

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

*POLYANA SILVA PEREIRA*

**Caracterização molecular de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapenemases do tipo KPC-2, NDM-1 e OXA-370 isoladas no Brasil**

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

**Orientadora:** Dra. Ana Paula D'Alincourt Carvalho Assef

**RIO DE JANEIRO**

2016

**Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas / ICICT / FIOCRUZ - RJ**

P436 Pereira, Polyana Silva

Caracterização molecular de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapenemases do tipo KPC-2, NDM-1 e OXA-370 isoladas no Brasil / Polyana Silva Pereira. – Rio de Janeiro, 2016.

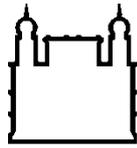
xviii, 213 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2016.

Bibliografia: f. 160-178

1. *Klebsiella pneumoniae*. 2. KPC. 3. NDM. 4. OXA-370. 5. Multirresistência. Título.

CDD 579.34



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

*POLYANA SILVA PEREIRA*

**Caracterização molecular de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapenemases do tipo KPC-2, NDM-1 e OXA-370 isoladas no Brasil**

**ORIENTADORA: Dra. Ana Paula D’Alincourt Carvalho Assef**

**EXAMINADORES:**

**Dra. Leticia Miranda Lery Santos (Presidente)**

**Dr. Robson de Souza Leão**

**Dra. Renata Cristina Picão**

**Dr. Rodolpho Mattos Albano**

**Dra. Deyse Christina Vallim da Silva**

Rio de Janeiro, 18 de abril de 2016.

## AGRADECIMENTOS

Para a realização deste trabalho de Tese de Doutorado tive auxílio de muitas pessoas, assim, tenho muito a agradecer. Posso dizer que verdadeiros anjos cruzaram meu caminho.

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à minha família, que foi minha base e sempre meu porto seguro. Os valores passados desde a infância que perduram por esses 27 anos de vida foram primordiais para que eu me tornasse quem sou e pudesse me encontrar no caminho da ciência. Meus pais, Lúcia Helena e Hermínio, foram e são os pontos-chaves desse processo de crescimento pessoal e profissional. Gostaria de agradecer também ao meu irmão Rafael, pelo companheirismo, amizade e pela convivência diária. Tenho certeza que sem o apoio irrestrito de vocês em todas as minhas decisões eu jamais conseguiria ter chegado até aqui. Amo vocês!

Agradeço também à minha madrinha Valéria, que sempre me acompanhou e me ajudou nos momentos em que mais precisei e a Tita por ser tão amorosa conosco. Agradeço à minha avó Edith, por ser tão amorosa e dedicada a sua família e as minhas tias que sempre nos dão tanto afeto. Também ao meu namorado Guilherme pelo companheirismo, principalmente quando era deixado em segundo plano para que este trabalho pudesse ser concluído. Agradeço também a todos os meus amigos e familiares, que de maneira geral, contribuíram para a formação da pessoa que sou hoje e me acompanharam durante minha trajetória.

Agradeço à minha orientadora Ana Paula, por toda a orientação e apoio. Sem as suas dicas e conversas teria sido muito mais difícil percorrer este caminho. Agradeço também à Dra. Marise que foi a minha primeira orientadora no LAPIH pela oportunidade e pelo apoio. Não poderia deixar de agradecer à Liliane, que me acompanhou nos primeiros passos como aluna de iniciação científica, a quem devo bastante do que aprendi como profissional na bancada do laboratório.

Agradeço de forma especial aos integrantes e ex-integrante do Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar (LAPIH), local onde estive diariamente presente por seis anos e que foi a minha segunda casa: Viviane, Karyne, Fernanda, Júlia, Michely, Thiago, Paula, Carolina, Melise, Isabel, Jéssica, Vanessa, Otávio, Gabriela, Jonathan, Flavia, Thamyres, Raphaela, Aline, Elid, Synara, Natasha, Mariana, Camila, Stephanie, Ivson, Claudio e Marisa. Gostaria de agradecer especialmente a três pessoas que me auxiliaram diretamente na

confeção deste trabalho: Carlos, Mirla e Caio. Sem o apoio e a ajuda de vocês nada disso teria sido possível. Agradeço também à Secretaria do Setor de Bacteriologia e ao Setor de Meio de Cultura da Bacteriologia, principalmente ao Seu Evaldo e Davi, pela ajuda na confecção do projeto.

Agradeço à equipe do Centro de Inovações Tecnológicas do Instituto Evandro Chagas (Belém, Pará), por todo auxílio no sequenciamento genômico, especialmente à Marília, Clayton, Sandro, Jedson, Rodrigo, Layanna, Janaina, Poliana, Dr. Marcio Nunes, Dr. John Mcculloch e Dr. João Vianez pelas três semanas de aprendizado intenso que tivemos. Agradeço também ao Dr. Rodolpho Albano pelo sequenciamento genômico e pelo auxílio nas análises. Agradeço à Dra. Leticia Lery pela colaboração científica que iniciamos. Espero que tenhamos muito frutos deste projeto!

Agradeço aos professores e pesquisadores do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ que transmitiram a mim seu precioso conhecimento, que pretendo guardar para vida toda. Agradeço à Coordenação da PG-BCM, especialmente a equipe da secretaria acadêmica (Danielle, Julimar, Giselia, Eduardo e Elenice) por toda a ajuda para o desenvolvimento desse trabalho.

Agradeço também à equipe da Coordenação de Biossegurança do CCS/UFRJ (Raiani, Profa. Sônia, Profa. Bianca, Prof. André e Thiago), que sempre me apoiou para que eu pudesse dar prosseguimento a esta tese.

Agradeço aos hospitais e laboratórios centrais pelo fornecimento das amostras. Agradeço também às agencias financiadoras que permitiram que este projeto fosse realizado: Instituto Oswaldo Cruz, Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

**Muito obrigada!**

*“A ciência serve para nos dar uma ideia de quão extensa é a nossa ignorância”.*

*Félicité Robert de Lamennais*

## SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>AmpC</b>	Tipo de beta-lactamase cromossomal, cefalosporinase
<b>AK</b>	Amicacina
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>ATCC</b>	do inglês <i>American Type and Culture Collection</i>
<b>BGN</b>	Bastonetes Gram-negativos
<b>BHI</b>	do inglês <i>Brain Heart Infusion Agar</i> , traduzido para ágar infusão de cérebro e coração
<b>BLAST</b>	do inglês <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
<b>CAZ</b>	Ceftazidima
<b>CC</b>	Complexo Clonal
<b>CCBH</b>	Coleção de Culturas de Bactérias de Origem Hospitalar
<b>CDC</b>	do inglês <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
<b>CIM</b>	Concentração Inibitória Mínima
<b>CIP</b>	Ciprofloxacina
<b>CLSI</b>	do inglês <i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>
<b>CTX</b>	Cefotaxima
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>DIG</b>	Digoxigenina
<b>ECDC</b>	do inglês <i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
<b>EMB</b>	do inglês <i>Eosin Methylene-blue Agar</i> , traduzido para ágar eosina azul de metileno
<b>ESBL</b>	do inglês <i>Extended Spectrum Beta-lactamase</i> , traduzido para beta-lactamase de espectro estendido
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>EUCAST</b>	do inglês <i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
<b>EDTA</b>	do inglês <i>Ethylene Diamine TetrAcetic acid</i> , traduzido para ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>FEP</b>	Cefepime
<b>FIOCRUZ</b>	Fundação Oswaldo Cruz
<b>FOT</b>	Fosfomicina/trometamol
<b>GN</b>	Gentamicina
<b>HCl</b>	Ácido clorídrico
<b>H<sub>2</sub>S</b>	Gás Sulfídrico
<b>IMP</b>	Imipenem
<b>IOC</b>	Instituto Oswaldo Cruz
<b>IR</b>	do inglês <i>Inverted repeat</i> , traduzido para sequencia repetida invertida
<b>IS</b>	do inglês <i>Insertion sequence</i> , traduzido para sequencia de inserção
<b>kb</b>	Quilobases
<b>kDa</b>	Quilodaltons

<b>KPC</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase
<b>LACEN</b>	Laboratório Central de Saúde Pública
<b>LAPIH</b>	Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>MEM</b>	Meropenem
<b>Mb</b>	Megabases
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de Magnésio
<b>MLEE</b>	do inglês <i>Multilocus enzyme electrophoresis</i>
<b>MLST</b>	do inglês <i>Multilocus sequence typing</i>
<b>MurA</b>	enzima UDP-N-acetilglicosamina enolpiruvil transferase
<b>NaCl</b>	Cloreto de sódio
<b>NDM</b>	New Delhi Metallo-beta-lactamase
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>OMP</b>	Classe de porinas presente em procariotos
<b>OPAS</b>	Organização Pan-americana da Saúde
<b>OXA</b>	Oxacilinase
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PBP</b>	Proteínas ligadoras de penicilina
<b>PCR</b>	do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i> , traduzido para Reação em Cadeia da Polimerase
<b>PFGE</b>	do inglês <i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> , traduzido para eletroforese em gel de campo pulsado
<b>pH</b>	Potencial de hidrogênio
<b>PB</b>	Polimixina B
<b>PTZ</b>	Piperacilina/tazobactam
<b>RAST</b>	do inglês <i>Rapid Annotation using Subsystem Technology</i>
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sódio
<b>ST</b>	do inglês <i>Sequence type</i>
<b>SXT</b>	Sulfametoxazole/trimetoprima
<b>TAE</b>	Tampão Tris-acetado EDTA
<b>TBE</b>	Tampão Tris-borato EDTA
<b>TIG</b>	Tigeciclina
<b>TE</b>	Tampão Tris-EDTA
<b>TEM</b>	Beta-lactamase Temoneira
<b>Tris</b>	Tris (hidroximetil) aminometano
<b>UTI</b>	Unidade de terapia intensiva

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.1:</b> Principais antimicrobianos descritos ao longo das últimas décadas, adaptado de Who, 2014 (4).....	1
<b>Figura 1.2:</b> Esquema representativo do Transposon Tn4401, elemento genético que tem sido associado ao gene <i>bla</i> <sub>KPC-2</sub> . Imagem adaptada de Naas e colaboradores, 2008 (54). .....	16
<b>Figura 1.3:</b> Características epidemiológicas das amostras produtoras de KPC por país de origem. Imagem traduzida e adaptada de Munoz-Price e colaboradores, 2013 (60), com autorização para reprodução da imagem fornecida pela Editora Elsevier (ANEXO B). .....	18
<b>Figura 1.4:</b> Distribuição geográfica mundial de NDM. Imagem traduzida e adaptada de Nordmann e colaboradores, 2014 (46), com autorização para reprodução da imagem fornecida pela Editora Elsevier (ANEXO B). .....	23
<b>Figura 1.5:</b> Distribuição geográfica mundial de OXA-48. Imagem traduzida e adaptada de Nordmann e colaboradores, 2014 (46), com autorização para reprodução da imagem fornecida pela Editora Elsevier (ANEXO B). .....	26
<b>Figura 4.1:</b> Dendrograma representativo dos 30 perfis de fragmentação de DNA cromossomal encontrados nas 66 amostras de <i>K. pneumoniae</i> produtoras das carbapenemases <i>bla</i> <sub>KPC-2</sub> , <i>bla</i> <sub>NDM-1</sub> e <i>bla</i> <sub>OXA-370</sub> , obtido através do <i>software GelCompar II</i> .....	85
<b>Figura 4.2:</b> Figura produzida pelo <i>software Eburst</i> , apresentando a relação ancestral dos 27 <i>sequence types</i> encontrados e os três complexos clonais: CC11, o CC16-17 e o CC758-840-1041. ....	88
<b>Figura 4.3:</b> Figura representativa do plasmídio carreador do gene <i>bla</i> <sub>KPC-2</sub> nas amostras CCBH5623 e CCBH5982. Assinalado em uma elipse vermelha está a região do transposon Tn4401 e em destaque na parte inferior da imagem, encontra-se a região com deleção em comparação com o plasmídio pKPC_FCF3/SP.....	96
<b>Figura 4.4:</b> Figura representativa do plasmídio carreador do gene <i>bla</i> <sub>KPC-2</sub> na amostra CCBH6306. Assinalado em uma elipse vermelha está a região do transposon Tn4401 e em destaque na parte superior da imagem, encontra-se a região com deleção em comparação com o plasmídio pKPC_FCF3/SP.....	97
<b>Figura 4.5:</b> Figura representativa do plasmídio carreador do gene <i>bla</i> <sub>KPC-2</sub> na amostra CCBH6707. Assinalado em uma elipse vermelha está a região de inserção em comparação com o plasmídio pKP13d. ....	98
<b>Figura 4.6:</b> Figura representativa da região flanqueadora do gene <i>bla</i> <sub>KPC-2</sub> na amostra CCBH6707. Imagem adaptada de Ramos e colaboradores, 2014 (205). .....	99
<b>Figura 4.7:</b> Figura representativa do Tn3000, ambiente genético do gene <i>bla</i> <sub>NDM-1</sub> nas amostras CCBH13327 e CCBH15949. ....	99

