANDRADE *et al.*, 2011; CUZÓN *et al.*, 2010). A ausência destes genes em nossos isolados pode sugerir um contexto genético alternativo a qual o *bla_{KPC}* esteja submetido. Contextos genéticos alternativos têm sido sugeridos ao longo dos anos, demonstrando desta forma a alta plasticidade do genoma bacteriano (PICÃO *et al.*, 2013; SHEN *et al.*, 2009). Um dos contextos descritos pela literatura, sugere a ausência da β -lactamase TEM e a substituição da *ISKpn7* pela *ISKpn8 upstream* ao gene *bla_{KPC}* (SHEN *et al.*, 2009). A investigação do contexto genético dos nossos

isolados foi realizada, detectando os elementos característicos IS*Kpn7* *upstream* e IS*Kpn6* *downstream* ao gene *bla*_{KPC}. Devido ao curto tempo disponível para a replicação do genoma bacteriano, constantes eventos de recombinação e intensa troca de material genético, é necessário a realização do sequenciamento de toda a estrutura do transposon para sugerir algum contexto genético para o gene *bla*_{KPC}. Diferentes metodologias sugerem a amplificação de algumas regiões do transposon, e a partir do sequenciamento ou tamanho do produto obtido indicam qual contexto associado ao *bla*_{KPC}. Essas metodologias são extremamente falhas visto que genes codificadores de transposases e resolvases que estão mais distantes do *bla*_{KPC} podem caracterizar um novo contexto genético (PICÃO *et al.*, 2013).

A β -lactamase GES, as OXAs ES β L, OXAs de espectro estreito, e as metalo- β -lactamases: NDM, VIM, IMP, SPM, SIM, VIM e GIM, não foram detectadas em nosso estudo. Apesar da disseminação de alguns dos genes de metalo- β -lactamase em algumas regiões do Brasil, nossos isolados não apresentaram nenhuma das enzimas descritas. Recentemente, relatos sugerem a disseminação de isolados de *K. pneumoniae* produtores de IMP no Brasil e a detecção de algumas enterobactérias produtoras de NDM (CARVALHO-ASSEF *et al.*, 2013; LINCOPAN *et al.*, 2005). Maior parte dos relatos das metalo- β -lactamases em Recife, apontam a presença dos genes codificadores dessas enzimas em bactérias não fermentadoras, como *A. baumannii* e *P. aeruginosa* (CAVALCANTI *et al.*, 2012; MAGALHÃES; LINS; MAGALHÃES, 2005; POIREL *et al.*, 2004).

Todos os isolados do estudo apresentaram alto nível de resistência às quinolonas de diferentes gerações testadas. Devido à origem sintética das quinolonas, especulou-se que apenas mutações em seu sítio alvo seriam capazes de ser um potente mecanismo de resistência para esta classe de antimicrobiano. Contrário a essa especulação, elementos como: sistemas de efluxo, proteínas protetoras do sítio alvo e enzimas modificadoras de quinolonas, contribuem para a resistência a esses antimicrobianos (HERNÁNDEZ; SÁNCHEZ; MARTÍNEZ, 2011). Dados do SENTRY apontam que cerca de 50% das *K. pneumoniae* ES β L positivas recuperadas em 2011, apresentaram resistência às quinolonas (JONES *et al.*, 2013). Mutações em genes cromossomais, como *gyrA*, *gyrB*, *parC* e *parE*, (principalmente *gyrA* e

parC) são as principais causas de resistências às quinolonas em enterobactérias (MINARINI; DARINI, 2012). Entretanto, observa-se nos últimos anos, uma intensa disseminação dos mecanismos de resistência plasmidiais às quinolonas que estão em alguns casos relacionados com isolados KPC positivos (CHMELNITSKY *et al.*, 2008). Desta forma, além da investigação de mutações nos genes cromossomais, genes plasmidiais de resistência às quinolonas também foram investigados.

A amplificação seguida de sequenciamento da região QRDR dos genes *gyrA* e *parC* foi realizada nos seis isolados de *K. pneumoniae* produtores de carbapenemase, revelando as mesmas mutações em todos os isolados. Substituições de aminoácidos em GyrA (Ser83Ile) e em ParC (Ser80Ile) foram responsáveis por ocasionar a resistência às quinolonas em nossos isolados. Estudos sugerem que substituições únicas de aminoácidos na região QRDR de GyrA e ParC já são responsáveis por ocasionar resistência as quinolonas, visto que estas substituições na cadeia de aminoácido ocasionarão a diminuição da afinidade entre as quinolonas e estas proteínas. Minarini e Darini (2012) em um estudo na região Sudeste, avaliaram a região QRDR de diferentes enterobactérias, detectando as mesmas mutações visualizadas em nosso estudo com a segunda maior frequência entre os isolados de *K. pneumoniae* estudados. Entre os isolados que apresentaram a substituição de aminoácidos nos códons 83 e 80 das proteínas analisadas, uma maior CIM para norfloxacin foi observado, sugerindo desta forma uma maior sensibilidade da norfloxacin a mutações em GyrA e ParC. Apesar desta observação, há grande dificuldade na correlação das mutações observadas em *gyrA* e *parC* com as CIMs apresentada pelos isolados, devido o grande número de mutações e variação das CIMs apresentadas a fluorquinolonas por estes isolados (HERNÁNDEZ *et al.*, 2011; JACOBY, 2005; MINARINI; DARINI, 2012). As mutações nas posições 83 e 80 das proteínas GyrA e ParC respectivamente, corroboram com os dados até então descritos na literatura, no qual apontam as posições 80, 83 e 87 como principais *hot spots* na região QRDR das enterobactérias (HOPKINS *et al.*, 2005).

A investigação de outros mecanismos de resistência às quinolonas apontou a presença do gene *qnrB19* nos isolados KPN535 e KPN537. Responsável por proteger os sítios alvos contra ação das quinolonas, as

proteínas Qnr não conferem resistência às quinolonas, atuando apenas na redução da sensibilidade as mesmas. Ao compararmos as CIMs dos isolados que apresentavam *qnrB19*, detectamos que os isolados produtores de QnrB19 apresentavam CIMs superiores para levofloxacino e gatifloxacino. Acreditamos que por limitação nas diluições seriadas realizadas, não foi possível observar essa diferença nas CIMs das demais quinolonas testadas.

Apesar de ser conhecida desde 1998, uma baixa prevalência dessa enzima é observada pelo mundo. A baixa disseminação é atribuída à pequena influência destas enzimas para o perfil de resistência as quinolonas (CASTANHEIRA *et al.*, 2007). Experimentos de *Southern Blot* revelaram a presença do gene *bla_{KPC}* em um plasmídeo de aproximadamente 133 kb, enquanto o *qnrB19* em um plasmídeo de aproximadamente 15 kb pertencente ao IncY. No Brasil, o primeiro relato da presença do gene *qnr* foi detectado em um isolado de *E. coli* em 2003, resistente a ciprofloxacina carreando o gene *qnrA1* (CASTANHEIRA *et al.*, 2007). A detecção de mais um determinante de resistência plasmidial estimulou a investigação do gene *qnr* em diferentes regiões do país. Diferentes relatos no Brasil apontam a presença do *qnrA1*, *qnrB2*, *qnrB8*, *qnrB19*, *qnrS1* e *qnrVC* entre diferentes espécies de enterobactérias provenientes da regiões Sul e Sudeste do país (FERRARI *et al.*, 2011; MINARINI; GALES; DARINI, 2007; MINARINI *et al.*, 2008; PAIVA *et al.*, 2012).

Interessantemente nos isolados KPN535 e KPN537 detectamos pela primeira vez no Brasil a associação do *bla_{KPC-2}* e *qnrB19*. Até a presente data, esta associação só foi descrita quatro vezes no mundo, todas estas no continente asiático. A associação entre estes diferentes genes de resistência foi descrita pela primeira vez em 2008 em Israel. Chmelnitsky *et al.* (2008) detectaram a disseminação clonal de dezesseis isolados de *Enterobacter* spp. sensíveis às quinolonas, carreando os genes *bla_{KPC-2}* e *qnrB2*. Diferente dos nossos isolados, ambos os genes estavam localizados em um mesmo plasmídeo não conjugativo. Os outros três relatos de associação entre KPC e Qnr ocorreram na China, com destaque aos estudos de Zhang *et al.* (2011) e Hu *et al.* (2012). Zhang *et al.* (2011) reportaram um surto causado por *K. pneumoniae* produtoras de KPC, onde 25 isolados co-produziam as enzimas KPC-2 e QnrB2, enquanto dois co-produziam KPC-2 e QnrS1. Já Hu *et al.*

(2012) detectaram a emergência de *Proteus mirabilis* co-produzindo KPC-2 e QnrD e presença de mutações em *gyrA* e *parC*. Nestes últimos estudos a localização dos genes não foi discutida.

Nossos isolados (KPN535 e KPN537) apresentaram a co-produção de diferentes enzimas responsáveis pelo fenótipo MDR apresentado pelos mesmos. Os genes codificadores das enzimas, KPC-2, CTX-M-15, SHV-11, QnrB19, Aac(6')-31 foram identificados nesses isolados, sendo desta forma o primeiro relato da associação entre estas diferentes enzimas em um mesmo isolado e primeiro relato da associação entre KPC-2 e QnrB19. É interessante ressaltar que a detecção destes isolados pode ser resultado da grande pressão seletiva na unidade hospitalar estudada ocasionado a aquisição de diferentes plasmídeos que carregem genes de resistência, visto que nenhum outro micro-organismo carregando estes determinantes de resistência foi detectado no Brasil até a presente data.

Dois dos nossos isolados, KPN535 e KPN537 foram resistentes a um dos aminoglicosídeos testados, a gentamicina. Isso pode ser justificado devido ao maior número de plasmídeos que os isolados carregam, ocasionando desta forma um acúmulo de diferentes mecanismos de resistência. Amicacina e gentamicina são os principais aminoglicosídeos utilizados para o tratamento de infecções nosocomiais. Apresentando uma ótima atividade especialmente contra bactérias Gram negativas, a utilização desta classe de drogas emergiu nos últimos anos com a detecção exponencial de micro-organismos resistentes aos β -lactâmicos incluindo os carbapenens. A investigação dos genes das principais metilases, principal mecanismo de resistência aos aminoglicosídeos, foi procedida, não sendo detectada nenhuma das metilases investigadas. Entretanto ao investigar a presença do gene de resistência às quinolonas *aac(6')-Iq*, detectamos a presença de um outro alelo, o *aac(6')-31*, através do sequenciamento do amplicon obtido. O gene *aac(6')-31* potencialmente codifica uma acetilase de 173 aminoácidos (19,1KDa) que apresenta cerca de 80% de similaridade com a AAC(6')-Ib e quando expresso reduz a sensibilidade a todos os aminoglicosídeos (MENDES *et al.*, 2007). Apesar de conferir resistência a todos os aminoglicosídeos, nosso isolados produtores de AAC(6')-31 só apresentaram resistência a gentamicina. Este fato pode ser resultado de

uma associação de mecanismos de resistência aos aminoglicosídeos ainda não bem elucidados na literatura que tenham maior afinidade pela gentamicina.