<b>Figura 4.8:</b> Figura representativa do <i>contig</i> carreador do gene <i>bla</i> <sub>N<sub>DM</sub>-1</sub> e <i>qnrB1</i> na amostra CCBH16302. ....	100
<b>Figura 4.9:</b> Figura representativa do ambiente genético do gene <i>bla</i> <sub>OXA-370</sub> encontrado nas amostras CCBH13796, CCBH14119 e CCBH14393. ....	100
<b>Figura 4.10:</b> Figura representativa do ambiente genético dos genes <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>strA</i> , <i>strB</i> e <i>sul 2</i> encontrado nas amostras CCBH15949, CCBH16302 e CCBH5745. ....	102
<b>Figura 4.11:</b> Figura representativa do ambiente genético do gene <i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub> na amostra CCBH13327. ....	102
<b>Figura 4.12:</b> Figura representativa do ambiente genético do gene <i>bla</i> <sub>CTX-M-8</sub> na amostra CCBH6707. ....	102
<b>Figura 4.13:</b> Figura representativa do ambiente genético do gene <i>rmtB</i> na amostra CCBH14393. ....	103
<b>Figura 4.14:</b> Figura representativa do ambiente genético dos genes <i>aac(6')-Ib-cr</i> ; <i>bla</i> <sub>OXA-1</sub> e <i>catB3</i> nas amostras CCBH5623, CCBH15949, CCBH16302, CCBH14119 e CCBH14393. ....	103
<b>Figura 4.15:</b> Figura representativa do ambiente genético dos genes <i>aac(6')-Ib-cr</i> ; <i>arr-3</i> ; <i>qacEdelta1</i> e <i>sull1</i> na amostra CCBH14393. ....	104
<b>Figura 4.16:</b> Figura representativa do ambiente genético do gene <i>qnrB1</i> na amostra CCBH5623. ....	104
<b>Figura 4.17:</b> Figura representativa do ambiente genético do gene <i>qnrB1</i> na amostra CCBH15949. ....	104
<b>Figura 4.18:</b> Figura representativa do ambiente genético do gene <i>qnrA1</i> na amostra CCBH13327. ....	104
<b>Figura 4.19:</b> Figura representativa do ambiente genético dos genes <i>oqxA</i> e <i>oqxB</i> em todas as amostras incluídas no estudo. ....	105
<b>Figura 4.20:</b> Figura representativa do ambiente genético do gene <i>fosA</i> nas amostras. Na área do retângulo vermelho, está sinalizado o gene <i>fosA</i> observado nas amostras. Legenda: TR: <i>transcriptional regulator</i> ; ABC transport: <i>ABC transporter</i> ; NAD(P)H: <i>NAD(P)H oxidoreductase</i> ; Secretion PTN: <i>putative secretion protein</i> . ....	106
<b>Figura 4.21:</b> Árvore filogenética das amostras produtoras de carbapenemase em comparação com outras amostras produzida através do <i>software</i> CSI Phylogeny. Sinalizadas e agrupadas em verde encontram-se as amostras positivas para <i>bla</i> <sub>OXA-370</sub> . Sinalizadas e agrupadas em vermelho, encontram-se as amostras positivas para <i>bla</i> <sub>KPC-2</sub> . Sinalizadas em azul estão as amostras positivas para <i>bla</i> <sub>N<sub>DM</sub>-1</sub> . Agrupadas com um retângulo pontilhado estão as amostras que compartilham quatro dos sete genes do esquema de MLST. ....	118

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.1:</b> Classificação dos principais antimicrobianos disponíveis para tratamento de infecções bacterianas, adaptado de Tenover e colaboradores, 2006 (3).....	3
<b>Tabela 1.2:</b> Classificação das beta-lactamases segundo Bush, 2010 (34).....	12
<b>Tabela 3.1:</b> Iniciadores específicos para a detecção dos genes <i>bla</i> <sub>KPC</sub> , <i>bla</i> <sub>NDM</sub> e <i>bla</i> <sub>OXA-48-like</sub> utilizados nas reações de PCR.....	48
<b>Tabela 3.2:</b> Quantidades e concentrações das reações de PCR para detecção de genes codificadores das carbapenemases <i>bla</i> <sub>KPC</sub> , <i>bla</i> <sub>NDM</sub> e <i>bla</i> <sub>OXA-48-like</sub> . ....	49
<b>Tabela 3.3:</b> Iniciadores específicos utilizados para a detecção dos elementos genéticos mais associados às carbapenemases <i>bla</i> <sub>KPC</sub> , <i>bla</i> <sub>NDM</sub> e <i>bla</i> <sub>OXA-48-like</sub> . ....	51
<b>Tabela 3.4:</b> Quantidades e concentrações das reações de PCR para detecção das regiões flaqueadoras dos genes <i>bla</i> <sub>KPC</sub> e <i>bla</i> <sub>NDM</sub> .....	51
<b>Tabela 3.5:</b> Iniciadores específicos para a detecção dos genes de resistência utilizados nas reações de PCR.....	55
<b>Tabela 3.6:</b> Iniciadores utilizados para busca de genes de virulência nas amostras de <i>K. pneumoniae</i> produtoras de carbapenemases.....	57
<b>Tabela 3.7:</b> Iniciadores específicos utilizados nas reações de PCR para a detecção dos genes incluídos no esquema de MLST de <i>K. pneumoniae</i> . ....	60
<b>Tabela 3.8:</b> Quantidades e concentrações das reações de PCR para detecção de genes do esquema de MLST.....	61
<b>Tabela 3.9:</b> Iniciadores específicos utilizados nas reações de sequenciamento no esquema de MLST de <i>K. pneumoniae</i> . ....	61
<b>Tabela 4.1:</b> Espécimes clínicos e estados de origem das 66 amostras de <i>K. pneumoniae</i> produtores de carbapenemases. ....	71
<b>Tabela 4.2:</b> Susceptibilidade aos antimicrobianos das amostras de <i>K. pneumoniae</i> produtoras de carbapenemases através do método de difusão em ágar e concentração inibitória mínima através do Etest.....	75
<b>Tabela 4.3:</b> Perfis de multirresistência aos antimicrobianos observados nas amostras de <i>K. pneumoniae</i> produtoras de carbapenemases segundo o critério de Magiorakos e colaboradores (2012) (185).....	77
<b>Tabela 4.4:</b> Percentual de detecção de genes codificadores das beta-lactamases <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV</sub> e <i>bla</i> <sub>TEM</sub> nas amostras produtoras de carbapenemases do tipo KPC, NDM e OXA-370. ....	78
<b>Tabela 4.5:</b> Perfil de detecção das beta-lactamases <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV</sub> e <i>bla</i> <sub>TEM</sub> nas amostras produtoras de carbapenemases do tipo KPC, NDM e OXA-370. ....	79
<b>Tabela 4.6:</b> Percentual de detecção de genes relacionados a resistência a aminoglicosídeos <i>aac(3')-IIa</i> , <i>aadA</i> e <i>aac(6')-Ib</i> nas amostras produtoras de carbapenemases do tipo KPC, NDM e OXA-370. ....	80

<b>Tabela 4.7:</b> Perfil de detecção de genes relacionados a resistência a aminoglicosídeos <i>aac(3')-IIa</i> , <i>aadA</i> , <i>aac(6')-Ib</i> e <i>rmtB</i> nas amostras produtoras de carbapenemases do tipo KPC, NDM e OXA-370. ....	80
<b>Tabela 4.8:</b> Percentual de detecção de genes relacionados a resistência a quinolonas <i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> e <i>qnrS</i> nas amostras produtoras de carbapenemases do tipo KPC, NDM e OXA-370. ..	81
<b>Tabela 4.9:</b> Perfil de detecção de genes relacionados a resistência a quinolonas <i>qnrA</i> , <i>qnrB</i> e <i>qnrS</i> nas amostras produtoras de carbapenemases do tipo KPC, NDM e OXA-370. ....	82
<b>Tabela 4.10:</b> Percentual de detecção de genes relacionados à virulência nas amostras produtoras de carbapenemases do tipo KPC, NDM e OXA-370. ....	83
<b>Tabela 4.11:</b> Distribuição dos perfis clonais em relação aos <i>sequence types</i> das 67 amostras de <i>K. pneumoniae</i> produtores de carbapenemases. ....	87
<b>Tabela 4.12:</b> Plasmídios carreadores dos genes <i>bla<sub>KPC-2</sub></i> , <i>bla<sub>NDM-1</sub></i> e <i>bla<sub>OXA-370</sub></i> das 48 amostras em que a extração plasmidial e hibridização foram realizadas. ....	89
<b>Tabela 4.13:</b> Características das corridas de sequenciamento e da montagem dos genomas das 11 amostras produtoras de carbapenemases. ....	92
<b>Tabela 4.14:</b> Características das amostras e genes de resistência encontrados no Sequenciamento Genômico. ....	94
<b>Tabela 4.15:</b> Diferenças a nível proteico encontradas nas enzimas da família OXA-48-like .....	101
<b>Tabela 4.16:</b> Mutações encontradas nas proteínas codificadas pelos genes alvo das quinolonas ( <i>gyrA</i> , <i>parC</i> e <i>parE</i> ). ....	107
<b>Tabela 4.17:</b> Mutações nas proteínas da bomba de efluxo AcrAB-TolC associada à resistência a tigeciclina e outros antimicrobianos comparando-se com a amostra de referência MGH78578. ....	109
<b>Tabela 4.18:</b> Mutações nas proteínas reguladoras da bomba de efluxo AcrAB-TolC associada à resistência a tigeciclina e outros antimicrobianos comparando-se com a amostra de referência MGH78578. ....	110
<b>Tabela 4.19:</b> Mutações nas proteínas codificadas pelos genes <i>oqxR</i> e <i>rarA</i> comparando-se com a amostra de referência MGH78578. ....	111
<b>Tabela 4.20:</b> Mutações nas proteínas codificadas pelos genes relacionados à resistência a polimixina comparando-se com a amostra de referência MGH78578. ....	112
<b>Tabela 4.21:</b> Mutações encontradas nas porinas OmpK35 e OmpK36. ....	114
<b>Tabela 4.22:</b> Mutações encontradas nas proteínas codificadas pelos genes alvo das quinolonas, bomba de efluxo, reguladores de bomba de efluxo e porinas preditas como deletérias de acordo com o <i>software</i> Provean. ....	115
<b>Tabela 4.23:</b> Genes de virulência encontrados nas amostras produtoras de carbapenemases. ....	116

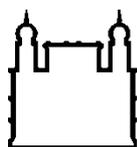
## ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Antimicrobianos.....	1
1.2 Resistência aos antimicrobianos e infecções hospitalares .....	3
1.3 <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	8
1.3.1 Resistência aos antimicrobianos em <i>K. pneumoniae</i> .....	9
1.3.1.1 Resistência aos beta-lactâmicos .....	9
1.3.1.1.1 <i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase (KPC).....	15
1.3.1.1.2 New Delhi Metallo-beta-lactamase (NDM).....	21
1.3.1.1.3 OXA-48-like .....	24
1.3.1.2 Resistência a aminoglicosídeos.....	28
1.3.1.3 Resistência a quinolonas .....	30
1.3.1.4 Resistência a fosfomicinas .....	32
1.3.1.5 Resistência a polimixinas .....	33
1.3.1.6 Resistência a tigeciclina .....	35
1.3.2 Fatores de virulência associados a <i>K. pneumoniae</i> .....	35
1.3.2.1 Adesinas e fímbrias .....	36
1.3.2.2 Polissacarídeos capsulares e fenótipo mucoso .....	37
1.3.2.3 Metabolismo da alantoína .....	38
1.3.2.4 Sideróforos .....	38
1.3.3 Metodologias de tipagem de <i>K. pneumoniae</i> .....	39
1.4 Sequenciamento genômico .....	41
1.5 Justificativa e relevância .....	43
2. OBJETIVOS.....	45
2.1 Objetivo geral .....	45
2.2 Objetivos específicos .....	45
3. METODOLOGIA .....	46
3.1 Seleção das amostras .....	46

3.2	Identificação das amostras de <i>K. pneumoniae</i> incluídas no estudo .....	46
3.3	Detecção molecular dos genes codificadores de carbapenemases e identificação da variante alélica .....	47
3.3.1	Extração de DNA pela metodologia de Tiocianato de Guanidina.....	47
3.3.2	Detecção molecular dos genes codificadores das carbapenemases KPC, NDM e OXA-48-like.....	48
3.3.3	Identificação da variante alélica dos genes codificadores das carbapenemases KPC NDM e OXA-48-like.....	49
3.4	Detecção das regiões flanqueadoras dos genes codificadores de carbapenemases ( <i>bla</i> <sub>KPC</sub> e <i>bla</i> <sub>NDM</sub> ) .....	50
3.5	Determinação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos.....	52
3.5.1	Disco difusão .....	52
3.5.2	Determinação da concentração inibitória mínima de carbapenemas, tigeciclina e polimixina B.....	52
3.5.3	Análise de perfil de multirresistência .....	53
3.5.4	Análises estatísticas .....	53
3.6	Detecção dos genes codificadores de resistência.....	54
3.7	Detecção dos genes relacionados à virulência .....	56
3.8	Análise do polimorfismo genético através de PFGE.....	57
3.9	Análise do polimorfismo genético através de MLST .....	59
3.9.1	Amplificação por PCR .....	59
3.9.2	Sequenciamento.....	61
3.10	Análise plasmidial.....	62
3.10.1	Hibridização com sonda do gene codificador das carbapenemase ( <i>bla</i> <sub>KPC</sub> , <i>bla</i> <sub>NDM</sub> e <i>bla</i> <sub>OXA-48-like</sub> ) .....	64
3.11	Sequenciamento genômico .....	65
3.11.1	Sequenciamento genômico utilizando a plataforma 454 (Roche).....	66
3.11.2	Sequenciamento genômico utilizando a plataforma MiSeq (Illumina).....	66