Mendes *et al.* (2007), descreveram a presença do *aac(6')-31* associado com o integron de classe 1 In86 em isolados de *A. baumannii* produtores de IMP-1. A fim de verificar se o gene *aac(6')-31* também estava relacionado com o integron de classe 1 nos isolados e para verificar se os outros isolados apresentavam outros genes de resistência aos aminoglicosídeos, a investigação da presença do integron de classe 1, assim como a caracterização do conteúdo dos cassetes gênicos foi realizada nos seis isolados.

A presença do integron de classe 1 foi detectada nos seis isolados do estudo. A detecção de integrons de classe 1 em isolados nosocomiais contribuiu para a resistência aos antimicrobianos, visto que os integrons carregam em sua região variável cassetes gênicos que normalmente medeiam a resistência aos antibióticos. Chowdhury *et al.* (2011) ao analisar diferentes estruturas de integrons provenientes de isolados de *K. pneumoniae* ESβL positivas, observaram uma alta prevalência destes elementos genéticos em seus isolados. Os autores também atribuíram aos integrons a responsabilidade pela disseminação de genes de resistência aos β-lactâmicos e aminoglicosídeos, como: *bla_{OXA}*, *bla_{IMP}*, *aacA* e *aadA*. Ao analisar o conteúdo dos cassetes gênicos em nossos isolados, detectamos a presença de três diferentes genes, compondo duas diferentes estruturas de integrons. Os isolados KPN529, KPN530, KPN535 e KPN537 possuíam um mesmo integron que apresentava em sua região variável os genes *dhfrXII* e *aadA2*. A presença do cassete *dhfrXII* contribuiu para a resistência ao trimetoprim, antimicrobiano bastante utilizado em combinação com o sulfametoxazol. Para confirmar o fenótipo sugerido realizamos o teste de sensibilidade por disco-difusão para sulfametoxazol/trimetoprim, verificando resistência em todos os isolados. A presença do gene *sul1* na estrutura básica do integron de classe 1 e o gene *dhfrXII* justificam o fenótipo observado.

Diferentes estudos apontam a intensa disseminação de genes de resistência codificadores de acetiltransferases (AAC) e adeniltransferases (AAD) em estruturas de integron de classe 1 (CHOWDHURY *et al.*, 2011; MÁRQUEZ *et al.*, 2008). Apesar de carrear estes tipos de genes em sua região

variável, os isolados KPN529 e KPN530 demonstram-se sensíveis aos dois aminoglicosídeos testados. Isso pode ser resultado do baixo nível de expressão gênica do cassete *aadA2*, visto que a expressão dos genes contidos na região variável dependem unicamente do promotor contido no integron de classe 1. Já a resistência à gentamicina dos isolados KPN535 e KPN537, provavelmente deve ser atribuída à presença do *aac(6')-31* que em adição ao cassete gênico contido no integron confere resistência a esta droga. Huang *et al.*, (2009) sugerem que quanto mais próximo o cassete gênico estiver do promotor *Pant* maior será a expressão do mesmo. Desta forma o nível de expressão do segundo cassete gênico em diante é menor quando comparado ao primeiro. Outros dois isolados, KPN531 e KPN532, apresentaram dois genes de resistência aos aminoglicosídeos em seu integron. Os genes codificadores da acetiltransferase, *aac(6')-Iq*, e adeniltransferase, *addA1*, foram detectados. A presença de ambos os genes não foi suficiente para ocasionar resistência aos aminoglicosídeos. Provavelmente a presença de determinantes de resistência aos aminoglicosídeos apenas em integrons de classe 1, não seja suficiente para ocasionar a resistência e sim apenas uma diminuição na sensibilidade.

Experimentos de conjugação e transformação bacteriana foram realizados a fim de investigar a transmissão horizontal dos principais determinantes de resistência em presença de pressão seletiva. A seleção ocorreu pela adição de um β -lactâmico (ampicilina 100 μ g/mL) e nos isolados que carream *qnrB19* também foi acrescido uma quinolona (ciprofloxacino 0,125 μ g/mL). A transmissão dos genes *bla*_{KPC-2}, *bla*_{CTX-M-15} foi observada nos isolados TC KPN529 e TC KPN530. A presença destes genes de resistência em plasmídeos que apresentam a capacidade de mobilização entre diferentes micro-organismos representa uma das grandes problemáticas para o controle de surtos de infecções hospitalares. A seleção realizada com a adição de um β -lactâmico acrescido de uma quinolona resultou na passagem de dois diferentes plasmídeos nos transconjugantes TC KPN535 e TC KPN537. A alta pressão seletiva em unidades hospitalares pode favorecer a transmissão de diferentes plasmídeos entre diferentes cepas. Vale ressaltar que devido aos processos de recombinação que ocorrem no genoma bacteriano, os genes de resistência podem migrar de um plasmídeo para o outro, dando origem a uma nova

estrutura genética capaz de carrear genes de resistência a diversas classes de antimicrobianos. Em estudo realizado na China, o sequenciamento completo do plasmídeo pKP048 proveniente de uma *K. pneumoniae* foi realizado, detectando a associação dos genes *bla*_{KPC-2}, *bla*_{DHA-1}, *qnrB4* e *armA*. A aquisição deste plasmídeo por outros isolados influenciaria no perfil de sensibilidade dos isolados a no mínimo três classes de antimicrobianos: os β -lactâmicos, visto que tanto a KPC-2 como a DHA-1 apresentam atividade contra esta classe de fármacos, as quinolonas e os aminoglicosídeos devido a presença da metilase ArmA (JIANG *et al.*, 2010). O plasmídeo que carrega o gene *bla*_{KPC-2} nos isolados KPN531 e KPN532 não foi transferido por conjugação, sendo necessária a realização da transformação bacteriana para obtenção dos isolados TF KPN531 e TF KPN532. Apesar do processo de aquisição de um DNA exógeno (transformação) ser um processo mais raro na célula bacteriana, o mesmo pode ocorrer possibilitando a célula receptora a adquirir importantes determinantes de resistência.

Análise da permeabilidade de membrana externa foi realizada através da investigação por SDS-PAGE das principais porinas relacionadas com a resistência aos antimicrobianos. Todos os isolados apresentaram ausência da OmpK35 e apenas a KPN529 não apresentou a OmpK36. Isolados que apresentam a carbapenemase do tipo KPC podem apresentar CIMs na faixa de sensibilidade aos carbapenêmicos dependendo do nível de expressão do gene *bla*_{KPC}. Acredita-se que para um alto nível de resistência aos carbapenêmicos, assim como a todos os β -lactâmicos, seja necessária a associação de diferentes mecanismos de resistência, como produção de β -lactamases, diminuição na expressão dos genes das porinas e a hiperexpressão de sistemas de efluxo (LANDMAN; BRATU; QUALE, 2009). A perda da OmpK35 está relacionada com a resistência às cefalosporinas, carbapenens, quinolonas e ao clorafenicol, e a perda ou diminuição da expressão da OmpK36 confere resistência aos carbapenêmicos, principalmente o meropenem e ertapenem (FERNANDÉZ; HANCOCK, 2012). Kitchel *et al.* (2010) ao estudarem os fatores genéticos envolvidos com a resistência aos carbapenêmicos detectaram que isolados com maiores CIMs a esta classe de drogas, apresentaram perda das duas principais porinas (OmpK35 e OmpK36).

A investigação dos genes *ompK35* e *ompK36* foi realizada a fim de determinar o motivo da ausência da OmpK35 e detectar alguma mutação que altere as cargas nas cadeia de aminoácidos, influenciando desta forma a funcionalidade da porina. Em quatro isolados (KPN529, KPN530, KPN535 e KPN537) a alteração da matriz de leitura da *ompK35* foi o motivo da ausência da OmpK35 no gel de SDS-PAGE. Uma sequência de inserção, *IS1*, se inseriu na região *upstream* (pos-5) ao códon de iniciação do gene da porina investigada. A presença de uma sequência de inserção entre a região promotora e o códon de iniciação altera a expressão gênica do gene da *ompK35* visto que o primeiro códon de iniciação detectado pela RNA polimerase será da *IS1* e não do gene da porina. A inserção de IS interrompendo os genes das porinas é uma das principais causas da perda das proteínas de membrana externa. Doumith *et al.* (2009) ao analisarem a sequência dos genes das porinas *ompk35* e *ompk36* de enterobactérias resistentes ao ertapenem, verificaram que a presença da *IS1* entre isolados de *K. pneumoniae* era a causa mais frequente para a inativação da Ompk35. Nos isolados KPN531 e KPN532 a inserção da *IS1* não foi verificada, sendo apenas visualizada a presença de substituição de alguns aminoácidos na cadeia polipeptídica. A causa para ausência da OmpK35 nos isolados KPN531 e KPN532 não foi determinada. Provavelmente, alterações pós-traducionais ou diminuição na expressão da *ompK35* podem estar relacionadas com a ausência desta proteína de membrana no gel de SDS-PAGE. Quanto à análise da Ompk36, apenas o isolado KPN529 apresentou a inserção de uma *IS903* no meio do gene da porina, tornando o mesmo não funcional. Apesar de ser o único isolado com deficiência nas duas principais porinas, a KPN529 não apresentou diferença significativa na CIM para os carbapenêmicos quando comparado aos outros isolados. Acreditamos que outras porinas envolvidas com a entrada dos carbapenêmicos possam existir em isolados de *K. pneumoniae*, fazendo com que a célula não sofra tanta influência do gene da Ompk36 disrupto. Entretanto mais estudos devem ser realizados para se obter a completa elucidação da resistência bacteriana aos carbapenêmicos mediada pela perda de porinas.

A investigação de alguns genes relacionados com a virulência bacteriana foi realizada, a fim de verificar se o desfecho clínico dos pacientes estava

envolvido com a produção de fatores de virulência. Entretanto ao longo do estudo não foram realizados testes fenotípicos que comprovassem a expressão do fenótipo dos genes detectados por técnicas moleculares.

Os isolados apresentaram antígenos capsulares característicos do sorotipo K2. *K. pneumoniae* K2 são menos virulentos que isolados K1, causando doenças de base com menor complexidade em unidades hospitalares. Nosso resultado corrobora com os achados até então publicados, visto que estudos com virulência em *Klebsiella* spp. até então, não identificaram a presença de isolados produtores de KPC pertencentes ao sorotipo K1. A presença da cápsula polissacarídica é um dos principais fatores de virulência em isolados de *K. pneumoniae*. Sua presença também pode mediar a resistência às polimixinas, limitando desta forma as opções terapêuticas. Quando cultivados em meio de cultura sólido e rico em nutrientes (Ágar Sangue), os isolados não se demonstraram mucóides. Apesar da não realização da qRT-PCR para os genes codificadores de cápsula, nem testes fenotípicos para extração e quantificação da cápsula polissacarídica, acreditamos que estes isolados apresentem produção basal da cápsula bacteriana, visto que sua hiper-produção resultaria em isolados hiper-mucóides quando cultivados em meio de cultura.

A presença dos genes codificadores das fímbrias do tipo I e III foi verificada em todos os isolados com amplificação seguida de sequenciamento dos genes *fimH* e *mrKD*. Ramos *et al.* (2014) ao analisar o genoma completo da KP13 (isolados de *K. pneumoniae* produtor de KPC responsável por severos surtos de infecções hospitalares na região sul do Brasil), também detectaram a presença de ambas as fímbrias no genoma da bactéria analisada. A presença dos dois tipos de fímbrias confere uma importante vantagem seletiva ao micro-organismo já que dependendo do sítio anatômico onde a bactéria esteja colonizando e/ou infectando cada fímbria proporcionará uma maior capacidade de fixação no tecido hospedeiro (WILSON *et al.*, 2002). Enquanto as fímbrias do tipo I estão mais relacionadas com a adesão uroepitelial, as fímbrias do tipo III são mais comumente relacionadas à produção de biofilmes. Ambas as características são essenciais para a manutenção e propagação do hospedeiro (RAMOS *et al.*, 2014; STRUVE; BOJER; KROGFELT, 2008). Apesar de mais prevalentes, as fímbrias do tipo I e III não são as únicas detectadas entre

isolados de *K. pneumoniae*. Uma análise comparativa do genoma de diferentes cepas que tiveram seu genoma completamente sequenciado revelou a presença de mais de 30 genes envolvidos com a regulação de fímbrias na célula bacteriana (RAMOS *et al.*, 2014).

Nos isolados KPN531 e KPN532 o gene *uge* que compõe o operon da uréase foi detectado. Em alguns patógenos, como o *Helicobacter pylori*, o operon da uréase está envolvido na degradação de uréia em amônia e carbamato. Após algum tempo a molécula de carbamato é espontaneamente convertida em ácido carbônico. A presença de ácido carbônico e amônia em solução funciona como solução tampão, minimizando a diminuição do pH. Desta forma o micro-organismos não sofre influência do pH ácido do meio a que está submetido (AKADA *et al.*, 2000). Acreditamos que quando expresso, o operon da uréase confira a vantagem de suportar ambientes com pH mais baixo a *K. pneumoniae*, o que representa um importante mecanismos de adaptabilidade visto que em casos de septicemia, a acidose metabólica é uma das formas que o organismo encontra para tentar conter a infecção (KAKIMUNA *et al.*, 2007).

A detecção de genes de virulência nos isolados estudados deve ser considerada apenas um passo inicial para o estudo mais aprofundado da virulência bacteriana em isolados produtores de KPC. Pela ausência de testes fenotípicos, podemos pouco predizer sobre a virulência nas *K. pneumoniae* estudadas. Faz-se necessário a investigação de outros genes envolvidos com virulência, testes fenotípicos (utilizando modelo *in-vivo*), assim como a determinação da expressão dos principais genes detectados;

8. CONCLUSÕES

8 CONCLUSÕES

- a) O perfil MDR observado através do perfil de sensibilidade dos isolados pode ser reflexo da alta pressão seletiva a que esses microrganismos estão sendo expostos na unidade hospitalar estudada;
- b) A Polimixina B, tigeciclina e amicacina apresentaram-se como possíveis opções terapêuticas para os isolados de *K. pneumoniae* produtores de carbapenemase estudados, demonstrando todos os patógenos sensibilidade aos estes antimicrobianos;
- c) A presença de sub- clones dentro de uma mesma UTI alerta-nos para a alta capacidade de evolução genética dos micro-organismos, fato este que deve ser atribuído a grande plasticidade do seu genoma;
- d) A análise de MLST realizada evidenciou a presença de dois *sequence types* (ST340 e ST11) entre os isolados do estudo, pertencentes ao complexo clonal CC258, entretanto até então, pouco prevalentes no território brasileiro;
- e) Apesar de relacionados e pertencentes ao mesmo complexo clonal, dois dos nossos isolados apresentaram características fenotípicas e genotípicas (quanto à resistência) distintas, o que pode ser resultado da seleção de diferentes bactérias MDR dentro da unidade hospitalar estudada;
- f) Diferentes mecanismos de resistência plasmidiais e cromossomais foram detectados conferindo o fenótipo MDR apresentado pelos isolados bacterianos;
- g) A aquisição da carbapenemase do tipo KPC foi o principal mecanismo de resistência aos β -lactâmicos observados nos isolados;

- h) Assim como em outros estudos, as β -lactamases SHV e CTX também foram detectadas nos isolados produtores com KPC, o que sugere uma alta associação destas enzimas com micro-organismos produtores de carbapenemase;
- i) A presença da CTX-M-15 na maior parte dos isolados pode ser resultado da disseminação nacional de um clone de *K. pneumoniae* multirresistente que carregue o *bla*_{CTX-M-15}, visto que isolados pertencentes ao mesmo ST foram detectados carregando a mesma variante de CTX em outras regiões do Brasil;
- j) Mutações em *gyrA* e *parC* foram o principal mecanismo de resistência as quinolonas observadas ao longo do estudo;
- k) Apesar da baixa prevalência em território brasileiro, o gene *qnr* foi detectado em nosso estudo, contribuindo de forma secundária para o aumento das CIMs para as quinolonas;
- l) A variante *qnrB19* foi detectada em dois de nossos isolados, tratando-se do primeiro relato de associação do gene *bla*_{KPC} e *qnrB19* em um mesmo isolado no Brasil;
- m) A produção de enzimas modificadoras foi o principal mecanismo de resistência aos aminoglicosídeos detectado em nosso estudo. Genes codificadores de adenilases e acetilases foram detectados, em sua maioria, sendo carregados por integron de classe 1;
- n) Apesar da detecção de genes de resistência aos aminoglicosídeos, apenas dois isolados apresentaram resistência a gentamicina, o que pode ser atribuído a presença da acetilase AAC(6')-31, enzima esta até então pouco reportada no Brasil;
- o) A localização plasmidial do e dos genes *bla*_{KPC}, *bla*_{CTX-M}, *qnrB19*, associada a sua capacidade de transmissão alerta-nos para a

- disseminação destes determinantes de resistência intra ou inter-espécies no território brasileiro;
- p) A tipagem plasmidial e sua posterior classificação nos grupos de incompatibilidade nos permitiu verificar a variabilidade genética dos plasmídeos que carregam determinantes de resistência no Brasil, uma vez que diferentes Incs são rotineiramente associados com a disseminação do *bla_{KPC}*;
- q) O perfil MDR apresentado pelos isolados é conferido pela associação de diferentes mecanismos de resistência, apresentando a perda das principais porinas (OmpK35 e OmpK36) papel determinante para o alto nível de resistência apresentado pelos isolados;
- r) A detecção de genes envolvidos com a produção de fímbrias e especialmente a presença do operon da uréase em dois dos nossos isolados sugerem uma capacidade de fixação e de adaptação dos micro-organismos em ambientes adversos;

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, E. P. *et al.* Further observations on penicillin. **Lancet**, London, v. 2, p. 177-189, 1941.
- AIRES, C.A.M. **Identificação do perfil fenotípico e dos determinantes de resistência a carbapenêmicos em três isolados nosocomiais de *Providencia stuartii***, 2013. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Pernambuco, 2013.
- AKADA, J. K. *et al.* Identification of the urease operon in *Helicobacter pylori* and its control by mRNA decay in response to pH. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 36, n. 5, p. 1071-1084, 2000.
- ALBA, J. *et al.* Kinetics study of KPC-3, a plasmid-encoded class A carbapenem-hydrolyzing β -lactamase. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v.49, p.4760-4762,2005.
- ALMEIDA, A. C. S. *et al.* First description of KPC-2-producing *Pseudomonas putida* in Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 56, n. 4, p. 2205-2206, Abr 2012a.
- ALMEIDA, A. C. S. *et al.* Escherichia coli ST502 and Klebsiella pneumoniae ST11 sharing an IncW plasmid harbouring the bla(KPC-2) gene in an Intensive Care Unit patient. **International journal of antimicrobial agents**, Amsterdam, v. 40, n. 4, p. 374-376, Out 2012b.
- AMBLER, P. A standard numbering scheme for the class a beta-lactamases. **Journal Biochemical**, London, v. 276, n. 1990, p. 1990-1991, 1991.
- ANDERSON, K. F. *et al.* Evaluation of methods to identify the Klebsiella pneumoniae carbapenemase in Enterobacteriaceae. **Journal of clinical microbiology**, v. 45, n. 8, p. 2723-2725, Ago 2007.
- ANDRADE, L. N. *et al.* Dissemination of blaKPC-2 by the spread of Klebsiella pneumoniae clonal complex 258 clones (ST258, ST11, ST437) and plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among Enterobacteriaceae species in Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 55, n. 7, p. 3579-3583, Jul 2011.
- APPELBAUM P. C.; HUNTER, P. A. The fluorquinolone antibacterial: past, present and future perspectives. **International Journal Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v.16, p.5-15, 2000.
- ARROYO, L. A *et al.* The pmrCAB operon mediates polymyxin resistance in *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 and clinical isolates through phosphoethanolamine modification of lipid A. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 55, n. 8, p. 3743–3751, Ago. 2011.
- BALL, P. Quinolone generations: natural history or natural selection? **Journal of antimicrobial chemotherapy**, London, v. 46 Suppl T, p. 17-24, Jul 2000.

BARANIAK, A. *et al.* Molecular characteristics of KPC-producing Enterobacteriaceae at the early stage of their dissemination in Poland, 2008-2009. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 55, n. 12, p. 5493–9, Dez. 2011.

BERGEN P.J. *et al.* Colistin methanesulfonate is an inactive prodrug of colistin against *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob agents chemotherapy**, Washington, v. 50, n.6, p.1953-1958, 2005.

BIKARD, D. *et al.* The synthetic integron: an in vivo genetic shuffling device. **Nucleic acids research**, London, v. 38, n. 15, p. 1-7, Ago 2010.

BLONDEAU, J.M. Fluorquinolones: Mechanism of action, classification, and development of resistance. **Survey of Ophthalmology**, Boston, v.49, p. 73-78, 2004.

BRADFORD, P. A. Extended-Spectrum β -Lactamases in the 21st Century : Characterization , Epidemiology , and Detection of This Important Resistance Threat. **Clinical Microbiology reviews**, Washington, v. 14, n. 4, p. 933-951, 2001.

BRATU, S. *et al.* Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, NY: molecular epidemiology and in vitro activity of polymyxin B and other agents. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, London, v. 56, n. 1, p. 128-132, Jul 2005.

BREINES, D. *et al.* Quinolone resistance locus *nfxD* of *Escherichia coli* is a mutant allele of the *parE* gene encoding a subunit of topoisomerase IV. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 41, n. 1, p. 175, 1997.

BRISSE, S. *et al.* Virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*: identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization. **PloS one**, San Francisco, v. 4, n. 3, p. 4982-4995, Jan 2009.

BUENO, M. F. C. *et al.* Coproduction of 16S rRNA methyltransferase RmtD or RmtG with KPC-2 and CTX-M group extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 57, n. 5, p. 2397–2400, Maio 2013.

BUSH, K. Bench-to-bedside review: The role of beta-lactamases in antibiotic-resistant Gram-negative infections. **Critical care**, London, v. 14, n. 3, p. 224-232, Jan 2010.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of beta-lactamases. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 54, n. 3, p. 969-976, Mar 2010.