3.11.3	Análise de genes de resistência adquirida através das Plataformas ResFinder e do banco de dados do Instituto Pasteur BIGSdb-Kp.....	67
3.11.4	Análise da região flanqueadora dos principais genes de resistência adquiridos observados.....	67
3.11.5	Análise de mutações em genes relacionados à resistência a quinolonas, tigeciclina, e fosfomicina .....	67
3.11.6	Análise dos genes relacionados à síntese das porinas .....	68
3.11.7	Análise da presença de genes de virulência.....	68
3.11.8	Análise da relação filogenética entre as amostras produtoras de carbapenemases	68
3.12	Fluxograma da metodologia .....	69
4.	RESULTADOS.....	70
4.1	Amostras bacterianas .....	70
4.2	Detecção das regiões flanqueadoras dos genes codificadores de carbapenemases ( <i>bla<sub>KPC-2</sub></i> e <i>bla<sub>NDM-1</sub></i> ).....	72
4.3	Determinação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos.....	72
4.3.1	Difusão em ágar.....	72
4.3.2	Determinação da concentração inibitória mínima frente à carbapenemas, tigeciclina e polimixina B .....	73
4.3.3	Análise de perfil de multirresistência .....	76
4.4	Detecção dos genes codificadores de beta-lactamases .....	78
4.5	Detecção dos genes codificadores de resistência a aminoglicosídeos .....	79
4.6	Detecção dos genes codificadores de resistência a quinolonas .....	81
4.7	Detecção dos genes relacionados à virulência.....	82
4.8	Análise do polimorfismo genético através de PFGE.....	83
4.9	Análise do polimorfismo genético através de MLST. ....	86
4.10	Identificação dos plasmídios carreadores dos genes codificadores de carbapenemases	88
4.11	Análise do sequenciamento genômico.....	90
4.11.1	Análise de genes de resistência adquiridos.....	93

4.11.1.1	Avaliação do ambiente genético dos genes de resistência. ....	95
4.11.1.1.1	Ambiente genético dos genes codificadores de carbapenemases <i>bla</i> <sub>KPC</sub> , <i>bla</i> <sub>NDM</sub> e <i>bla</i> <sub>OXA-370</sub> .....	95
4.11.1.1.2	Ambiente genético dos genes <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> .....	101
4.11.1.1.1	Ambiente genético do gene <i>rmtB</i> .....	102
4.11.1.1.1	Ambiente genético do gene <i>aac(6')-Ib-cr</i> .....	103
4.11.1.1.2	Ambiente genético dos genes <i>qnr</i> .....	104
4.11.1.1.3	Ambiente genético dos genes <i>oqxA</i> e <i>oqxB</i> .....	104
4.11.1.1.4	Ambiente genético dos genes <i>fosA</i> .....	105
4.11.2	Análise de mutações em genes relacionados à resistência a antimicrobianos..	106
4.11.2.1	Mutações relacionadas à resistência a quinolonas.....	106
4.11.2.2	Mutações relacionadas à resistência a tigeiclina.....	107
4.11.2.3	Mutações nos reguladores da bomba OqxAB.....	111
4.11.2.4	Mutações relacionadas à resistência a fosfomicina.....	112
4.11.2.5	Mutações nos genes codificadores de porinas.....	112
4.11.3	Genes relacionados à virulência.....	116
4.11.4	Análise da relação filogenética entre as amostras produtoras de carbapenemases	116
5.	DISCUSSÃO.....	119
6.	CONCLUSÕES.....	158
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	160
8.	ANEXO A.....	179
8.1	ANEXO A1.....	180
8.2	ANEXO A2.....	184
8.3	ANEXO A3.....	187
9.	ANEXO B.....	192



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

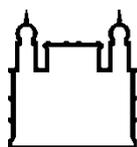
## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### Caracterização molecular de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapenemases do tipo KPC-2, NDM-1 e OXA-370 isoladas no Brasil

#### RESUMO - TESE DE DOUTORADO

Polyana Silva Pereira

*Klebsiella pneumoniae* multirresistentes produtoras de carbapenemases do tipo KPC, NDM e OXA-48-like envolvidas em infecções hospitalares são atualmente um grande problema de saúde pública em diferentes partes do mundo. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi realizar a caracterização molecular de 66 amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de KPC, NDM e OXA-48-like provenientes de diferentes estados brasileiros, obtidas de diferentes materiais clínicos, no período entre 2010 a 2014. A confirmação da produção de carbapenemases, identificação da variante alélica e avaliação do ambiente genético foram realizadas por PCR e sequenciamento. A susceptibilidade aos antimicrobianos foi determinada através de difusão em ágar (CLSI, 2015) e determinação da CIM por Etest® (Nota Técnica N°1/2013 ANVISA). Foi realizada pesquisa através de PCR para genes de resistência a beta-lactâmicos, aminoglicosídeos e quinolonas, bem como pesquisa de genes de virulência. Para análise epidemiológica, PFGE e MLST foram utilizados. A identificação do plasmídeo carreador do gene codificador de carbapenemases foi realizada através de extração plasmidial e hibridização. O sequenciamento genômico foi realizado em 11 amostras selecionadas para investigação da presença e o ambiente genético de genes de resistência, genes de virulência, bem como realização de análise da relação filogenética entre as amostras estudadas. As variantes genéticas dos genes codificadores de carbapenemases foram *bla*<sub>KPC-2</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub> e *bla*<sub>OXA-370</sub>. Observamos o fenótipo de multirresistência em todas as amostras incluídas no estudo, sendo dez amostras resistentes a oito das nove classes de antimicrobianos testadas. Genes adquiridos codificadores de resistência a beta-lactâmicos, aminoglicosídeos, quinolonas, fosfomicinas, sulfonamidas, macrolídeos, fenicolis, tetraciclina, rifampicina e trimetoprima foram encontrados através de PCR e sequenciamento genômico. Além dos genes de resistência adquiridos, observamos mutações em genes relacionados à resistência a quinolonas (*gyrA*, *parC*, *parE*, *oqxR*), tigeclina (*ramR* e *acrR*), e mutações nas porinas *OmpK35* e *OmpK36* através do sequenciamento genômico, demonstrando o grande arsenal e a grande capacidade de aquisição de diferentes mecanismos de resistência entre as amostras. Não observamos, através do PCR ou sequenciamento genômico, os principais fatores de virulência associados às amostras hipervirulentas, como *magA* (*wzy*<sub>KPK1</sub>), *rmpA*, *rmpA2*, sendo detectados na maioria das amostras genes associados à adesão e sobrevivência bacteriana, como produção de fímbrias e adesinas (*mrkD* = 96,9%; *fimH*=100%; *ycfm* = 100%) e transporte de sideróforos (*entB*=100%). Nas amostras positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub> encontramos a estrutura completa do Tn4401 isoforma b em 84,3% das amostras. Observamos o gene *bla*<sub>KPC-2</sub> associado a um mesmo plasmídeo de 40kb em 41,9% das amostras, que apresentou estrutura genética similar a um plasmídeo já descrito na literatura. Nas amostras positivas para *bla*<sub>NDM-1</sub> observamos, em todas, a associação do gene *bla*<sub>NDM-1</sub> com *ISAbal25* e *ble*<sub>MBL</sub>, e através do sequenciamento genômico, observamos a estrutura completa do Tn3000. O gene *bla*<sub>OXA-370</sub> foi encontrado em plasmídios de 25kb (duas amostras), 50 kb e 117kb, sendo observado flanqueado *upstream* por uma transposase Tn3 truncada por *IS5075-like* e *downstream* por uma transposase Tn4 truncada por *IS15-like* nas amostras sequenciadas. Observamos 30 grupos clonais por PFGE e 27 *sequence types*, com destaque para os grupos KPC\_A/ST437; KPC\_C/ST11 e KPC\_Q/ST340 nas amostras positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub>, pertencentes ao Complexo Clonal 11 (CC11), mundialmente associado à dispersão dessa carbapenemase. Nas amostras positivas para *bla*<sub>NDM-1</sub> e *bla*<sub>OXA-370</sub> os grupos clonais mais observados foram NDM\_A/ST37 (41,6%) e OXA-370\_A/ST16 (95,4%) respectivamente. A análise filogenética a partir do genoma corroborou os agrupamentos realizados através de MLST. Principalmente nas amostras do CC11 positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub> e nas amostras do ST16 positivas para *bla*<sub>OXA-370</sub> observamos o acúmulo de mutações associadas a genes de resistência e nas porinas. Acreditamos que estas mutações podem contribuir para o fenótipo de resistência e consequentemente, auxiliar no sucesso desses clones prevalentes. Este estudo alerta para a presença de amostras multirresistentes produtoras de carbapenemases em nosso país carregando um grande arsenal de genes de resistência adquirida associados a elementos genéticos móveis, mas também apresentando mutações associadas à resistência e carregando alguns genes de virulência, fato preocupante devido às limitações para tratamento.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### Caracterização molecular de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapenemases do tipo KPC-2, NDM-1 e OXA-370 isoladas no Brasil

#### ABSTRACT - TESE DE DOUTORADO

Polyana Silva Pereira

Multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* producing KPC, NDM or OXA-48-like carbapenemases involved in hospital infections are currently one of the major public health problems in different parts of the world. Thus, the aim of this study was to perform molecular characterization of 66 KPC, NDM and OXA-48-like producing *Klebsiella pneumoniae* from different Brazilian states, obtained from different clinical specimens between 2010 and 2014. Confirmation of carbapenemases production, identification of the allelic variant and the genetic environment of the carbapenemase gene was evaluated by PCR and sequencing. The antimicrobial susceptibility was determined by agar diffusion (CLSI, 2015) and MIC determination by Etest® (Technical Note No.1/2013 ANVISA). We searched for resistance genes to beta-lactams, aminoglycosides, quinolones, as well as virulence genes by PCR. For epidemiological analysis, PFGE and MLST were used. The identification of the plasmid carrying the carbapenemase gene was performed by plasmid extraction and hybridization. Genomic sequencing was conducted on 11 samples selected in order to investigate the presence and the genetic environment of resistance genes, virulence genes and performing phylogenetic analysis. Genetic variants of genes encoding carbapenemases were *bla*<sub>KPC-2</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub> and *bla*<sub>OXA-370</sub>. We observed the multidrug resistance phenotype in all strains, being ten samples resistant to eight of the nine classes of antimicrobials tested. Applying PCR and genomic sequencing, we observed acquired resistance genes to beta-lactams, aminoglycosides, quinolones, fosfomicins, sulfonamides, macrolides, phenicols, tetracyclines, trimethoprim, rifampicin. In addition to the acquired resistance genes, we found mutations in genes related to resistance to quinolones (*gyrA*, *parC*, *parE*, *oqxR*), tigecycline (*ramR* e *acrR*), and mutations in porins OmpK35 and OmpK36, demonstrating the great arsenal and great ability to acquire different resistance mechanisms between samples. We did not observe through PCR and genome sequencing the major virulence factors associated with hypervirulent *K. pneumoniae* clones, such as *magA* (*wz*<sub>YKPK1</sub>), *rmpA*, *rmpA2*, being detected in most samples genes associated with adherence and bacterial survival, as production of fimbriae and adhesins (*mrkD* = 96,9%; *fimH*=100%; *ycfm* = 100%) and siderophores (*entB*=100%). In KPC-2 producing strains we observed the complete structure of Tn4401 b in 84.3% of samples. This gene was associated to a single plasmid of 40kb in 41.9% of the samples, which showed a similar genetic structure to a plasmid previously described in São Paulo. *bla*<sub>NDM-1</sub> gene was associated to IS*Aba125* and *ble*<sub>MBL</sub> in all strains, and by genomic sequencing, we found the complete structure of Tn3000. The *bla*<sub>OXA-370</sub> gene was found on plasmids 25kb (two samples), 50kb and 117kb and in the samples selected for genome analysis, this gene was observed flanked upstream by a transposase Tn3 truncated by a IS5075-like and downstream by a transposase Tn4 truncated by one IS15-like. We observed 30 clonal groups by PFGE and 27 sequence types, being KPC\_A/ST437; KPC\_C/ST11 and KPC\_Q/ST340 the most important. These sequence types belongs to CC11, associated with the dissemination of this carbapenemase worldwide. In NDM-1 and OXA-370 producing strains, the most observed clonal groups were NDM\_A/ST37 (41.6%) and OXA-370\_A/ST16 (95.4%) respectively. Phylogenetic analysis from the genome supported the groups made by MLST. Particularly in KPC-2 producing *K. pneumoniae* belonging to CC11 and in OXA-370 producing *K. pneumoniae* of ST16 we observed the accumulation of mutations in genes associated with resistance and porins. We believe these mutations may contribute to the resistance phenotype and thus assist in the success of prevalent clones. This study showed the presence of carbapenemases producing multiresistant samples in our country carrying a large arsenal of acquired resistance genes associated with mobile genetic elements, but also presenting mutations associated with resistance and some virulence genes, which is worrisome due to the limited therapeutic options.

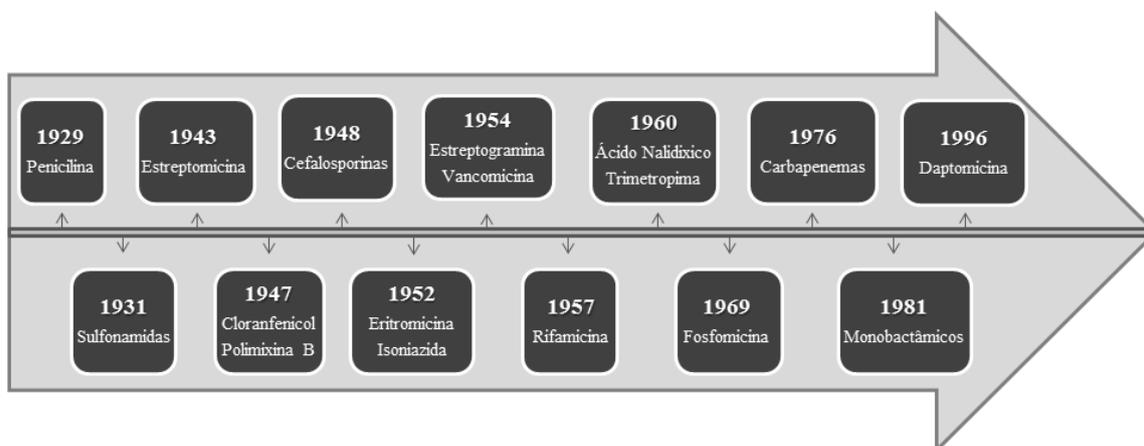
# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Antimicrobianos

Os seres humanos foram, ao longo da história, assolados por diferentes manifestações clínicas e doenças causadas por microrganismos patogênicos. Temos observado ao longo dos séculos uma verdadeira batalha entre os humanos e os patógenos com poder de causar infecções. Diferentes enfermidades têm afetado substancialmente a população humana, causando surtos, sendo as responsáveis pela maioria das mortes, gerando elevadas taxas de mortalidade e morbidade ao longo dos séculos. Entretanto, este panorama sofreu uma grande modificação a partir do século 20, com o início da era moderna de terapia antimicrobiana em 1929. Naquele ano, Alexander Fleming realizou a descoberta da penicilina (1). Este evento emblemático foi seguido pela descoberta de outros antimicrobianos como as sulfonamidas em 1935 por Domagk (2) e de outros compostos como estreptomicina, cloranfenicol e tetraciclina pouco tempo depois. Na década de 50, estes fármacos já estavam disponíveis na terapêutica.

Dessa forma, a partir do desenvolvimento e da utilização de antimicrobianos, pudemos observar melhora na qualidade de vida expresso pelo aumento da expectativa de vida, prevenção e tratamento de infecções, menor tempo de recuperação das doenças, capacidade de realização de transplantes e outras cirurgias de grande porte e maior longevidade para nossa espécie (3).

Abaixo, observamos uma figura da linha do tempo do descobrimento dos antimicrobianos com capacidade de inibir o crescimento bacteriano nos últimos anos.



**Figura 1.1:** Principais antimicrobianos descritos ao longo das últimas décadas, adaptado de Who, 2014 (4).

Apesar dos grandes avanços no desenvolvimento de novos medicamentos, hoje a humanidade tem enfrentado a diminuição na produção de novos fármacos antimicrobianos. Um estudo apontou que entre 1980 e 1984 (período de 04 anos), dezenove novos antimicrobianos foram disponibilizados no mercado americano, enquanto que entre os anos 2010 e 2014, apenas seis novos antimicrobianos foram introduzidos (5). As dificuldades relacionadas ao desenvolvimento de novos fármacos são relacionadas à grande necessidade de pesquisa e desenvolvimento de novos princípios ativos por requererem alta tecnologia e exigirem grandes investimentos em longo prazo, além do longo período necessário para a inclusão de um novo fármaco no mercado, que varia de 10 a 15 anos após a realização dos ensaios pré-clínicos e clínicos (6).

A diminuição do desenvolvimento de novos fármacos antimicrobianos teve início na década de 60, quando um cirurgião americano General Willian H. Stewart, em 1967, afirmou: “Está na hora de fechar o livro sobre doenças infecciosas, declarar ganha a guerra contra peste, e desviar os recursos nacionais para a resolução das doenças crônicas”. Como consequência deste tipo de pensamento, esforços de pesquisa e desenvolvimento foram deslocados para estudos de doenças crônicas, como diabetes, doenças cardíacas e câncer. Acredita-se que alguns dos avanços farmacêuticos pra o tratamento de doenças crônicas não teriam sido alcançados se os recursos não fossem desviados da pesquisa de antimicrobianos, entretanto, devido a este pensamento, estamos enfrentando atualmente extrema dificuldade para o tratamento de doenças infecciosas (7).

A exigência para o desenvolvimento de novos antimicrobianos ainda é maior pois estes fármacos precisam ter toxicidade apenas contra o microrganismo, ter maior espectro de atividade possível, ser desprovidos de propriedade alergênica, causar dano mínimo a microbiota normal, ter boa distribuição entre os tecidos e fluidos do organismo, ser de fácil produção, ter meia-vida longa e não possuir resistência descrita. Desta forma, apesar do grande número de compostos candidatos a agente antimicrobianos, não possuímos até hoje um arsenal tão vasto quanto seria necessário para combater os fenômenos de resistência (8).

A grande maioria dos agentes antimicrobianos utilizados para o tratamento de infecções bacterianas atualmente está categorizada de acordo com seu principal mecanismo de ação, representados por: [1] inibição da síntese proteica, [2] interferência na síntese de ácidos nucleicos, [3] inibição de vias metabólicas, [4] rompimento da membrana celular, [5] interferência na síntese da parede celular. A classificação dos principais antimicrobianos e seus mecanismos de ação podem ser observados na tabela a seguir.

**Tabela 1.1:** Classificação dos principais antimicrobianos disponíveis para tratamento de infecções bacterianas, adaptado de Tenover e colaboradores, 2006 (3).

<b>Mecanismo de ação</b>	<b>Classe (Exemplo de antimicrobianos)</b>	<b>Mecanismo de ação específico</b>
Interferência na síntese da parede celular	Beta-lactâmicos (Penicilinas, Cefalosporinas, Carbapenemas e Monobactâmicos)	Ligação às PBPs, inibindo a síntese do peptidoglicano
	Fosfomicina	Inibição da enzima MurA, inibindo a primeira etapa da síntese de peptidoglicano
	Glicopeptídeos (Teicoplanina e Vancomicina)	Ligação a D-alanina, inibindo a síntese do peptidoglicano
Inibição da síntese proteica	Aminoglicosídeos (Amicacina e Gentamicina), Glicilciclina (Tigeciclina) e Tetracilinas	Ligam-se a subunidade ribossomal 30S, inibindo a síntese proteica
	Cloranfenicol, Macrolídeos, Estreptograminas, Lincosamidas (Clindamicina), Oxazolidinonas (Linezolida)	Ligam-se à subunidade ribossomal 50S, inibindo a síntese proteica
Interferência na síntese de ácidos nucleicos	Fluoroquinolonas (Ciprofloxacina)	Inibem a síntese de DNA através da ligação com DNA girase e DNA topoisomerase
	Rifampicina	Inibem a síntese de RNA através da ligação com RNA polimerase
Rompimento de membrana plasmática	Polimixinas (Polimixina B e Colistina)	Aumentam a permeabilidade da membrana através da interrupção das ligações que estabilizam o LPS
Inibição de vias metabólicas	Sulfonamidas e Pirimidinas	Inibe a via de síntese do ácido fólico

## 1.2 Resistência aos antimicrobianos e infecções hospitalares

Desde sua descoberta, os antimicrobianos com capacidade antibacteriana têm sido considerados pela população como a panacéia para cura de infecções (4). Entretanto, antes mesmo da liberação da penicilina para a prática clínica, os cientistas já observaram fenômenos de resistência aos antimicrobianos em algumas amostras bacterianas. Em seu discurso ao ganhar o Prêmio Nobel em 1945, Alexander Fleming advertiu que as bactérias teriam a capacidade de se tornar resistentes a esses medicamentos notáveis (4). Dessa forma, o entusiasmo inicial provocado pelo descobrimento de fármacos capazes de curar enfermidades antes consideradas incuráveis foi rapidamente transformado em preocupação.

As bactérias podem ser intrinsicamente resistentes ou adquirir resistência a determinado antimicrobiano. A resistência intrínseca a uma ou mais classes de

antimicrobianos é caracterizada por todas as cepas da mesma espécie apresentarem resistência a todos os representantes de uma determinada classe de antimicrobianos. Já a resistência adquirida ocorre quando populações inicialmente susceptíveis de bactérias se tornam resistentes a um agente antibacteriano, podendo proliferar-se e espalhar-se sob a pressão seletiva do uso desse agente (3). Os mecanismos pelos quais as bactérias se tornam resistentes são: [1] mutações em genes cromossômicos; [2] aquisição de material genético por transferência horizontal de genes; [3] alteração do sítio alvo ao qual o agente antibacteriano se liga; [4] produção de enzimas que inativam o agente antimicrobiano; [5] alteração de permeabilidade seletiva da membrana externa; ou [6] expressão de bombas de efluxo que expõem o fármaco da célula (3).

Atualmente, o fenômeno da resistência bacteriana é uma grande preocupação para a comunidade científica e um problema de saúde pública. Alguns fatores têm contribuído para esta situação, e serão vistos com mais detalhe a seguir: instituições de saúde tem se tornado multiplicadoras dos fenômenos de resistência; existência de grande pressão seletiva no uso de antimicrobianos; facilidade de dispersão de amostras multirresistentes no ambiente intra e extra-hospitalar; facilidade de dispersão de determinantes de resistência entre populações bacterianas.

As bactérias usualmente multirresistentes, como é o caso de alguns Gram-positivos como: *Staphylococcus* spp. e *Enterococcus* spp.; e alguns Gram-negativos como: *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. têm se tornando habitantes comuns em instituições de saúde, o que acarreta na maior probabilidade de aquisição de infecções hospitalares causadas por esses patógenos (3).

A infecção hospitalar ou relacionada à assistência a saúde é caracterizada como sendo qualquer infecção adquirida posteriormente à internação e que se manifeste durante ou mesmo após a alta, quando puder ser relacionada com procedimentos hospitalares médicos ou à internação (9). Essas infecções contribuem para maiores índices de morbidade e mortalidade, tempos de internação prolongados, custos altos e principalmente trazem ameaça constante de disseminação dos mecanismos de resistência (10). As diversas consequências das infecções podem ser o dano psicológico e físico ao paciente durante a hospitalização, perda de órgãos vitais dos pacientes, danos pessoais e a familiares, processos legais, diminuição da expectativa e qualidade de vida do paciente, e em alguns casos o óbito do paciente (9). Além disso, o uso de terapias antibacterianas empíricas, através da utilização inicial de um antimicrobiano cujo patógeno é resistente, tem sido associado ao aumento das taxas de mortalidade em pacientes

com infecções da corrente sanguínea causadas por diversos microrganismos como *K. pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., dentre outros (3).

Outro grande problema é que estes antimicrobianos têm sido excessivamente utilizados na prática clínica, por vezes sendo empregados para o tratamento de enfermidades nas quais os antimicrobianos são ineficazes (doenças virais). Em alguns países, os antimicrobianos podem ser adquiridos pela população em geral sem receituário médico, o que facilita a automedicação (4). Outro fator relevante é relacionado ao abandono no tratamento. Pacientes relatam que após observar melhora do quadro clínico, não levam o tratamento antimicrobiano prescrito pelo clínico até o fim, o que pode gerar pressão seletiva para seleção de agentes resistentes em pacientes da comunidade (4).

Bactérias resistentes também têm alto poder de disseminação, não só dentro das instituições de saúde, mas também na comunidade e no ambiente, tornando mais difícil o controle de infecções. A propagação de bactérias resistentes na comunidade acarreta problemas para o controle das infecções, não apenas em instalações de saúde como hospitais e ambulatórios, mas também em locais com aglomerados humanos. O controle da propagação desses patógenos também é complicado devido ao atual aumento da mobilidade da nossa população, fazendo com o que mecanismos de resistência inicialmente restritos a uma localidade se espalhem mundialmente (11). Além disso, muitos antimicrobianos têm sido utilizados como promotores de crescimento em animais de criação, aumentando a pressão seletiva também no ambiente, o que facilita a propagação da resistência (12). Outro fator relevante é a ausência de saneamento básico para grande parte da população mundial, ajudando também na dispersão de microrganismos (13).

A aquisição de material genético pelas bactérias pode ser mediada através dos mecanismos de intercâmbio genético: transdução, conjugação e transformação. A transdução compreende a transferência genética com auxílio de bacteriófagos e na transformação há captação de DNA existente no meio externo por células receptoras competentes. Entretanto, a conjugação é o mecanismo mais comum de transferência genética entre bactérias, cuja troca de material genético ocorre através de contato célula a célula, mediado por um *pilus* sexual especializado (3).

Com o aumento do uso de agentes antimicrobianos, observa-se o aumento do nível de complexidade e o número de mecanismos de resistência apresentados pelos patógenos, tornando cada dia mais difícil o tratamento das infecções de patógenos multirresistentes. Vale

ressaltar que o desenvolvimento de mecanismos de resistência aos antimicrobianos é um processo evolutivo dos microrganismos, que, contudo, tem sido acelerado pela enorme pressão seletiva através da utilização maciça desses fármacos.

A resistência bacteriana pode resultar na falha do tratamento das infecções, que pode ter consequências graves, especialmente em pacientes criticamente enfermos. Além disso, podemos observar que a presença de bactérias apresentando diversos mecanismos de resistência acarreta numa elevação dos custos com o tratamento dos indivíduos, visto que o tempo de internação e a duração do tratamento são aumentados, além de gerar maiores gastos com os agentes antimicrobianos utilizados (11).

Frente a grande problemática da resistência aos agentes antimicrobianos normalmente utilizados na prática clínica, novas alternativas às moléculas comumente utilizadas têm sido estudadas. Ao contrário dos antimicrobianos convencionais, tais alternativas podem ser direcionadas para bactérias específicas de modo a evitar a seleção de bactérias resistentes. Alguns exemplos de terapias alternativas para o tratamento de antimicrobianos são a utilização de fagos com capacidade lítica contra bactérias específicas; uso de bacteriocinas, que são pequenos peptídeos sintetizados ribossomicamente por bactérias e que tem a capacidade de inibir o crescimento de espécies estritamente relacionadas através da inserção na membrana plasmática das bactérias alvo formando poros e causando lise; bem como o uso de bactérias predatórias, como por exemplo, *Bdellovibrio* e organismos relacionados, que são Deltaproteobactérias móveis que predam obrigatoriamente bactérias Gram-negativas para buscar energia e nutrientes, através da utilização de um arsenal enzimático (14).