CAMBRAY, G.; GUEROUT, A.M.; MAZEL, D. Integrons. **Annual review of genetics**, Palo Alto, v. 44, n. August, p. 141–166, Jan. 2010.

CAMPOS, M. A. *et al.* Capsule Polysaccharide Mediates Bacterial Resistance to Antimicrobial Peptides Capsule Polysaccharide Mediates Bacterial

Resistance to Antimicrobial Peptides. **Infection and Immunity**, Washington, v. 72, n. 12, p. 7107–7114, 2004.

CANTÓN, R.; COQUE, T. M. The CTX-M beta-lactamase pandemic. **Current opinion in microbiology**, New York, v. 9, n. 5, p. 466–475, Out. 2006.

CAO, V. *et al.* Distribution of Extended-Spectrum β -Lactamases in Clinical Isolates of Enterobacteriaceae in Vietnam. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 46, n. 12, p. 3739-3743, 2002.

CARATTOLI, A. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 53, n. 6, p. 2227-2238, Jun 2009.

CARATTOLI, A. *et al.* Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. **Journal of microbiological methods**, Amsterdam, v. 63, n. 3, p. 219-228, Dez 2005.

CARVALHO-ASSEF, A. P. D. *et al.* Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, London, v. 68, n. 12, p. 2956–2957, Dez. 2013.

CASTANHEIRA, M. *et al.* First report of plasmid-mediated *qnrA1* in a ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* strain in Latin America. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 51, n. 4, p. 1527-1529, Abr 2007.

CASTANHEIRA, M. *et al.* Expansion of clonal complex 258 KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Latin American hospitals: report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 56, n. 3, p. 1668–1669, Mar. 2012.

CAVACO, L. M. *et al.* *qnrD*, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and Bovismorbificans strains of human origin. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 53, n. 2, p. 603–608, Fev. 2009.

CAVALCANTI, F. L. D. S. *et al.* Changing the epidemiology of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian teaching hospital: the replacement of São Paulo metallo- β -lactamase-producing isolates. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 107, n. 3, p. 420–423, Maio 2012.

CATTOIR, V. *et al.* Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, London, v. 60, n. 2, p. 394–397, Ago. 2007.

CERGOLE-NOVELLA, M.C. *et al.* First description of *bla*_{CTX-M-14} and *bla*_{CTX-M-15} producing *Escherichia coli* isolates in Brazil. **Microbial Drug Resistance**, Larchmont, v. 16, n.3, p. 177-184, Set 2010.

CHAMBERS, H. F. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. **Clinical microbiology reviews**, Washington, v. 10, n. 4, p. 781-791, Out 1997.

CHMELNITSKY, I. *et al.* Plasmid-mediated *qnrB2* and carbapenemase gene *bla*_(KPC-2) carried on the same plasmid in carbapenem-resistant ciprofloxacin-susceptible *Enterobacter cloacae* isolates. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 52, n. 8, p. 2962–2965, Ago. 2008.

CHOWDHURY, R. P. *et al.* Dissemination of multiple drug resistance genes by class 1 integrons in *Klebsiella pneumoniae* isolates from four countries: a comparative study. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 55, n. 7, p. 3140–3149, Jul. 2011.

CLINICAL AND LABORATORIES STANDARDS INSTITUTE (Estados Unidos). **Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactérias de crescimento aeróbico**. New York, 2012.

CLINICAL AND LABORATORIES STANDARDS INSTITUTE (Estados Unidos). **Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactérias de crescimento aeróbico**. New York, 2013.

COLLIS, C. M.; HALL, R. . Site-Specific Deletion and Rearrangement of Integron Insert Genes Catalyzed by the Integron DNA Integrase. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 174, n. 5, p. 1574-1585, 1992.

CONNELL, H. *et al.* Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract. **Medical Sciences**, London, v. 93, n.87, p. 9827–9832, 1996.

CURCIO, D. *et al.* Indications of a new antibiotic in clinical practice: results of the tigecycline initial use registry. **Brazilian Journal Infectious Diseases**, Salvador, v.12, n. 3, p.198-201, 2008.

CUZON, G.; NAAS T.; NORDMANN, P. Functional characterization of Tn4401, a Tn3-based transposon involved in *bla*_{KPC} gene mobilization. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 55, n. 11, p. 5370-5373, Nov 2011.

CUZON, G. *et al.* Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produce beta-lactamase *bla*_{KPC-2} gene. **Emerging infectious diseases**, Atlanta, v. 16, n. 9, p. 1349-1356, Set 2010.

DEAN, C. R. *et al.* Efflux-Mediated Resistance to Tigecycline (GAR-936) in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 47, n. 3, p. 972–978, 2003.

DEL-PELOSO, P. F.; BARROS, M. F. L.; SANTOS, F. A. Sepsis por *Serratia marcescens* KPC. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 46, n. 5, p. 365–367, 2010.

DHILLON, R. H.P.; CLARK, J. ESBLs: A Clear and Present Danger? **Critical care research and practice**, London, v. 2012, p. 1-11, Jan 2012.

DAMJANOVA, I. *et al.* Expansion and countrywide dissemination of ST11, ST15 and ST147 ciprofloxacin-resistant CTX-M-15-type beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* epidemic clones in Hungary in 2005 - the new

“MRSAs”? **Journal of antimicrobial chemotherapy**, London, v. 62, n. 5, p. 978–985, Nov. 2008.

DOI, Y.; ARAKAWA, Y. 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. **Clinical infectious diseases**, Chicago, v. 45, n. 1, p. 88–94, 1 Jul. 2007.

DOMÉNECH-SÁNCHEZ, A. *et al.* Role of *Klebsiella pneumoniae* OmpK35 Porin in Antimicrobial Resistance. **Role of *Klebsiella pneumoniae* OmpK35 Porin in Antimicrobial Resistance**. 2003.

DOUMITH, M. *et al.* Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* spp. and *Enterobacter* spp. clinical isolates from the UK. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, London, v. 63, n. 4, p. 659–667, Abr 2009.

DRAWZ, S. M.; BONOMO, R. A. Three decades of beta-lactamase inhibitors. **Clinical microbiology reviews**, Washington, v. 23, n. 1, p. 160–201, Jan 2010.

DRLICA, K.; ZHAO, X. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v.61,p.377-392,1997.

DURANTE-MANGONI, E. *et al.* Do we still need the aminoglycosides? **International journal of antimicrobial agents**, Amsterdam, v. 33, n. 3, p. 201–205, Mar. 2009.

EL-SALABI, A. *et al.* Genetic and biochemical characterization of a novel metallo- β -lactamase, TMB-1, from an *Achromobacter xylosoxidans* strain isolated in Tripoli, Libya. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 56, n. 5, p. 2241–2255, Maio 2012.

EMMERSON, A. M.; JONES, A M. The quinolones: decades of development and use. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, London, v. 51, p. 13–20, Maio 2003.

EVERETT, M. J. *et al.* Contribution of individual mechanisms to fluorquinolones resistance in 36 *E. coli* strains isolated from humans and animals. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v.40, p.2380-2386, 1996.

FAINSTEIN, V.; WEAVER, S.; BODEY, G. P. Comparative in vitro study of Comparative In Vitro Study of SQ26 , 776. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 21, n. 2, p. 294–298, 1982.

FALAGAS, M. E.; KASIAKOU, S. K. Toxicity of polymyxins: a systematic review of the evidence from old and recent studies. **Critical care**, London, v. 10, n. 1, p. 27, Fev. 2006.

FANG, C. T. *et al.* A novel virulence gene in *Klebsiella pneumoniae* strains causing primary liver abscess and septic metastatic complications. **The Journal of experimental medicine**, Rockefeller, v. 199, n. 5, p. 697–705, Mar. 2004.

FERNÁNDEZ, L.; HANCOCK, R. E. W. Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. **Clinical microbiology reviews**, Washington, v. 25, n. 4, p. 661–681, Out. 2012.

FERRARI, R. *et al.* Plasmid-mediated quinolone resistance by genes *qnrA1* and *qnrB19* in *Salmonella* strains isolated in Brazil. **Journal of Infectious in Developing Countries**, Sassari, v.5, n.6, p.496-498, 2011.

FINLAND, M. Changing patterns of resistance of certain common pathogenic bacteria to antimicrobial agents. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 252, p. 570-580, 1955.

FLUIT, A. C.; VISSER, M. R.; SCHMITZ, F. Molecular Detection of Antimicrobial Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 14, n. 4, 2001.

FUKUDA, H.; KISHII, R.; MASAYA-TAKEI, A. M. H. Contributions of the 8-Methoxy Group of Gatifloxacin to Resistance Selectivity , Target Preference , and Antibacterial Activity against *Streptococcus pneumoniae*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 45, n. 6, p. 1649–1653, 2001.

GALES, A. C. *et al.* Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). **Diagnostic microbiology and infectious disease**, New York, v. 73, n. 4, p. 354–360, Ago. 2012.

GARCÍA-SUREDA, L. *et al.* Role of *Klebsiella pneumoniae* LamB Porin in antimicrobial resistance. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 55, n. 4, p. 1803-1805, Abr 2011a.

GARCÍA-SUREDA, L. *et al.* OmpK26, a novel porin associated with carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 55, n. 10, p. 4742-4747, Out 2011b.

GIANI, T. *et al.* Emergence in Italy of *Klebsiella pneumoniae* sequence type 258 producing KPC-3 Carbapenemase. **Journal of clinical microbiology**, v. 47, n. 11, p. 3793–3794, Nov. 2009.

GIRARDELLO, R.; GALES, A. C. Resistência às Polimixinas : velhos antibióticos , últimas opções terapêuticas. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecções**, Santa Cruz do Sul, v. 2, n. 2, p. 66–69, 2012.

GIEDRAITIENĖ, A. *et al.* Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. **Medicina**, Kaunas, v. 47, n. 3, p. 137-146, Jan 2011.

GILLINGS, M. *et al.* The evolution of class 1 integrons and the rise of antibiotic resistance. **Journal of bacteriology**, Washington, v. 190, n. 14, p. 5095–5100, Jul. 2008.

GOODERHAM, W. J.; HANCOCK, R. E. W. Regulation of virulence and antibiotic resistance by two-component regulatory systems in *Pseudomonas aeruginosa*. **FEMS microbiology reviews**, Amsterdam, v. 33, n. 2, p. 279–294, Mar. 2009.

GOTZ, A. *et al.* Detection and characterization of broad-host-range plasmids in environmental bacteria by PCR. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 2621–2628, 1996.

GUAN, X. *et al.* Plasmid-mediated quinolone resistance - current knowledge and future perspectives. **Journal of international medical research**, Northampton, v. 41, n. 1, p. 20-30, Mar 2013.

GUIMARÃES, A. C. *et al.* Clonal spread of carbapenem-resistant *Serratia marcescens* isolates sharing an IncK plasmid containing *bla*_{KPC-2}. **International journal of antimicrobial agents**, Amsterdam, v. 42, n. 4, p. 369–370, Oct. 2013.

GUPTA, N. *et al.* Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: epidemiology and prevention. **Clinical infectious diseases**, Chicago, v. 53, n. 1, p. 60–67, 1 Jul. 2011.

HANCOCK, R. E. Peptide antibiotics. **Lancet Reviews**, London, v. 349, n. 9049, p. 418-422, 1997.

HENNEQUIN, C. *et al.* Antibiotic resistance and plasmid transfer capacity in biofilm formed with a CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* isolate. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, London, v. 67, n. 9, p. 2123-2130, Sep 2012.

HERNÁNDEZ, A.; SÁNCHEZ, M. B.; MARTÍNEZ, J. L. Quinolone resistance: much more than predicted. **Frontiers in microbiology**, Charlott, v. 2, n. 2, p. 22, Jan. 2011.

HIDEYUKI, F.; RYUTA, H.; MASAYA-TAKEI, A. M. H. Contributions of the 8-Methoxy Group of Gatifloxacin to Resistance Selectivity, Target Preference, and Antibacterial Activity against *Streptococcus pneumoniae*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 45, n. 6, p. 1649-1653, 2001.

HIRSCH, E. B.; TAM, V. H. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, London, v. 65, n. 6, p. 1119–1125, Jun. 2010.

HOPKINS K. L.; DAVIES R. H.; THRELFALL E. J. Mechanisms of quinolone resistance in *E. coli* and *Salmonella*: recent developments. **Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 25, n.3, p. 358-373, 2005.

HSU, C. R. *et al.* The role of *Klebsiella pneumoniae* *rmpA* in capsular polysaccharide synthesis and virulence revisited. **Microbiology**, England, v. 157, n. 12, p. 3446-3457, Dez 2011.

HOOPER, D. C. Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 7, p.337-341, 2001

HU, Y. *et al.* Emergence of *Proteus mirabilis* harboring *bla*_{KPC-2} and *qnrD* in a Chinese Hospital. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 56, n. 5, p. 2278–2282, Maio 2012.

HUANG, L. *et al.* First gene cassettes of integrons as targets in finding adaptive genes in metagenomes. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 75, n. 11, p. 3823-3825, Jun 2009.

HUNT, J. J.; WANG, J. T.; CALLEGAN, M. C. Contribution of mucoviscosity-associated gene A (*magA*) to virulence in experimental *Klebsiella pneumoniae* endophthalmitis. **Investigative ophthalmology and visual science**, St. Louis, v. 52, n. 9, p. 6860-6866, Ago 2011.

JÁCOME, P. R. L. D. A. *et al.* First report of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 56, n. 9, p. 4990, Set 2012.

JIANG, Y. *et al.* Complete nucleotide sequence of *Klebsiella pneumoniae* multidrug resistance plasmid pKP048, carrying *bla*_{KPC-2}, *bla*_{DHA-1}, *qnrB4*, and *armA*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 54, n. 9, p. 3967–3969, Set. 2010.

JONES, R. N. *et al.* Original article Susceptibility rates in Latin American nations : report from a regional resistance surveillance program (2011). **The Brazilian Journal Infectious Diseases**, Salvador, v. 7, n. 6, p. 672–681, 2013

IZQUIERDO, L. *et al.* The *Klebsiella pneumoniae wabG* Gene : Role in Biosynthesis of the Core Lipopolysaccharide and Virulence. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 185, n. 24, p. 7213–7221, 2003.

KADLEC, K.; SCHWARZ, S. Analysis and distribution of class 1 and class 2 integrons and associated gene cassettes among *Escherichia coli* isolates from swine, horses, cats and dogs collected in the BfT-GermVet monitoring study. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, London, v. 62, n. 3, p. 469-473, Set 2008.

KIESER T. Factors affecting the isolation of CCA DNA from *Streptomyces lividans* and *Escherichia coli*. **Plasmid**, New York, v. 12, p. 19-36, 1984.

KITCHEL, B. *et al.* Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: clonal expansion of multilocus sequence type 258. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 53, n. 8, p. 3365–3370, Ago. 2009.

KLEMM, P.; SCHEMBRI, M.A. Bacterial adhesins: function and structure. **International Journal of Microbiology**, Stuttgart, v. 290, n. 1, p. 27-35, 2000.

KO, K. S. *et al.* High rates of resistance to colistin and polymyxin B in subgroups of *Acinetobacter baumannii* isolates from Korea. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, London, v. 60, n. 5, p. 1163–1167, Nov. 2007.

LANDMAN, D.; BRATU, S.; QUALE, J. Contribution of OmpK36 to carbapenem susceptibility in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of medical microbiology**, Edinburgh, v. 58, n. 10, p. 1303–1308, Out. 2009.

LASCOLS, C *et al.* Surveillance and molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* that produce carbapenemases; the first report of OXA-48-like

- enzymes in North America. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 57, n. 1, p. 130–136, Out. 2012.
- LE, J. *et al.* Clonal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase KPC-3 in Long Beach, California. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 48, n. 2, p. 623–625, Fev. 2010.
- LEÃO, R. S. *et al.* KPC-2 producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* co-infection in a catheter-related infection. **Clinical microbiology and infection**, Oxford, v. 17, n. 3, p. 380–382, Mar. 2011.
- LEAVITT, A. *et al.* Molecular epidemiology, sequence types, and plasmid analyses of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Israel. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 54, n. 7, p. 3002–3006, Jul 2010.
- LESHER, G.Y. *et al.* 1,8-Naphtiridine derivates. A new class os chemotherapeutic agents. **Journal of Medicinal and Pharmaceutical Chemistry**, Washington, v.91, p.1063-1065, 1962.
- LI, X.Z.; Quinolone resistance in bacteria: emphasis on plasmid-mediated mechanisms. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v.25,p.453-463, 2005.
- LIU, B.T. *et al.* Plasmid-mediated quinolone resistance determinants *oqxAB* and *aac(6)-Ib-cr* and extended-spectrum β -lactamase gene *bla*_{CTX-M-24} co-located on the same plasmid in one *Escherichia coli* strain from China. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, London, v. 66, n. 7, p. 1638–1639, Jul. 2011.
- LINCOPAN, N. *et al.* First Isolation of Metallo-B-Lactamase-Producing Multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from a Patient in Brazil. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 43, n. 1, p. 516–519, 2005.
- LIRAS, P.; MARTÍN, J. F. Gene clusters for beta-lactam antibiotics and control of their expression: why have clusters evolved, and from where did they originate? **International microbiology**, Barcelona, v. 9, n. 1, p. 9-19, Mar 2006.
- LLOBET, E.; TOMÁS, J. M.; BENGOCHEA, J. A. Capsule polysaccharide is a bacterial decoy for antimicrobial peptides. **Microbiology**, England, v. 154, n. 12, p. 3877–3886, Dez. 2008.
- LOMAESTRO, B. M. *et al.* The spread of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* to upstate New York. **Clinical infectious diseases**, Chicago, v. 43, n. 3, p. 26–28, Ago. 2006.
- LOPES, A. C. S. *et al.* *bla*_(CTX-M-2) and *bla*_(CTX-M-28) extended-spectrum beta-lactamase genes and class 1 integrons in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, n. 2, p. 163–167, Mar. 2010.
- MA, L. *et al.* Genomic Heterogeneity in *Klebsiella pneumoniae* Strains Is Associated with Primary Pyogenic Liver Abscess and Metastatic Infection. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 192, p. 117–128, 2005.

MACHADO, E. *et al.* Preservation of integron types among Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases in a Spanish hospital over a 15-year period (1988 to 2003). **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 51, n. 6, p. 2201-2204, Jun 2007.

MAGALHÃES, V. *et al.* Metallo- β -Lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated in hospitals in Recife, PE, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 36, p. 123–125, 2005.

MAMMERI, H. *et al.* Emergence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance in *Escherichia coli* in Europe. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 49, n. 1, p. 71-76, 2005.

MARÍN, M.; GUDIOL, F. Antibióticos betalactámicos. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, Barcelona, v. 21, n. 1, p. 42–55, Jan. 2003.

MÁRQUEZ, C. *et al.* Urinary tract infections in a South American population: dynamic spread of class 1 integrons and multidrug resistance by homologous and site-specific recombination. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 46, n. 10, p. 3417–3425, Out. 2008.

MARTÍNEZ, J.; MARTÍNEZ, L. How are gene sequence analyses modifying bacterial taxonomy? The case of *Klebsiella*. **International Microbiology**, Barcelona, v. 7, p. 261-268, 2004.

MAZEL, D. *et al.* Antibiotic resistance in the ECOR collection: integrons and identification of a novel *aad* gene. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 44, n. 6, p. 1568-1574, Jun 2000.

MAZEL D. Integrons: Agents of bacterial evolution. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 4, p. 608-620, Ago 2006.

MENDES, C. A. C.; BURDMANN, E. A. Polimixinas - revisão com ênfase na sua nefrotoxicidade. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 55, n. 6, p. 752–759, 2009.

MENDES, R. E. *et al.* Characterization of an integron carrying *bla*_{IMP-1} and a new aminoglycoside resistance gene, *aac*(6')-31, and its dissemination among genetically unrelated clinical isolates in a Brazilian hospital. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 51, n. 7, p. 2611–2614, Jul. 2007.

MILLER, A. K. *et al.* PhoQ mutations promote lipid A modification and polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* found in colistin-treated cystic fibrosis patients. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 55, n. 12, p. 5761–5769, Dez. 2011.

MINARINI, L. A. R. Mutations in the quinolone resistance-determining regions of GyrA e ParC in Enterobacteriaceae isolates from Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, p. 1309-1314, 2012.

MINARINI, L. A. R.; GALES, ANA C; DARINI, A. L. C. First report of plasmid-mediated resistance to quinolones and cefotaxime in an *Enterobacter cloacae*

strain isolated from an outpatient in Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 51, n. 1, p. 401-402, Jan 2007.

MINARINI, L. A. R. **Estudo dos mecanismos de resistência às quinolonas em enterobactérias isoladas de alguns estados brasileiros Estudo dos mecanismos de resistência às quinolonas em enterobactérias isoladas de alguns estados brasileiros**, 2008. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, 2008.

MINARINI, L. A. R. *et al.* Predominance of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase genes among enterobacterial isolates from outpatients in Brazil. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, New York, v. 65, n. 2, p. 202–206, Out. 2009.

MOELLERING, R. C. The Fluoroquinolones : The Last Samurai ? **Clinical infectious diseases**, Chicago, v. 41, n. 2, p. 111–112, 2005.

MONTEIRO, J. *et al.* First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 53, n. 1, p. 333-334, Jan 2009.

MUNOZ-PRICE, L. S.; WEINSTEIN, R. A. *Acinetobacter Infection*. **Pediatric Infectious Disease Journal**, Baltimore, v. 27, n. 6, p. 577–578, Jun. 2008.

NAAS, T; POIREL, L; NORDMANN, P. Minor extended-spectrum beta-lactamases. **Clinical microbiology and infection**, Oxford, v. 14, p. 42-52, Jan 2008.

NAAS, T. *et al.* Genetic structures at the origin of acquisition of the beta-lactamase bla_{KPC} gene. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 52, n. 4, p. 1257-1263, Abr 2008.

NAAS, T. *et al.* Role of IS_{Kpn7} and deletions in bla_{KPC} gene expression. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 56, n. 9, p. 4753–4759, Set. 2012.

NAGANO, N. *et al.* Nosocomial transmission of CTX-M-2 beta-lactamase-producing in *Acinetobacter baumannii* in a neurosurgery ward. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v.42, p. 3978-3984, 2004.