Dentro do cenário da resistência antimicrobiana, os Bastonetes Gram-negativos multirresistentes são reconhecidos como importantes agentes etiológicos de infecções, descritos em percentuais endêmicos e epidêmicos em hospitais de todo o mundo.

O CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) publicou em 2013 um documento apontando os principais desafios relacionados à resistência antimicrobiana nos Estados Unidos. Enterobactérias resistentes aos carbapenemas foram consideradas como desafios urgentes, que demandam extremo investimento e atenção dos gestores de saúde, ao lado de *Neisseria gonorrhoeae* resistente a antimicrobianos e *Clostridium difficile*. É estimado que ocorra a cada ano nos Estados Unidos 140.000 infecções hospitalares causadas por enterobactérias e, destas, 9.000 causadas por enterobactérias resistentes aos carbapenemas. Em 11% das infecções tem sido observada a presença de amostras resistentes

de *K. pneumoniae*, o que vem causando em torno de 500 mortes por ano no país. Classificados como desafios importantes, também foram agrupadas as enterobactérias produtoras de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL), que tem causado anualmente aproximadamente 26.000 infecções e 1.700 mortes no país (15).

Um estudo conduzido pelo ECDC (*European Centre for Disease Prevention and Control*), contemplando 30 países e mais de 1.000 hospitais na Europa, mostrou que das 15.000 infecções reportadas, as mais frequentes foram: infecções do trato respiratório (23.5%), infecções de sítios cirúrgicos (19.6%); infecções urinárias (19%); infecções da corrente sanguínea (10.7%) e infecções do trato gastrointestinal (7.7%). Os dez microrganismos mais frequentemente isolados foram: *E. coli* (15.9%), *Staphylococcus aureus* (12.3%), *Enterococcus* spp. (9.6%), *P. aeruginosa* (8.9%), *Klebsiella* spp. (8.7%), *Staphylococcus* coagulase negativo (7.5%), *Candida* spp. (6.1%), *Clostridium difficile* (5.4%), *Enterobacter* spp. (4.2%), *Proteus* spp. (3.8%) e *Acinetobacter* spp. (3.6%). Dentre as amostras de *Klebsiella* spp., 53% eram resistentes às cefalosporinas de terceira geração e 19.3% resistentes aos carbapenemas (16).

Em um estudo de vigilância epidemiológica realizado pelo SENTRY, Gales e colaboradores (2012) analisaram 5.704 casos de infecções hospitalares causadas por bacilos Gram-negativos coletados na Argentina, Brasil, Chile, e México entre janeiro de 2008 e dezembro de 2010. Observou-se de forma geral que *E. coli*, *P. aeruginosa* e *Klebsiella* spp. foram os principais microrganismos isolados. *E. coli* foi o segundo patógeno mais isolado a partir de infecções da corrente sanguínea (19%) e *P. aeruginosa* foi o principal agente causador de pneumonia (31,2%). O estudo ainda mostrou que o Brasil foi o país com maior taxa de bastonetes Gram-negativos multirresistentes (40,9%). As amostras de *Klebsiella* spp. apresentaram susceptibilidade reduzida aos carbapenemas (em torno de 11% de resistência a imipenem e meropenem) e à colistina (3,2% de resistência) e aproximadamente 50% das amostras dessa espécie foram resistentes às cefalosporinas de terceira e quarta gerações (17).

Os dados mais recentes disponíveis da Rede Nacional de Monitoramento de Resistência Microbiana em Serviços de Saúde, onde se contemplou os agentes etiológicos e os fenótipos de resistência notificados ao Sistema Nacional de Vigilância Sanitária que foram responsáveis por causar infecções primárias de corrente sanguínea confirmadas laboratorialmente, associadas ao uso de cateter venoso central em pacientes adultos, pediátricos e neonatos internados em unidades de terapia intensiva (UTI) entre janeiro e dezembro de 2013 no Brasil, apontaram os cinco principais microrganismos associados às

infecções na corrente sanguínea: *Staphylococcus* coagulase negativo, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter* spp. e *P. aeruginosa*. Neste estudo, 31.7% das amostras de *K. pneumoniae* foram resistentes somente a cefalosporinas de terceira e quarta geração enquanto que 33% foram resistentes a esses antimicrobianos, mas também aos carbapenemas (18).

### 1.3 *Klebsiella pneumoniae*

*Klebsiella pneumoniae* é a espécie de maior importância clínica do gênero *Klebsiella*. Este gênero pertencente à família *Enterobacteriaceae*, ordem Enterobacteriales, Classe Gammaproteobacteria, ao filo Proteobacteria (19).

O gênero *Klebsiella* recebeu este nome em homenagem ao microbiologista alemão Edwin Klebs (1834 - 1913) por Trevisan (1885). Desde sua descrição inicial, o gênero *Klebsiella* tem sofrido modificações em sua taxonomia. Originalmente, as espécies foram diferenciadas de acordo com suas características patogênicas, quanto à sua origem ou doenças causadas: *Klebsiella rhinoscleromatis* (rinoscleroma), *K. pneumoniae* (pneumonia) e *Klebsiella ozaenae* (rinite atrófica) (20). Posteriormente, foram classificadas de acordo com provas bioquímicas, utilização de diversos substratos, e atividade enzimática. Finalmente, estudos moleculares permitiram a identificação de novas espécies e a reclassificação das já existentes, alterando a taxonomia deste gênero (19).

Atualmente, o gênero *Klebsiella* é composto de cinco espécies: *Klebsiella alba*, *Klebsiella granulomatis*, *Klebsiella michiganensis*, *Klebsiella oxytoca*, e *K. pneumoniae* (21). Esta última foi subclassificada em três subespécies: *K. pneumoniae* subespécie *pneumoniae*, *K. pneumoniae* subespécie *ozaenae* e *K. pneumoniae* subespécie *rhinoscleromatis*. A *K. pneumoniae* subespécie *pneumoniae* é a mais observada em infecções em humanos dentre as três subespécies (22).

*K. pneumoniae* tem como principais características ser não esporulada, aeróbia facultativa, com tamanho aproximado de 0,3 x 1,5 µm a 0,4 x 2,0 µm. Podem ser observadas em células únicas, em pares ou em cadeias curtas. Não produz gás sulfídrico (H<sub>2</sub>S) e enzima citocromo oxidase. Utiliza o citrato como única fonte de carbono e possui a enzima lisina descarboxilase. É negativa na prova do indol, imóvel e urease positiva. No Ágar EMB, produz colônias rosadas com centro negro, de aparência brilhante, com consistência mucoide devido a grande produção de cápsula (23).

A primeira amostra de *K. pneumoniae* a ter seu genoma completamente sequenciado e montado foi a MGH 78578 (ATCC 700721), isolada de escarro em 1994 de um paciente de 66 anos que apresentava pneumonia (Número de acesso GenBank: NC\_009648.1). Esta cepa é resistente a variados antimicrobianos, tais como: ampicilina, ticarcilina, sulfametoxazole/trimetoprima, gentamicina, sendo suscetível à amicacina, ciprofloxacina e imipenem. O genoma foi sequenciado com uma cobertura de 8X, apresentando 5.315.120 pares de bases, com aproximadamente 5926 genes. A média de conteúdo G/C do cromossomo foi 57,7%, considerado o mais alto conteúdo G/C entre as espécies da família *Enterobacteriaceae* (24). Atualmente, já estão disponíveis no RefSeq (NCBI Reference Sequence Database) 53 genomas completos de *K. pneumoniae* (acesso em 27 de dezembro de 2015).

Assim como as demais espécies do gênero, *K. pneumoniae* encontra-se distribuída na natureza, encontrada em corpos hídricos, esgoto, solo, vegetação e também colonizando mucosas, principalmente do trato gastrointestinal, de diversos mamíferos (25).

A relação deste organismo extracelular com humanos varia desde colonização a infecções. Os principais veículos para a transmissão de *K. pneumoniae* no ambiente hospitalar são equipamentos médicos contaminados, produtos derivados de sangue, trato gastrointestinal dos pacientes e as mãos não higienizadas dos profissionais de saúde. Este microrganismo tem grande capacidade de disseminar-se, o que tem acarretado em diversos surtos, especialmente em unidades neonatais (26). Dentre as síndromes clínicas mais frequentes citam-se: bacteremias, infecções do trato urinário, pneumonias, feridas, rinite crônica atrófica, artrites, enterites, meningites em crianças e sepse. Já como parte da microbiota, este organismo usualmente é encontrado colonizando a pele, a nasofaringe e principalmente, o trato gastrointestinal dos indivíduos (22).

### **1.3.1 Resistência aos antimicrobianos em *K. pneumoniae***

#### **1.3.1.1 Resistência aos beta-lactâmicos**

Os antimicrobianos beta-lactâmicos são até hoje os mais utilizados na prática clínica, principalmente devido a sua baixa toxicidade. Eles têm como característica comum a presença do anel beta-lactâmico na estrutura da molécula. Seu mecanismo de ação é através da inibição das ligações cruzadas entre as moléculas de peptidoglicano, inibindo a síntese da parede celular. O anel beta-lactâmico é uma estrutura quimicamente similar a D-alanina-D-alanina dos pentapeptídeos que formam a parede de peptidoglicano. Dessa forma, as transpeptidases

PBP inserem erroneamente o anel beta-lactâmico no lugar da D-alanina-D-alanina, ocorre a acilação das PBP, e estas ficam impossibilitadas de realizar suas funções corretamente, causando a lise celular bacteriana (27).

Existem quatro classes de beta-lactâmicos disponíveis comercialmente: penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenemas. Entretanto *K. pneumoniae* apresentam mecanismos de resistência a esses antimicrobianos através da diminuição da expressão de porinas (OMP), aumento da expressão bombas de efluxo e produção de enzimas beta-lactamases (28).

Em *K. pneumoniae* tem sido descrito a participação de perdas ou diminuição da expressão de porinas na resistência a alguns beta-lactâmicos como os carbapenemas, mas também a fluoroquinolonas, cloranfenicol e tetraciclina. As porinas mais importantes em *K. pneumoniae* são a OmpK35 e OmpK36 onde mutações pontuais, inserções e deleções nos genes que as codificam têm sido associadas à diminuição da susceptibilidade. Entretanto, a diminuição da expressão ou deleção de porinas geralmente acarreta na diminuição da susceptibilidade a determinado beta-lactâmico e não é suficiente para a produção de fenótipo de plena resistência aos beta-lactâmicos (29).

Bombas de efluxo também têm sido descritas relacionadas à resistência à beta-lactâmicos em *K. pneumoniae*. Estas bombas são compostas por proteínas de transporte envolvidas na expulsão de substratos tóxicos do interior das células bacterianas para o ambiente externo e são encontradas em Gram-positivos, Gram-negativos e em organismos eucarióticos. Podem ser específicas para determinado substrato, como a bomba MacABC-TolC, específica para o transporte de macrolídeos em *E. coli* (30), ou podem transportar uma gama de compostos estruturalmente distintos. Dentre os procariotos, existem cinco famílias de transportadores de efluxo: MATE (efluxo de multidrogas e moléculas tóxicas), MF (facilitador maior), SMR (pequena multirresistência), RND (resistência, modulação e divisão) e ABC (cassete ligação a ATP). Em *K. pneumoniae* as bombas de efluxo AcrAB-TolC, AcrEF-TolC e EmrB têm sido apontadas com as de maior relevância, sendo a bomba AcrAB-TolC, da família RND, a mais importante relacionada à resistência aos beta-lactâmicos, fluoroquinolonas, gliciliclinas e macrolídeos (31, 32).

A produção de beta-lactamases tem sido apontada como o mais importante mecanismo de resistência aos beta-lactâmicos. Estas enzimas encontram-se amplamente distribuídas entre bactérias Gram-positivas e negativas. Seu mecanismo de ação é através da hidrólise do anel

beta-lactâmico presente no núcleo estrutural dessa família, ficando este sem atividade. A primeira beta-lactamase descrita foi identificada em uma *E. coli* antes mesmo da difusão em larga escala do uso da penicilina para a prática médica (33).

As beta-lactamases, desde a sua descoberta, já foram classificadas de diferentes formas, geralmente baseado no seu espectro hidrolítico, susceptibilidade a inibidores e sua localização genética. A classificação fenotípica apresenta alguns problemas pois uma mutação pontual pode ter a capacidade de alterar substancialmente a especificidade da enzima pelo substrato e o poder de ação dos inibidores, podendo alterar assim o grupo no qual a enzima é classificada. Desta forma, a classificação por meio da sequência peptídica, proposta inicialmente por se em 1980 se mostrou bem mais estável por refletir as relações fundamentais entre as moléculas que não podem ser modificadas por mutações (34).

Entretanto, apesar da sequência de aminoácidos ter se apresentado como uma forma interessante para a classificação das beta-lactamases, esta abordagem não se mostrou eficaz na prática clínica, uma vez que ainda não é possível somente com ferramentas de biologia molecular prever a função enzimática e conseqüentemente o perfil de susceptibilidade do organismo que carrega a beta-lactamase. Outro fator relevante é que para os clínicos é mais importante saber se aquele organismo estudado é susceptível ou resistente a um antimicrobiano do que a sequência de aminoácidos da beta-lactamase carregada pela bactéria. Assim, atualmente, a classificação de Bush, Jacob e Medeiros, proposta inicialmente em 1995 e revisada por Bush e Jacob em 2010, combinando a estrutura com características funcionais é a classificação mais aceita, pois se baseia nas propriedades bioquímicas, estrutura molecular e sequências nucleotídicas, separando as enzimas em quatro grupos funcionais e subgrupos (Tabela 1.2) (34).

**Tabela 1.2:** Classificação das beta-lactamases segundo Bush, 2010 (34).

Grupo Funcional Bush-Jacob	Classe Molecular	Exemplos	Características
1	C	AmpC de <i>P. aeruginosa</i> e <i>E. coli</i> ; CMY-2, FOX-1, MIR-1.	Enzimas cromossômicas e plasmidiais produzidas por bactérias Gram-negativas. Confere resistência a todos os $\beta$ -lactâmicos, exceto os carbapenemas. Não são inibidas por ácido clavulânico e tazobactam.
1e	C	GC1, CMY-37.	Enzimas que promovem a hidrólise de penicilinas, cefamicinas, cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos.
2a	A	PC1 e outras penicilinases de <i>Staphylococcus</i> sp. E <i>Enterococcus</i> spp.	Penicilinases produzidas por <i>Staphylococcus</i> spp. E <i>Enterococcus</i> spp. Conferem altos níveis de resistência à penicilina. Inibidas por ácido clavulânico e tazobactam.
2b	A	SHV-1, TEM-1, TEM-2, TEM-90.	Enzimas que possuem hidrólise eficiente de penicilinas e cefalosporinas das primeiras gerações, inibidas por ácido clavulânico e tazobactam.
2be	A	ESBL: CTX-M-15, CTX-M-44, PER-1, SFO-1, SHV-5, TEM-10, TEM-26,	Conferem resistência às penicilinas, cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos.
2br	A	TEM-30, TEM-76, TEM-103, SHV-10, SHV-26.	Enzimas que possuem hidrólise eficiente de penicilinas e cefalosporinas das primeiras gerações, entretanto não são bem inibidas por ácido clavulânico.
2ber	A	TEM-50, TEM-68, TEM-89	Promovem a hidrólise de penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e são pouco inibidas por ácido clavulânico e tazobactam.
2c	A	PSE-1, CARB-3	Enzimas que hidrolisam penicilinas e carbenicilina, inibidas por ácido clavulânico.
2d	D	OXA-1, OXA-10	Enzimas que hidrolisam a cloxacilina, levemente inibidas por ácido clavulânico.
2de	D	OXA-11, OXA-15	Hidrólise de penicilinas e cefalosporinas de amplo espectro, pouco inibidas por ácido clavulânico.
2df	D	OXA-23, OXA-48	Hidrolisam carbapenemas e cloxacilina, pouco inibidas por ácido clavulânico.
2e	A	CepA	Cefalosporinases inibidas por ácido clavulânico e tazobactam, mas não por aztreonam.
2f	A	IMI-1, KPC-2, KPC-3, SME-1, GES-2	Enzimas que hidrolisam carbapenemas e possuem uma serina no seu sítio ativo. Tais enzimas são pouco inibidas por ácido clavulânico e tazobactam.
3a	B	IMP-1, L1, NDM-1, VIM-1	Hidrólise de todos os beta-lactâmicos exceto monobactâmicos. Inibidas por EDTA e quelantes de metais, não inibidas por ácido clavulânico e tazobactam.
3b	B	CphA, Sfh-1	Hidrólise preferencial de carbapenemas. Inibidas por EDTA e quelantes de metais, não inibidas por ácido clavulânico e tazobactam.

Beta-lactamases do tipo AmpC são cefalosporinases codificadas cromossomicamente por algumas bactérias da família *Enterobacteriaceae*, principalmente por aquelas conhecidas como grupo CESP: *Citrobacter freundii*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Providencia* spp., *Morganella* spp. e *Hafnia alvei*. Nessas bactérias, as enzimas do tipo AmpC são indutíveis e podem ser expressas em níveis elevados através de mutações. Promovem resistência a cefalotina, cefazolina, cefoxitina, a maioria das penicilinas e combinações de beta-lactâmicos com inibidores. Alguns plasmídios transmissíveis adquiriram os genes codificadores de enzimas AmpC, desta forma esses genes têm sido descritos também em amostras onde estes genes não estão cromossomicamente localizados. Alguns exemplos de enzimas do tipo AmpC são: ACT-1, MIR-1, CMY-1 e CMY-2 (35).

Amostras clínicas de *K. pneumoniae* são naturalmente resistentes à ampicilina, amoxicilina, carbenicilina, ticarcilina devido à expressão constitutiva de beta-lactamases codificadas cromossomicamente. Três famílias de genes *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>OKP</sub>* e *bla<sub>LEN</sub>* evoluíram ao longo de milhões de anos de um ancestral comum e deram origem às beta-lactamases cromossômicas que observamos nas amostras dessa espécie (36). Entretanto, atualmente, um dos grandes problemas de resistência a antimicrobianos no mundo são os bastonetes Gram-negativos da família *Enterobacteriaceae* resistentes as cefalosporinas através da produção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL). Amostras de *K. pneumoniae* apresentam destaque neste cenário.

As ESBL são enzimas das classes moleculares A ou D (classificação de Ambler) ou dos grupos funcionais 2be ou 2de (classificação atualizada de Bush e Jacoby, 2010) (34) capazes de hidrolisar penicilinas de amplo espectro, cefalosporinas de terceira e quarta geração, bem como os monobactâmicos (37). Atualmente, existem diferentes ESBL descritas sendo as mais frequentemente encontradas aquelas da família TEM, SHV e CTX-M. No entanto, as do tipo OXA, PER, VEB, BES e GES também tem sido bastante reportadas na literatura (38).

As primeiras ESBLs descritas pertenciam à família TEM, derivadas da beta-lactamase TEM-1, sendo a TEM-12 a primeira enzima como perfil ESBL dessa classe descrita (39). Hoje, já existem mais de 223 enzimas desta família, sendo 93 caracterizadas com fenótipo ESBL (segundo o site <http://www.lahey.org/studies/other.asp#table1>, acesso em 27 de dezembro de 2015).

As enzimas do tipo SHV são mais comumente encontradas em *K. pneumoniae*, onde o gene *bla<sub>SHV-1</sub>* se encontra predominantemente no cromossomo (fenótipo não-ESBL) (40). De acordo com o website *Lahey Studies*, existem atualmente 193 enzimas do tipo SHV, sendo 45 plenamente caracterizadas como perfil ESBL (segundo o site <http://www.lahey.org/studies/other.asp#table1>, acesso em 27 de dezembro de 2015).

Hoje as ESBL mais disseminadas em todo o mundo são do tipo CTX-M, que hidrolisam preferencialmente cefotaxima. Existem 172 variantes alélicas de CTX-M (segundo o site <http://www.lahey.org/studies/other.asp#table1>, acesso em 27 de dezembro de 2015), sendo as mais observadas mundialmente as do tipo CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8 e CTX-M-15 (41).

Relatos da literatura descrevem a presença de um clone prevalente de *E. coli*, pertencente ao ST131 (identificados através da técnica de MLST) e carregando *bla<sub>CTX-M-15</sub>* associado a infecções urinárias em várias partes do mundo (42). Porém, também existem relatos da presença dessa variante alélica em diferentes espécies de *Enterobacteriaceae* tais como *K. pneumoniae* e *Enterobacter* spp., inclusive em nosso país (43, 44).

Com o aumento do isolamento de amostras produtoras de ESBL, os carbapenemas passaram a ser altamente prescritos pelos clínicos como alternativa para tratamento, pois apresentam espectro de ação mais elevado e maior estabilidade frente às ESBL. Com o aumento da utilização destes antimicrobianos, começaram a surgir amostras apresentando fenômenos de resistência. A resistência aos carbapenemas pode ser mediada por diferentes mecanismos, entretanto a produção de carbapenemases (beta-lactamases com atividade sobre carbapenemas) é apontada como o mecanismo epidemiologicamente mais importante (45).

As carbapenemases são enzimas com grande versatilidade de hidrólise. Possuem a capacidade de atuação frente a penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenemas. Essas enzimas são classificadas nas classes moleculares A (serino-carbapenemases; ex.: KPC, GES), B (metallo-carbapenemases, ex.: IMP, VIM e NDM) e D (oxacilinas, ex.: OXA-48-like), podendo ter seus genes codificadores localizados em cromossomos ou plasmídios (46).

As serino-carbapenemases NMC/IMI, SME e KPC foram identificadas pela primeira vez em *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* e *K. pneumoniae* respectivamente. Outra representante deste grupo é a enzima GES, da qual algumas variantes possuem perfil de carbapenemase (45). Recentemente, foi descrita uma nova serino-carbapenemase no Brasil, em três amostras de *K. pneumoniae* isoladas em São Paulo denominada BKC-1 (47).

Atualmente, a enzima mais importante clínico e epidemiologicamente desta classe é a KPC (46).

As metallo-carbapenemases mais comumente descritas são IMP e VIM encontradas principalmente em países Europeus e nos EUA e, mais recentemente, a NDM encontrada em *K. pneumoniae* oriundas principalmente da Índia, Paquistão, Reino Unido e EUA (48). Dentre as oxacilinas, as mais comuns são do tipo OXA-23 e OXA-51 em *Acinetobacter* spp. e da família OXA-48-like em enterobactérias (46). Dentre as várias carbapenemases descritas, as que têm sido mais associadas à *K. pneumoniae* são as do tipo KPC, NDM e OXA-48-like.

#### **1.3.1.1.1 *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)**

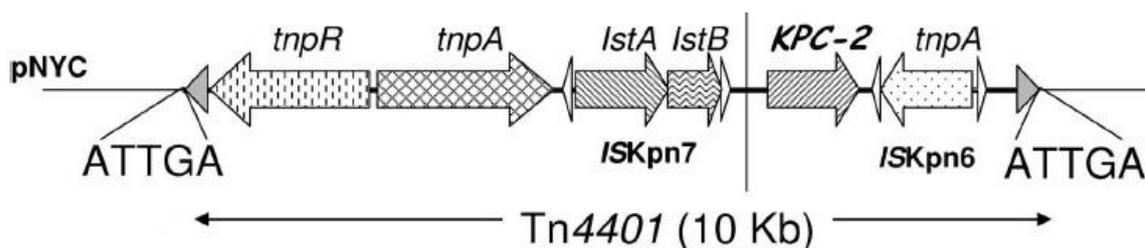
A primeira descrição da carbapenemase KPC ocorreu durante o projeto de vigilância ICARE na Carolina do Norte, Estados Unidos. Uma amostra de *K. pneumoniae* isolada em 1996 apresentava elevada concentração inibitória mínima (CIM) para os carbapenemas e resistência a todos os beta-lactâmicos testados. Esta resistência foi associada à produção de KPC-1, cujo gene estava localizado num plasmídeo (49).

Entretanto, a descoberta da KPC-1 foi seguida por diversos relatos ao longo da costa leste americana de uma variante em apenas um aminoácido, KPC-2. Esta nova variante foi inicialmente identificada em 2003, oriunda de quatro amostras do período de 1998-1999 que apresentavam elevada CIM para carbapenemas (50). Mais uma variante dessa enzima, KPC-3, começou a ser detectada entre amostras de *K. pneumoniae* isoladas em 2000 e 2001 causadoras de um surto em Nova York. As análises cinéticas dessa enzima demonstraram um perfil de hidrólise similar a KPC-2, entretanto um pouco maior em relação à ceftazidima (51).

Após uma análise detalhada das sequências dos genes codificadores de KPC descritos até aquele momento observou-se a ocorrência de um erro na publicação inicial desta carbapenemase (KPC-1). Dessa forma, concluiu-se que a sequência da KPC-1 era igual a da KPC-2 e sendo assim a nomenclatura KPC-2 passou a ser utilizada (49).

Esta carbapenemase é capaz de hidrolisar beta-lactâmicos de todas as classes, apresentando maior potencial de hidrólise para cefalotina, nitrocefina, benzipenicilina, ampicilina e piperacilina (52). São enzimas do grupo funcional 2f e da classe molecular A (Bush e Jacob, 2010) (34). Até o momento, já foram descritas vinte e quatro variantes alélicas de KPC (segundo o site <http://www.lahey.org/studies/other.asp#table1>, acesso em 27 de dezembro de 2015), sendo a KPC-2 a mais disseminada no mundo (53).

A grande capacidade de disseminação do gene *bla*<sub>KPC</sub> está relacionada a sua capacidade de associação com elementos genéticos móveis que facilitaríamos sua dispersão, tais como transposons e plasmídios conjugativos, principalmente o transposon Tn4401. Esse transposon pertence à família dos transposons Tn3 e é composto por uma transposase (*tnpA*), resolvase (*tnpR*), o gene *bla*<sub>KPC</sub>, duas sequências de inserção, *ISKpn7* e *ISKpn6*, além das sequências invertidas repetidas de 39 pb que flanqueiam o transposon e tem aproximadamente 10 kb (54).