NAVON-VENEZIA, S. *et al.* Dissemination of the CTX-M-25 family beta-lactamases among *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae* and identification of the novel enzyme CTX-M-41 in *Proteus mirabilis* in Israel. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 62, n. 2, p. 289–95, ago. 2008.

NAVARRÉ W.W. *et al.* Co-regulation of *Salmonella enterica* genes required for virulence and resistance to antimicrobial peptides by SlyA and PhoP/PhoQ. **Molecular Microbiology**, v. 56, n. 2, p.492–508, 2005.

NORDMANN, P; POIREL, L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. **Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, Oxford, v. 8, n. 6, p. 321-331, Jun 2002.

OLIVEIRA, F. P.; CIPULLO, P.; BURDMANN, E. A. Nefrotoxicidade dos aminoglicosídeos. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, São Paulo, v. 21, n. 4, p. 444–452, 2006.

OTEO, J. *et al.* Emergence of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* of multilocus sequence types 1, 11, 14, 17, 20, 35 and 36 as pathogens and colonizers in newborns and adults. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 64, p. 524-28, 2009.

PAIVA, M. C. *et al.* The first report of the *qnrB19*, *qnrS1* and *aac(6')-Ib-cr* genes in urinary isolates of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 107, n. 5, p. 687-689, Ago 2012.

PAN, Y. J. *et al.* Capsular polysaccharide synthesis regions in *Klebsiella pneumoniae* serotype K57 and a new capsular serotype. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 46, n. 7, p. 2231–2240, Jul. 2008.

PAPADIMITRIOU-OLIVGERIS, M. *et al.* KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* enteric colonization acquired during intensive care unit stay: the significance of risk factors for its development and its impact on mortality. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 77, n. 2, p. 169-173, 2013.

PAPP-WALLACE, K. M. *et al.* Carbapenems: past, present, and future. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 55, n. 11, p. 4943-60, Nov 2011.

PATERSON, D. L.; BONOMO, R. A. Clinical Update Extended-Spectrum B-Lactamases : a Clinical Update. **Clinical Microbiology reviews**, Washington, v. 18, n. 4, p. 657-686, 2005.

PEIRANO, G. *et al.* Carbapenem-hydrolysing beta-lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, London, v. 63, n. 2, p. 265-268, Fev 2009.

PELEG, A. Y.; HOOPER, D. C. Hospital-Acquired Infections Due to Gram-Negative Bacteria. **New England Journal Medicine**, v. 362, n. 19, p. 1804–1813, 2010.

PEREIRA, P. S. *et al.* Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: spread of clonal complex 11 (ST11, ST437 and ST340). **Journal of antimicrobial chemotherapy**, London, p. 10-14, Out 2012.

PÉREZ-PÉREZ, F. J.; HANSON, N. D. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. **Journal Clinical Microbiology**, Washington, v. 40, n. 6, p.2153-2162, 2002.

PICÃO, R. C. **Estudo das β-lactamases envolvidas na resistência as cefalosporinas de amplo espectro em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa***, 2009. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Paulo, 2009.

- PICÃO, R. C. *et al.* Diversity of beta-lactamases produced by ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates causing bloodstream infections in Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 53, n. 9, p. 3908-3913, Set 2009.
- PICÃO, R. C. *et al.* The route of antimicrobial resistance from the hospital effluent to the environment: focus on the occurrence of KPC-producing *Aeromonas* spp. and Enterobacteriaceae in sewage. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, New York, v. 76, n. 1, p. 80–85, Maio 2013.
- PINSETA, F.R. **Sínte e relação estrutura-toxicidade de derivados aminoglicosídeos como potenciais protótipos na busca de uma fármaco seguro para o tratamento da Doença de Ménière**, 2010. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, 2010.
- PITOUT, J. D. D.; LAUPLAND, K. B. Enterobacteriaceae : an emerging public-health concern. **Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 8, n. 3, p. 159-166, 2008.
- PITOUT, J. D. D. *et al.* Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in the community. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, London, v. 56, n. 1, p. 52-59, Jul 2005.
- PODSCHUN, R.; ULLMANN, U. *Klebsiella* spp . as Nosocomial Pathogens : Epidemiology , Taxonomy , Typing Methods , and Pathogenicity Factors *Klebsiella* spp . as Nosocomial Pathogens : Epidemiology , Taxonomy , Typing Methods , and Pathogenicity Factors. **Clinical microbiology reviews**, Washington, v. 11, n. 4, p. 589-603, 1998.
- POIREL, L. *et al.* Molecular Analysis of Metallo- β -Lactamase Gene bla SPM-1 -Surrounding Sequences from Disseminated *Pseudomonas aeruginosa* Isolates in Recife , Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 48, n. 4, p. 1406–1409, 2004.
- POIREL, L. *et al.* Detection of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Kenya. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 55, n. 2, p. 934-936, Fev 2011.
- POOLE, K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. **Journal of Antimicrobial chemotherapy**, London, v. 56, p. 20–51, 2005.
- POTRON, A *et al.* European dissemination of a single OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* clone. **Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, Oxford, v. 17, n. 12, p. 24–26, Dez. 2011.
- POWER, P. *et al.* Description of In116, the first bla_{CTX-M-2}-containing complex class 1 integron found in *Morganella morganii* isolates from Buenos Aires, Argentina. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, London, v. 55, n. 4, p. 461-465, Abr 2005.
- QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. **Clinical microbiology reviews**, Washington, v. 20, n. 3, p. 440-458, Jul 2007.

RAMOS, P. I. P. *et al.* Comparative analysis of the complete genome of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* Kp13 reveals remarkable genome plasticity and a wide repertoire of virulence and resistance mechanisms. **BMC genomics**, London, v. 15, p. 54, Jan. 2014.

RASHEED, J. K. *et al.* Detection of the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase type 2 Carbapenem-hydrolyzing enzyme in clinical isolates of *Citrobacter freundii* and *K. oxytoca* carrying a common plasmid. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 46, n. 6, p. 2066–2069, Jun. 2008.

REGUE, M. *et al.* Genetic Characterization of the *Klebsiella pneumoniae* *waa* Gene Cluster , Involved in Core Lipopolysaccharide Biosynthesis. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 183, n. 12, p. 3564–3573, 2001.

RENNIE, R. P.; NORD, C. E.; SJOBERG, L. Comparison of bacteriophage typing , serotyping , and biotyping as aids in epidemiological surveillance of *Klebsiella* infections . Comparison of Bacteriophage Typing , Serotyping , and Biotyping as Aids in Epidemiological Surveillance of *Klebsiella* Infect. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 8, n. 6, p. 638-642, 1978.

RIBEIRO, V. B. *et al.* Detection of *bla*_{KPC-2} in a carbapenem-resistant *Kluyvera georgiana*. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, London, v. 67, n. 11, p. 2776–2777, Nov. 2012.

ROBICSEK, A.; JACOBY, G. A; HOOPER, D. C. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. **Lancet Infect Disease**, New York, v. 6, n.10, p. 629-640, 2006.

ROBIN, F. *et al.* Virulence factors and TEM-type β -lactamases produced by two isolates of an epidemic *Klebsiella pneumoniae* strain. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 56, n. 2, p. 1101-1104, Feb 2012.

ROBLEDO, I. E. *et al.* Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 54, n. 3, p. 1354-1357, Mar 2010.

ROCHA, L .K. L. **DETECÇÃO DA RESISTÊNCIA PLASMIDIAL A QUINOLONAS MEDIADA PELO GENE QNR EM KLEBSIELLA PNEUMONIAE NO NORDESTE DO BRASIL** , 2012. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Pernambuco, 2012.

ROCHE, C. *et al.* First identification of class A carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in the Republic of Ireland. **Euro surveillance**, Saint-Maurice, v. 14, n. 13, p. 13-14, 2009.

ROSSI, F. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. **Clinical infectious diseases**, Chicago, v. 52, n. 9, p. 1138-1143, Maio 2011.

RUSSO, T. A *et al.* Hypervirulent *K. pneumoniae* secretes more and more active iron-acquisition molecules than “classical” *K. pneumoniae* thereby enhancing its virulence. **PLoS one**, San Francisco, v. 6, n. 10, p. 26734-26736, Jan. 2011.

- SANTOS, D. O. S. **Características microbiológicas de *Klebsiella pneumoniae* isoladas no meio ambiente hospitalar de pacientes com infecção nosocomial**, 2011. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, 2011.
- SCHEMBRI, M. A. *et al.* Capsule and Fimbria Interaction in *Klebsiella pneumoniae* Capsule and Fimbria Interaction in *Klebsiella pneumoniae*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 73, n. 8, p. 4626-4633, 2005.
- SEKI, L. *et al.* Molecular epidemiology of CTX-M producing Enterobacteriaceae isolated from bloodstream infections in Rio de Janeiro, Brazil: emergence of CTX-M-15. **Brazilian Journal of Infection Disease**, Salvador, v. 7, n. 6, p. 640–646, 2014.
- SKIPPER, K. A. *et al.* DNA transposon-based gene vehicles - scenes from an evolutionary drive. **Journal of biomedical science**, Basel, v. 20, p. 92-98, Jan. 2013.
- SHEN, P. *et al.* Novel genetic environment of the carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2 among Enterobacteriaceae in China. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 53, n. 10, p. 4333-4338, Oct 2009.
- SHI W. *et al.* Carbapenem and cefoxitin resistance of *Klebsiella pneumoniae* strains associated with porin OmpK36 loss and DHA-1 -lactamase production. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 44, n. 2, p. 435-442, 2012.
- SILVA, B.O. **Caracterização molecular de isolados clínicos de *Morganella morganii* produtores de KPC no Brasil**, 2013. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Pernambuco, 2013.
- SIEFERT, J. L. Defining the mobilome. Horizontal Gene Transfer: Genome in Flux. **Humana Press**, New York, p. 13-27, 2009.
- SIU, L. K. *et al.* Molecular typing and virulence analysis of serotype K1 *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from liver abscess patients and stool samples from noninfectious subjects in Hong Kong, Singapore, and Taiwan. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 49, n. 11, p. 3761-3765, Nov 2011.
- SPANGLER, S.K.; JACOBS, M.R.; APPELBAUM, P.C. Susceptibility of anaerobic bacteria to trovafloxin: comparison with other quinolones and non-quinolone antibiotics. **Infectious Diseases in Clinical Practice**, Philadelphia, v. 5, p.101-109, 1996.
- STRUVE, C.; KROGFELT, K. A. Role of capsule in *Klebsiella pneumoniae* virulence: lack of correlation between in vitro and in vivo studies. **FEMS microbiology letters**, Amsterdam, v. 218, n. 1, p. 149–154, Jan. 2003.
- STOKES H.W.; HALL R.M. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. **Molecular Microbiology**, Oxford, v.3, p.1669-1683, 1989.

TAMMA, P. D.; COSGROVE, S. E.; MARAGAKIS, L. L. Combination therapy for treatment of infections with gram-negative bacteria. **Clinical microbiology reviews**, Washington, v. 25, n. 3, p. 450–470, Jul. 2012.