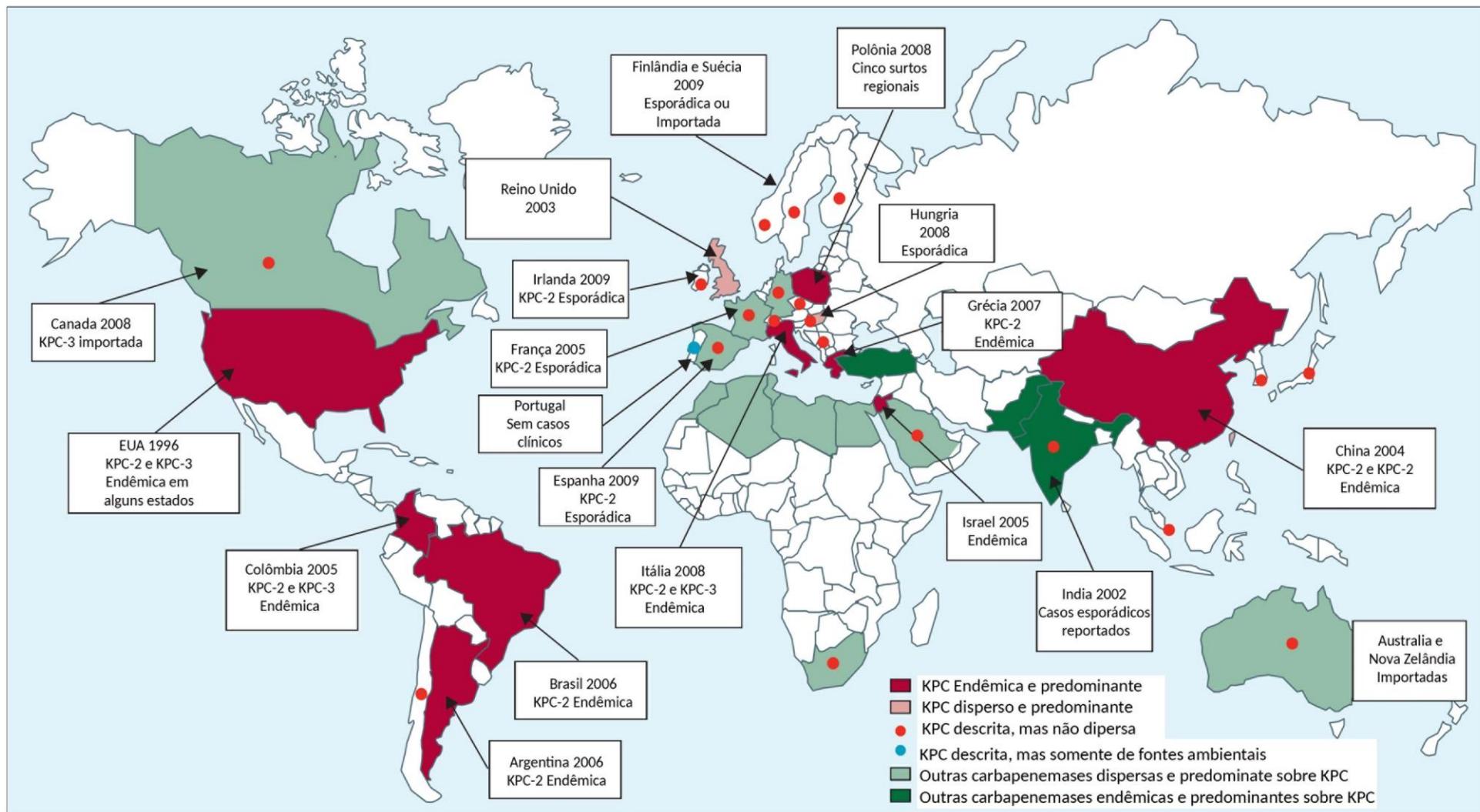
**Figura 1.2:** Esquema representativo do Transposon Tn4401, elemento genético que tem sido associado ao gene *bla*<sub>KPC-2</sub>. Imagem adaptada de Naas e colaboradores, 2008 (54).

Até o momento, já foram documentadas seis isoformas (“a”, “b”, “c”, “d”, “e” e “f”) desse elemento genético que são caracterizadas por variações na região da sequência de inserção *ISKpn7*, sendo as isoformas “a”, “b” e “c” as mais comumente encontradas (55). A sequência de inserção *ISKpn7* que não possui deleções é caracterizada como isoforma “b”, sendo seu produto de amplificação utilizando os iniciadores descritos por Kitchel e colaboradores em 2009 de 703pb (55). As demais isoformas possuem diferentes deleções na região do *ISKpn7*: a isoforma “a” deste transposon possui uma deleção de 99pb nessa região, a isoforma “c” possui uma deleção de 215pb; a “d” tem uma deleção de 68pb; e a “e” tem uma deleção de 255pb (56, 57).

Entretanto, algumas outras plataformas genéticas já foram descritas associadas à disseminação do gene *bla*<sub>KPC</sub>. Em amostras de *K. pneumoniae* oriundas da China, o gene *bla*<sub>KPC</sub> foi encontrado em uma plataforma genética híbrida, ou seja, contendo partes do transposon Tn4401 e partes dos transposons Tn3 e Tn1721 (58). Em amostras de *P. aeruginosa* produtoras de KPC-5 isoladas em Porto Rico, este gene foi associado ao transposon Tn5563 (59).

As enzimas do tipo KPC têm sido apontadas atualmente como as mais significativas clinicamente entre as carbapenemase de classe A devido a sua grande disseminação (46).

Após a descrição inicial nos Estados Unidos, amostras produtoras de carbapenemases têm sido descritas em diferentes partes do mundo sendo consideradas endêmicas e epidêmicas em algumas partes do globo. Uma revisão publicada em 2013 pela importante revista *Lancet Infectious Diseases* contemplou as informações relacionadas à descrição dessa carbapenemase em diversos países das Américas (Estados Unidos, Canadá Colômbia, Argentina, Brasil), Europa (Espanha, Portugal, Reino Unido, Irlanda, França, Polônia, Grécia, Itália e Israel), Ásia (Índia e China) e Oceania (Austrália e Nova Zelândia) (60). Um mapa com as características epidemiológicas das amostras produtoras de KPC por país de origem foi disponibilizado nesse artigo e está mostrado a seguir (Figura 1.3).



**Figura 1.3:** Características epidemiológicas das amostras produtoras de KPC por país de origem. Imagem traduzida e adaptada de Munoz-Price e colaboradores, 2013 (60), com autorização para reprodução da imagem fornecida pela Editora Elsevier (ANEXO B).

Além da capacidade de disseminação do gene *bla<sub>KPC</sub>* associado aos elementos genéticos móveis, tem sido observada a disseminação de clones internacionais de *K. pneumoniae* produtores de KPC (42). Esse gene já foi descrito em mais de 100 *sequence types* (ST) diferentes identificados através da técnica de MLST. Entretanto, a pandemia associada à disseminação desse gene em *K. pneumoniae* tem sido relacionada à dispersão de amostras pertencentes ao Complexo Clonal 11 (CC11) ou também chamado de Complexo Clonal 258 (CC258), sendo o ST258 o mais disseminado enquanto outros *sequence types* (ST11, ST340, ST437 e ST512) também têm sido descritos, mas em menor proporção (42).

Kitchel e colaboradores descreveram pela primeira vez a disseminação de *K. pneumoniae* produtoras de KPC-2 pertencentes ao ST258 nos Estados Unidos (55). Neste trabalho, publicado em 2009, foram estudadas amostras de *K. pneumoniae* produtoras de KPC provenientes de 16 estados americanos que haviam sido enviadas entre 1996 e 2008 para o CDC. Dessas, 70% foram caracterizadas como pertencentes ao ST 258. Este *sequence type* já foi descrito em diferentes países do mundo, tais como: Grécia (61), Israel (56), Noruega e Suécia (62), Polônia (63), Finlândia (64), Coreia do Sul (65), Itália (66), Brasil (67) e Argentina (68).

O ST258 tem sido exaustivamente estudado devido à sua grande importância epidemiológica. A análise do sequenciamento genômico de 83 amostras pertencentes ao Complexo Clonal 258 (Ou Complexo Clonal 11), sendo 77 amostras pertencentes ao ST258 isoladas dos Estados Unidos, mostrou que as amostras desse ST podem ser discriminadas em duas linhagens bem definidas denominadas Clado I e Clado II, sendo o Clado I o mais associado com amostras produtoras de KPC-2, e o clado II com KPC-3. A principal divergência genética entre estes dois cladros é uma região de 215 kb, que possui, dentre outros, genes associados à biossíntese da cápsula de polissacarídeo (*cps*), um importante fator de virulência para *K. pneumoniae* (69).

Através de uma comparação filogenética por análise de SNPs (polimorfismos em nucleotídeos únicos) presentes no core genoma dos dois cladros do ST258, com amostras de outros ST (ST11, ST442, e ST42), Bowers e colaboradores (42), observaram uma área de 1,1 Mb em amostras do ST258 do Clado II, que é idêntica ao do ST442, enquanto que a parte restante do genoma ST258 deste Clado era similar ao ST11. Este achado indicou que o Clado II de ST258 é provavelmente um híbrido criado através de um grande evento de recombinação entre ST11 e ST442. Em seguida, os pesquisadores identificaram as mesmas regiões codificadoras de capsula (*cps*) no ST42 e nas amostras do ST258 do Clado I. Os

pesquisadores concluíram então que a semelhança das áreas em torno das regiões codificadoras de cápsula (*cps*) dos *sequence types* ST42, ST258 Clado I e ST258 Clado II indicou que provavelmente o Clado I do ST258 evoluiu a partir do Clado II devido à substituição da região codificadora de cápsula originária do ST42 (42).

No Brasil, essa carbapenemase foi descrita primeiramente em 2009 onde se identificou quatro amostras de *K. pneumoniae* isoladas em 2006 de pacientes internados na UTI de um hospital do Recife oriundas de urina e sangue. Todas as cepas apresentaram resistência às cefalosporinas de amplo espectro e aos carbapenemas, além de carrear a variante alélica KPC-2 e a ESBL CTX-M-2 (70). No mesmo ano, também foi publicado o relato da presença de KPC-2 no Rio de Janeiro em seis amostras (quatro de sangue, uma de urina e uma de aspirado traqueal) de *K. pneumoniae* provenientes de dois hospitais da região metropolitana isoladas entre 2007 e 2008 (71).

Entretanto, após as duas primeiras descrições, Pavez e colaboradores (2009) afirmaram ter detectado a produção de KPC-2 em duas *K. pneumoniae* (isoladas em 2005 e 2007), durante a realização de um estudo epidemiológico acerca da resistência aos carbapenemas. Essas duas amostras oriundas de hemoculturas apresentaram resistência a todos os carbapenemas e não havia relação clonal (72).

Em 2011, Andrade e colaboradores publicaram estudo com 57 amostras de *K. pneumoniae* produtoras de KPC isoladas do Rio Grande do Sul, São Paulo e Rio de Janeiro. Neste estudo, foram observados cinco genótipos definidos por PFGE e seis genótipos definidos por MLST: ST258, ST11, ST327, ST44, ST437, ST48. O gene *bla*<sub>KPC-2</sub> estava associado as variantes “a” e “b” do transposon Tn4401. Além disso, essa plataforma genética foi encontrada em plasmídios de diferentes tamanhos (20-130kb). Neste estudo, utilizaram um sistema de classificação de plasmídios que permite classificá-los em diferentes grupos de incompatibilidade plasmidial, de acordo com as diferentes origens de replicação dos plasmídios, sendo encontrados plasmídios pertencentes aos grupos IncN, IncL/M e IncFII (67).

Durante o mestrado da aluna Polyana Silva Pereira realizamos estudo com 165 amostras de *K. pneumoniae* produtoras de KPC-2 isoladas de 12 diferentes estados do Brasil entre 2006 e 2010, contemplando as cinco regiões geográficas: Alagoas, Amazonas, Ceará, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro e Santa Catarina. Neste trabalho, observamos a disseminação de clones pertencentes ao

Complexo Clonal 11, que possui importância epidemiológica mundialmente, em vários estados brasileiros. Os clones pertencentes a este Complexo Clonal ST437, ST11 e ST340 foram encontrados em diferentes estados enquanto os ST757 e ST855 em amostras únicas. Observamos também a disseminação do gene *bla*<sub>KPC-2</sub> associado ao Tn4401 isoforma b e a plasmídios de 40 kb do grupo de incompatibilidade plasmidial IncN em amostras de diferentes clones, mostrando a grande capacidade de disseminação deste mecanismo de resistência através de diferentes plataformas. Este trabalho deu origem a dois artigos científicos e foi base para esta Tese de Doutorado (73, 74).

Além da disseminação em *K. pneumoniae*, este gene tem sido encontrado em outros membros da família *Enterobacteriaceae* em nosso país. Tavares e colaboradores, em estudo publicado em 2015 com amostras clínicas provenientes de 11 estados brasileiros (Alagoas, Amazonas, Ceará, Rio de Janeiro, Maranhão, Piauí, Pernambuco, Espírito Santo, Santa Catarina, Minas Gerais e Goiás) e Distrito Federal observaram a presença de KPC em nove espécies: *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae*, *E. coli*, *Pantoea agglomerans*, *Providencia stuartii*, *Citrobacter freundii*, *K. oxytoca*, *Morganella morganii* e *S. marcescens* (75). Além da presença em enterobactérias, este gene já foi observado no Brasil em amostras de *P. aeruginosa* (76) e *Pseudomonas putida* (77).

#### 1.3.1.1.2 New Delhi Metallo-beta-lactamase (NDM)

A enzima NDM-1 (New Delhi Metallo-beta-lactamase-1) foi detectada pela primeira vez em 2008 em *K. pneumoniae* e *E. coli*. Um paciente (59 anos) de origem Indiana vivia na Suécia há muitos anos, mas esteve na Índia e foi internado em Punjabi para tratamento de um abscesso na região glútea. Quando retornou para a Suécia, as duas bactérias foram detectadas sendo *K. pneumoniae* proveniente da urina do paciente e *E. coli* da coprocultura. Testes fenotípicos em ambas as amostras indicaram a resistência aos carbapenemas através da produção de uma metallo-beta-lactamase, entretanto, testes moleculares não detectaram enzimas conhecidas. Assim, estudos de clonagem e sequenciamento se fizeram necessários, onde foi possível identificar uma nova carbapenemase que compartilhava pouca identidade com as carbapenemases dessa classe descritas até então (mais similar foi a VIM1-2, com 32% de identidade). A ocorrência desse gene em dois gêneros bacterianos distintos sugeriu a presença em elementos genéticos móveis, sendo o gene *bla*<sub>NDM-1</sub> observado então nessas amostras em plasmídios transferíveis de 180 e 140 kb (78).