THOMAS, C. P. *et al.* Early (2008-2010) hospital outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing OXA-48 carbapenemase in the UK. **International journal of antimicrobial agents**, Amsterdam, v. 42, n. 6, p. 531–526, Dez. 2013.

TSAI, Y. K. *et al.* *Klebsiella pneumoniae* outer membrane porins OmpK35 and OmpK36 play roles in both antimicrobial resistance and virulence. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 55, n. 4, p. 1485-93, Abr 2011.

TURTON, J. F. *et al.* PCR characterization and typing of *Klebsiella pneumoniae* using capsular type-specific, variable number tandem repeat and virulence gene targets. **Journal of medical microbiology**, Edinburgh, v. 59, n. 5, p. 541–537, Maio 2010.

VAKULENKO, S. B.; MOBASHERY, S. Versatility of Aminoglycosides and Prospects for Their Future. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 16, n. 3, p. 430–450, 2003.

VELEBA, M.; SCHNEIDERS, T. Tigecycline resistance can occur independently of the *ramA* gene in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 56, n. 8, p. 4466–4467, Maio 2012.

VERAS, D. L. *et al.* Prevalence of the *bla* (SHV) gene in *Klebsiella pneumoniae* isolates obtained from hospital and community infections and from the microbiota of healthy individuals in Recife, Brazil. **Current microbiology**, New York, v. 62, n. 5, p. 1610–1616, Maio 2011.

VICENT J. L. *et al.* A pilot-controlled study of a polymyxin B-immobilized hemoperfusion cartridge in patients with severe sepsis secondary to intra-abdominal infection. **Shock**, Augusta, v. 23, p. 400-405, 2005.

VILELA, M. A. **CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS RESISTÊNTES A ANTIMICROBIANOS QUE ATUAM NA PAREDE CELULAR.**, 2009. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco, 2009.

VILLEGAS, M. V. *et al.* First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 51, n. 4, p. 1553-1555, Abr 2007.

VINUÉ, L. *et al.* Characterization of extended-spectrum beta-lactamases and integrons in *Escherichia coli* isolates in a Spanish hospital. **Journal of medical microbiology**, Edinburgh, v. 57, n. 7, p. 916–920, Jul. 2008.

WACHINO, J.; ARAKAWA, Y. Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: an update. **Drug resistance updates** : reviews and

commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy, Edinburgh, v. 15, n. 3, p. 133–148, Jun. 2012.

WALSH, T. R. Emerging carbapenemases: a global perspective. **International journal of antimicrobial agents**, Amsterdam, v. 36 Suppl 3, p. 8–14, Nov. 2010.

WALTHER-RASMUSSEN, J.; HØIBY, N. Class A carbapenemases. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, London, v. 60, n. 3, p. 470-482, Set 2007.

WANG, X. D. *et al.* Reduced susceptibility to carbapenems in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates associated with plasmid-mediated beta-lactamase production and OmpK36 porin deficiency. **Journal of medical microbiology**, Edinburgh, v. 58, n. 9, p. 1196-1202, Set 2009.

WILSON, J. W. *et al.* Mechanisms of bacterial pathogenicity. **Postgraduate Medical Journal**, Oxford, v.78, p. 216–224, 2002.

WU, C. C. *et al.* Regulation of the *Klebsiella pneumoniae* Kpc fimbriae by the site-specific recombinase Kpcl. **Microbiology**, England, v. 156, n. 7, p. 1983-1992, Jul 2010.

YAMANE, K. *et al.* Global Spread of Multiple Aminoglycoside Resistance Genes. **Emerging Infectious Diseases**, Oxford, v. 11, n. 6, p. 951–953, 2005.

YIGIT, H. *et al.* Novel Carbapenem-Hydrolyzing B-Lactamase, KPC-1 , from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 45, n. 4, p. 1151-1161, 2001.

ZAVASCKI, A. P. *et al.* Stable polymyxin B susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. despite persistent recovery of these organisms from respiratory secretions of patients with ventilator-associated pneumonia treated with this drug. **Journal of clinical microbiology**, Washington, v. 47, n. 9, p. 3064–3065, Set. 2009.

ZHANG, R. *et al.* Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase 2-producing *K. pneumoniae* with high qnr prevalence in a Chinese hospital. **Journal of medical microbiology**, Edinburgh , v. 60, n. 7, p. 977–982, Jul. 2011.

APÊNDICE

APÊNDICE A – ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

1 Co-production of *bla*_{KPC-2}, *bla*_{CTX-M-15} and *qnrB19* in multidrug resistant *Klebsiella*
2 *pneumoniae* isolates ST340 in Brazil

3

4 Willames MBS Martins^{1,2}, Anna CS Almeida^{1,3} Adriana G. Nicoletti⁴, Rodrigo
5 Cayô⁴, Ana C. Gales⁴, Luis C. Alves², Fábio B. Santos², Marinalda A. Vilela;
6 Márcia MC Morais^{#1}.

7

8 1 – Laboratório de Resistência Microbiana – Universidade de Pernambuco,
9 Recife, Brasil.

10 2 – Laboratório de Biologia Celular e Molecular – Centro de Pesquisas Aggeu
11 Magalhães - FIOCRUZ/PE, Recife, Brasil

12 3 – Departamento de Biologia – Universidade Federal Rural de Pernambuco,
13 Recife, Brasil.

14 4 – Laboratório ALERTA - Universidade Federal de São Paulo, São Paulo,
15 Brasil.

16

17

18 # Corresponding author:

19 E-mail: marcia.morais@upe.br

20 Phone: +55 81 3183.3316

21 Fax: +55 81 3183.3308

22

23

24

25

APÊNDICE A – ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

26 Synopsis

27 Objectives: This work aimed to characterize the genetic mechanisms involved in
28 resistance to carbapenems and quinolones displayed by two isolates of *K*
29 *pneumoniae* from a Brazilian teaching hospital.

30 Methods: Isolates were genotyped by PFGE and further characterized by
31 MLST. MICs were determined by broth microdilution and E-test. Investigation
32 for β -lactamases (*bla*), quinolone resistance, 16S rRNA methylases genes and
33 class 1 integron variable region were performed by PCR amplification, followed
34 by sequencing. After conjugation experiments, plasmids were characterized by
35 PCR-based replicon typing.

36 Results: The isolates proved susceptible only to amikacin, tygecicyne and
37 polymixin B. PFGE showed they consisted of a single clone, belonging to ST340
38 (CC258). This clone exhibited an association of *bla*_{KPC-2}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{SHV-11},
39 and *qnrB19* genes. Besides, a class 1 integron containing the genes *dhfrXII* and
40 *aadA2* was also present in the isolates. Plasmid analysis showed that the gene
41 *bla*_{KPC-2} was located at an IncI1-ly plasmids of 133 kb, while the gene *qnrB19*
42 was harbored by an IncY plasmid of 15 kb.

43 Conclusions: The results pointed out for the association of *bla*_{KPC-2} and *qnrB19*
44 in a single clone of *Klebsiella pneumoniae* in Brazil, which may have been
45 facilitated by the gene location at conjugative plasmids. Moreover, the presence
46 of a variety of resistance determinants in the isolates emphasize that strong
47 control of the high selection pressure in hospital environments is required in
48 order to prevent multidrug resistance bacteria to arise.

49

50

APÊNDICE A – ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

51 Introduction

52

53 Carbapenamases-producing *K. pneumoniae* Isolates were identified for the first
54 time in 2001 in North Caroline, USA and since this description, the *bla*_{KPC} gene
55 has been generally associated to other resistance determinants¹⁻². This gene is
56 frequently transposon and plasmid mediated², which contribute, together with
57 the ability of Enterobacteriaceae to accumulate several resistance mechanisms,
58 for the rising of high-level resistance bacterial isolates³. Not rarely, KPC-
59 producing isolates also contain resistance determinants to broad spectrum
60 cephalosporins and quinolones. For the former, ESβL genes are mostly
61 detected^{2,3}. Concerning resistance to quinolones in the Enterobacteriaceae
62 family members, this is mostly due to mutations in the QRDR region of the
63 gyrase and topoisomerase IV genes⁴. However, quinolone resistance can be
64 also resulted of the plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) and over
65 expression of efflux pump regulating genes⁵. The most disseminated PMQR
66 gene, *qnr*, was first described in 1998, associated to reduced levels of
67 quinolone susceptibility⁶.

68 The presence of *bla*_{KPC} and *qnr* genes in the same isolate was first described in
69 2008 at Israel.⁷ After that, this association was reported in 2010, in China and
70 ever since few cases have been reported⁸⁻¹⁰. In Brazil, the *bla*_{KPC} gene has
71 been identified in several members of the Enterobacteriaceae family, including
72 *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* and *Pseudomonas* spp¹¹⁻
73 ¹³. Nevertheless, in the most of these studies the carbapenemase KPC was
74 only associated with ESβLs¹¹⁻¹³. This work reports the presence of *qnr*B19 gene
75 in KPC-2-producing isolates.

76

77 Materials and Methods

78

79 *Bacterial Isolates and susceptibility testing*

80 In December 2011, two isolates of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* with
81 resistance to quinolones (KPN535 and KPN537) were recovered from rectal
82 swab cultures from a 54-year-old man who was diagnosed with hepatitis C and
83 admitted to the ICU of a public university hospital, Northeast of Brazil.
84 Antimicrobial susceptibility was evaluated by determining the MIC using broth
85 microdilution assays and E-test following CLSI 2013 interpretation¹⁴. This work
86 was approved by the Ethics Committee of The University of Pernambuco,
87 Brazil.

88

89 *Conjugation Experiments and plasmid analysis*

90 Horizontal gene transfer of *bla*_{KPC-2} and *qnrB19* were evaluated by conjugation
91 assays using sodium azide-resistant *E. coli* J53 as recipient cells.
92 Transconjugants were selected using CHROMagar containing sodium azide
93 (100µg/mL), ampicillin (100µg/mL) and ciprofloxacin (0,12µg/mL). Plasmid DNA
94 was extracted by the Kieser method¹⁵. Analysis of the plasmids incompatibility
95 groups were determined by PCR-based replicon type (PBRT) method¹⁶.

96

97 *Molecular Investigations*

98 Investigation for β -lactamases (*bla*), quinolone resistance, 16S rRNA
99 methylases genes and class 1 integron variable region was performed by PCR
100 amplification, followed by sequencing. Southern blot hybridizations were

APÊNDICE A – ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

101 performed. The clonal relationship of the isolates was determined by PFGE,
102 using *Xba*I enzyme. The sequence type (ST) determination was carried out
103 according to Diancourt et al (2009).

104

105 Results and Discussion

106 This work describes the co-production of KPC-2 and QnrB19 in *K. pneumoniae*
107 isolates (KPN535 and KPN537), which consisted of a unique clone as
108 determined by PFGE.

109 The presence of these genes in the same isolate has been rarely described⁷⁻
110 ¹⁰and not reported in Brazil so far. Therefore, with the aim of investigate the
111 genetic apparatus involved with the presence of such resistance determinants,
112 these isolates were further characterized.

113 Susceptibility testing of KPN535 and KPN537 revealed resistance to all β -
114 lactams tested and to several quinolones (Table 1). They remained susceptible
115 to polymyxin B, tigecycline and amikacin.

116 PCR analysis revealed the presence of *bla*_{KPC-2}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{SHV-11} and
117 *qnrB19* genes. The *bla*_{KPC-2} and *bla*_{CTX-M-15} association has been already
118 described in the same hospital before¹¹.

119 *Bla*_{KPC-2} worldwide dissemination has been frequently related to *K. pneumoniae*
120 CC258 isolates¹⁸ (Chmelnitsky 2013). The MLST analysis of the KPN535 and
121 KPN537 revealed that they belonged to ST340, which is part of the Clonal
122 Complex 258 (CC258), detected in different regions in Brazil¹⁹ (Andrade et al,
123 2012).

124 Plasmid mediated quinolone resistance (PMQR) genes, such as *qnr*, *qepA* and
125 *aac(6')-Ib-cr*, have been a growing concern due to the ease of dissemination of

APÊNDICE A – ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

126 these determinants. In this study, only *qnrB19* gene was present in the isolates,
127 which was also recently described in *E. coli* and *Salmonella spp.* strains from
128 Brazil^{5,20}. In addition, sequence analysis of the chromosomal quinolone
129 resistance determinant region (QRDR) revealed the presence of substitutions at
130 the most common positions for *gyrA* (Thr83Ile) and *parC* (Ser80Ile) genes²¹.
131 The isolates also harbored class 1 integron containing a variable region with
132 c.a. 1.5 kb carrying *dhfrXII* gene, encoding the dihydrofolate reductase involved
133 in resistance to trimethoprim, and the *aadA2* gene, which codes for
134 adenylyltransferase involved in streptomycin resistance.

135

136 **Plasmid analyses**

137 The isolates harbored five different plasmids, with sizes ranging from 15 to 133
138 kb. *Bla_{KPC-2}*, *qnrB19*, *bla_{CTX-M-15}* and class 1 integron were successfully
139 transferred to transconjugant cells (Tc535 and Tc537), which showed the
140 presence of two distinct plasmids (133 kb and 15 kb). Southern blot analyses of
141 donor and transconjugant cells indicated that *bla_{KPC-2}* was located in the 133 kb
142 plasmid and *qnrB19* in the 15 kb (data not shown). PCR amplifications using
143 plasmid DNA purified from agarose gel showed that *bla_{CTX-M-15}* was located in
144 the same plasmid of *bla_{KPC-2}*, 133 kb. On the other hand, the 15 kb plasmid
145 carried class 1 integron and *qnrB19*.

146 PBRT analysis indicated that 133 kb and 15 kb plasmids belonged to the IncI1-
147 ly and IncY groups, respectively. Plasmid Inc groups related to *bla_{KPC}* genes
148 use to vary frequently, as observed in several reports^{2,11-13}. In the same way,
149 *qnr* genes were already identified in different Inc groups, such as IncFII, ColE_{TP}

APÊNDICE A – ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

150 and IncHI2²². In addition, a previous report from the same institution described
151 an IncI1-ly 139 kb plasmid containing *bla*_{CTX-M-15}¹¹.

152

153 **Conclusions**

154 This study reported the first association of *bla*_{KPC} and *qnr* genes in *K.*
155 *pneumoniae* ST340, in Brazil. The isolates presented MDR phenotype, which
156 can be explained by presence of *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{SHV-11}, class 1 integron and
157 *qnrB19* genes. These findings draw attention to association of these resistance
158 determinants in a ST340 isolates, a ST already reported in several occasions in
159 the country.

160

161 **Acknowledgements**

162 The authors thank the Genomic Platform for DNA sequencing PDTIS (Instituto
163 Oswaldo Cruz) and the Plataform of Sequencing- LABCEN/CCB in the UFPE
164 for use its facilities.

165

166 **Funding**

167 This work was supported by the Brazilian funding agencies CNPq, CAPES,
168 PFA/UPE and FACEPE.

169

170 **Transparency Declarations**

APÊNDICE A – ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

171 None declared.

172

173 **References**

174 **1** Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ *et al.* Novel carbapenem-hydrolyzing β -
175 lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella*
176 *pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 2001; **45**; 1151-61.

177 **2** Cuzon G, Naas T, Troung H *et al.* Worldwide diversity of *Klebsiella*
178 *pneumoniae* that produces β -lactamase *bla*_{KPC-2} gene. Emerg Infec Dis 2010;
179 **16**; 1349-56.

180 **3** Leavitt A, Carmeli Y, Chmelnitsky I *et al.* Molecular epidemiology, sequence
181 types, and plasmids analyses of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* strains
182 in Israel. Antimicrob Agents Chemother 2010; **54**; 3002-06.

183 **4** Giedraitiene A, Vitkauskiene A, Naginiené R, et al. Antibiotic resistance
184 mechanisms of clinically important bacteria. Medicina (Kaunas, Lithuania) 2011;
185 **47**; 137-46.

186 **5** Paiva MC, Nascimento AMA, Camargo ILBC *et al.* The first report of the
187 *qnrB19*, *qnrS1* and *aac(6')-Ib-cr* genes in urinary isolates of ciprofloxacin –
188 resistant *Escherichia coli* in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 2012; **107**; 687-89.

189 **6** Martinez-Martinez L, Pascual A, Jacoby GA. Quinolone resistance from a
190 transferable plasmid. Lancet 1998; **351**; 797-99.

191 **7** Chmelnitsky I, Navon-Venezia S, Strahilevitz J *et al.* Plasmid-mediated *qnrB2*
192 and carbapenemase gene *bla*_{KPC-2} carried on the same plasmid in carbapenem-
193 resistant ciprofloxacin-susceptible *Enterobacter cloacae* isolates. Antimicrob
194 Agents Chemother 2008 ; **52** ; 2962-65.

APÊNDICE A – ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

- 195 **8** Jiang Y, Hu D, Wei Z *et al.* Complete nucleotide sequence of *Klebsiella*
196 *pneumoniae* multidrug resistant plasmid pKP048 ,carrying *bla*_{KPC-2}, *bla*_{DHA-1},
197 *qnrB4*, and *armA*. Antimicrob Agents Chemother 2010.
- 198 **9** Hu Y, Cai J, Zhang R *et al.* Emergence of *Proteus mirabilis* harboring *bla*_{KPC-2}
199 and *qnrD* in a Chinese Hospital. Antimicrob Agents Chemother 2012; **56**; 2278-
200 82.
- 201 **10** Zhang R, Whang XD, Cai JC *et al.* Outbreak of *Klebsiella pneumoniae*
202 carbapenemase 2-producing *K. pneumoniae* with high *qnr* prevalence in a
203 Chinese hospital. Journal of Medical Microbiology 2011; **60**; 977-82.
- 204 **11** Almeida ACS, Cavalcanti FLS, Vilela MA *et al.* Escherichia coli ST502 and
205 *Klebsiella pneumoniae* ST11 sharing na IncW plasmid harbouring the *bla*_{KPC-2}
206 gene in an intensive care unit patient. Int J Antimicrob Ag 2012; **40**; 374-76.
- 207 **12** Almeida ACS, Vilela MA, Cavalcanti FLS *et al.* First description of KPC-2-
208 Producing *Pseudomonas putida* in Brazil. Antimicrob Agents Chemother 2012;
209 vol; 2205-06.
- 210 **13** Guimarães ACC, Almeida ACS, Nicoletti AG, *et al.* Clonal spread of
211 carbapenem resistant *Serratia marcescens* isolates sharing an IncK plasmid
212 containing *bla*_{KPC-2}. Internt Journal of Antimicrob Agents 2013; **42**; 369-70.
- 213 **14** Clinical Laboratory Standards Institute. Performance Standards for
214 Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-third Information Supplementary
215 lividans and Escherichia coli. Plasmid 1984; **12**; 19-36.
- 216 **16** Carattoli A, Bertani A, Villa L, *et al.* Identification of plasmids by PCR-based
217 replicon typing. Journal of microbiological methods, 2005; **63**, 219-28.
-

APÊNDICE A – ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

- 218 **17** Diancourt L, Passet V, Verhoef J, *et al.* Multilocus sequence typing of
219 *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. Journal of Clinical Microbiology,
220 2005; **43**(8), 4178-82.
- 221 **18** Chemelnitsky I, Shklyar M, Hermesh O, *et al.* Unique genes identified in the
222 epidemic extremely drug-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*
223 sequence type 258. The Journal of antimicrobial chemotherapy, 2013; **68** 74-
224 83.
- 225 **19** Pereira PS, Araujo CFM, Seki LM, *et al.* Update of the molecular
226 epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: spread of
227 clonal complex 11 (ST11, ST437 and ST340). The Journal of antimicrobial
228 chemotherapy 2012; **15**; 10-14.
- 229 **20** Ferrari R, Galiana A, Cremades R, *et al.* Plasmid-mediated quinolone
230 resistance by genes *qnrA1* and *qnrB19* in *Salmonella* strains isolated in Brazil. J
231 Infect Dev Ctries 2011; **5**; 496-98.
- 232 **21** Hopkins KL, Davies RH, Threlfall EJ. Mechanisms of quinolone resistance in
233 *E. coli* and *Salmonella*: recent developments. Journal of Antimicrobial Agents,
234 2005; **25**(3); 358-73.
- 235 **22** León SH, Sanz RG, León LH, *et al.* Characterization of multidrug-resistant
236 Enterobacteriaceae carrying plasmid-mediated quinolone resistance
237 mechanism in Spain. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2011; **66**; 287-90.
-

APÊNDICE A – ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

238 Table 1. Antimicrobial susceptibility profile and resistance genes detected of *K. pneumoniae* clinical isolates and transconjugants.

Strains ^a	MIC (mg/L) ^b																			
	AMK*	GEN	AMC	CEF	FEP	CTX	CAZ	CRO	TZP	ATM	MEM	ETP*	IPM	NAL	GAT	LVX	CIP	MXF*	TGC	PMB
KPN535/537	16	64	256	>512	>512	>256	128	>128	512	>256	>16	16	32	>256	64	64	>32	>32	0,5	0,125
TC535/537	2	32	64	>512	128	>256	32	>128	32	64	1	1	1	128	1	0,5	0,25	2	0,125	0,125
<i>E. coli</i> J53	0,5	0,12	4	0,03	0,25	2	0,06	0,03	4	0,06	0,06	0,003	0,12	4	≤0,06	≤0,06	≤0,03	0,06	≤0,125	≤0,125

239

240 ^a KPN535 and KPN537, KPC-2-producing *K. pneumoniae* clinical isolates; TC535 and TC537, *E. coli* transconjugants ; *E. coli* J53, recipient strains.^b AMK,

241 Amikacin; GEN, Gentamicin; AMC, Amoxicillin/clavulanate; CEF, Cephalothin; FEP, Cefepime; CTX, Cefotaxime; CAZ, Ceftazidime; CRO, Ceftriaxone; TZP,

242 Piperacillin/tazobactam; ATM, Aztreonam; MEM, Meropenem; ETP, Ertapenem; IPM, Imipenem; NAL; Nalidixic acid; GAT, Gatifloxacin; LVX, Levofloxacin;

243 CIP, Ciprofloxacin; MXF, Moxifloxacin; TGC, Tigecycline; PMB, Polymyxin B.

244