A partir de sua descrição inicial, outros relatos de aquisição dessa carbapenemase em pacientes que visitavam determinadas áreas de risco no Subcontinente Indiano (Índia, Paquistão, Sri Lanka e Bangladesh) e retornavam para os seus países de origem foram descritos em casos principalmente no Reino Unido, Canadá e França (78). Assim, o maior reservatório dessa carbapenemase tem sido o Subcontinente Indiano onde ela tem sido descrita não somente em pacientes, mas também no solo e no ambiente (78). Outros locais de importância para a aquisição de NDM são os estados Balcânicos, a Península Arábica e o Norte da África (46).

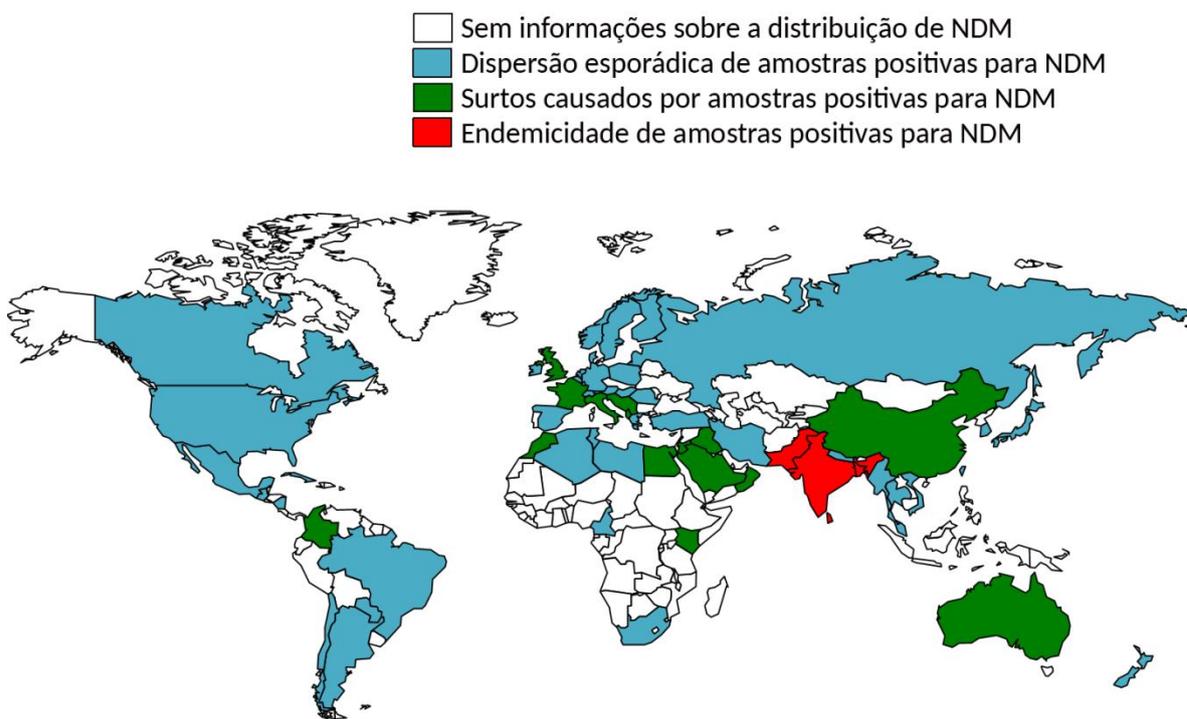
Até o momento, 16 variantes alélicas do gene *bla*<sub>NDM</sub> foram identificadas (segundo o site <http://www.lahey.org/studies/other.asp#table1>, acesso em 27 de dezembro de 2015). Quando comparadas com a NDM-1, as variantes NDM-4, NDM-5 e NDM-7 apresentam melhor atividade contra os carbapenemas. No sítio ativo, assim como em outras MBL, existem dois íons metálicos ligados à histidina e cisteína (46).

De forma semelhante às outras MBL, a NDM hidrolisa uma ampla gama de beta-lactâmicos incluindo penicilinas, cefalosporinas e carbapenemas, com exceção dos monobactâmicos (78). No entanto, quase todas as amostras produtoras de NDM apresentam fenótipo de multirresistência sendo resistentes a todos os beta-lactâmicos, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e sulfonamidas. Este padrão de resistência é explicado através da associação do gene *bla*<sub>NDM-1</sub> com outros determinantes de resistência a antimicrobianos tais como: ESBL, AmpC, outras carbapenemases (OXA-48, VIM, KPC), genes de resistência a aminoglicosídeos, macrolídeos, rifampicina, quinolonas, cloranfenicol e sulfametoxazole (79).

Entre as amostras da família *Enterobacteriaceae*, *K. pneumoniae* e *E. coli* são as mais frequentemente relatadas como produtoras de NDM-1. No entanto, este gene também tem sido descrito em outros representantes dessa família: *Klebsiella oxytoca* (80), *Enterobacter cloacae* (81), *Enterobacter aerogenes* (82), *Citrobacter freundii* (83), *Proteus mirabilis* (84), *Serratia marcescens* (85), e *Providencia* spp. (86), bem como em Bastonetes Gram-negativos não fermentadores, como *Acinetobacter* spp. (83) e *P. aeruginosa* (87).

Existem relatos na literatura de amostras de *K. pneumoniae* produtoras de NDM-1 responsáveis por surtos em unidades hospitalares na Itália, Reino Unido, Turquia, Quênia, China, Colômbia, Guatemala, Canadá, Estados Unidos (79). Assim, essa carbapenemase já é

considerada mundialmente disseminada. Abaixo, temos um mapa mostrando a disseminação desta carbapenemase pelos países (46).



**Figura 1.4:** Distribuição geográfica mundial de NDM. Imagem traduzida e adaptada de Nordmann e colaboradores, 2014 (46), com autorização para reprodução da imagem fornecida pela Editora Elsevier (ANEXO B).

O gene  $bla_{NDM-1}$  tem sido descrito em diferentes espécies localizado principalmente em plasmídios conjugativos pertencentes a vários grupos de incompatibilidade (IncA/C, IncF, IncL/M, ou não tipável), mas também tem sido associado ao cromossomo, embora de forma mais esporádica. Este gene, diferentemente do que tem sido observado para o gene  $bla_{KPC-2}$ , não encontra-se relacionado a propagação de clones ou complexos clonais específicos, plasmídios específicos ou estruturas genéticas únicas (88).

Trabalhos que investigaram o ambiente genético desta carbapenemase mostraram a presença de uma estrutura genética conservada associada ao gene  $bla_{NDM}$ , a sequência de inserção  $ISAbal25$  completa ou truncada na extremidade 5' do gene e o gene  $ble_{MBL}$  na extremidade 3', que codifica a resistência ao fármaco anticancerígeno bleomicina (48).

No Brasil, a primeira descrição do  $bla_{NDM-1}$  ocorreu em 2013, em uma *P. rettgeri* isolada no estado do Rio Grande do Sul (89). Este relato foi seguido por um estudo

retrospectivo que observou a presença de amostras de *Enterobacter hormaechei* produtoras de NDM-1 desde 2012 no Rio Grande do Sul (43).

Relatos da presença dessa carbapenemase em outras espécies também tem sido observados em nosso país: descrição de *Acinetobacter pittii* e enterobactérias no Rio Grande do Sul (90, 91); *Acinetobacter baumannii* no Paraná (92); *Acinetobacter bereziniae* em Santa Catarina (93) e *P. rettgeri* em São Paulo (94). Em nosso país, já foi descrita também a associação de NDM-1 e KPC-2 em um mesmo *E. hormaechei* no Rio de Janeiro (95). O rascunho do genoma de três cepas de diferentes espécies (*E. hormaechei*, *P. rettgeri* e *K. pneumoniae*) carreadoras desse gene isoladas em nosso país também já foi publicado (96).

### 1.3.1.1.3 OXA-48-like

As oxacilinasas (OXA), ou beta-lactamases de classe D, são enzimas que apresentam o grupamento serina no seu sítio ativo. Dentre as classes de beta-lactamases esta é a que se apresenta com maior variabilidade em relação às sequencias nucleotídicas, aminoacídicas e espectro de atividade contra os beta-lactâmicos, variando desde um espectro de ação somente contra penicilinas à atividade contra carbapenemas. Atualmente, existem 498 variantes alélicas desta classe de beta-lactamases (segundo o site <http://www.lahey.org/studies/other.asp#table1>, acesso em 27 de dezembro de 2015).

Os genes codificadores das beta-lactamases de classe D são geralmente associados a elementos genéticos móveis como sequencias de inserção e transposons. Numerosos genes de oxacilinasas têm sido identificados como uma fonte de resistência adquirida em Gram-negativos, mas estudos também têm demonstrado recentemente que estas beta-lactamases podem ser produzidas naturalmente por agentes clinicamente significativos mas também por espécies ambientais (97).

A maioria destas enzimas com atividade de carbapenemases é encontrada em *Acinetobacter* spp. (98). Em enterobactérias, as carbapenemases mais observadas desta classe são a OXA-48 e suas variantes. Até o presente momento, foram identificadas doze variantes de OXA-48-like, que se diferenciam por apresentarem substituições ou deleções de aminoácidos (OXA-48, -48b, -162, -163, -181, -199, -204, -232 -244, -245, -247, e -370), sendo a OXA-48 a mais disseminada (99).

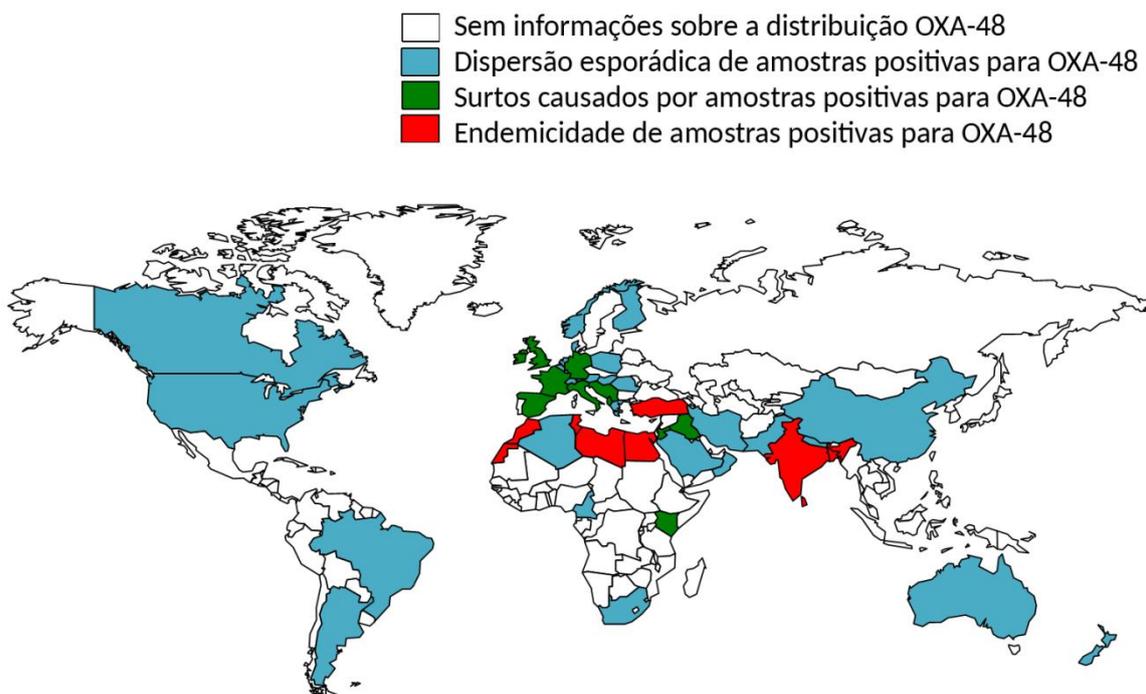
Enzimas da família OXA-48-like possuem atividade hidrolítica relativamente baixa contra os carbapenemas, apresentando maior poder de hidrólise contra o imipenem

comparando-se com o meropenem. Não são inibidas pelo ácido clavulânico, tazobactam, e sulbactam porém a sua atividade pode ser inibida *in vitro* por cloreto de sódio (NaCl) (97).

Visto que ainda não foi descrito nenhum inibidor eficiente para utilização em testes fenotípicos de enzimas do tipo OXA-48-like e que muitas amostras produtoras dessas enzimas não exibem resistência a cefalosporinas de amplo espectro ou apresentam decréscimo na susceptibilidade de carbapenemas, a sua detecção e reconhecimento podem ser um desafio. Portanto, métodos eficientes de detecção e uma triagem adequada se fazem necessários para prevenir e controlar a sua disseminação (99).

O primeiro relato de OXA-48 foi em 2001, em *K. pneumoniae* proveniente de Istambul, Turquia, apresentando resistência a múltiplos antimicrobianos e exibindo um alto nível de resistência a todos os beta-lactâmicos incluindo cefalosporinas de amplo espectro, cefamicinas, monobactâmicos e carbapenemas. Nesta amostra, o gene *bla*<sub>OXA-48</sub> foi identificado em plasmídios, associado a duas cópias da sequência de inserção *IS1999*, estrutura denominada *Tn1999* (100).

Após a primeira descrição, o gene *bla*<sub>OXA-48</sub> foi identificado em *E. coli* e *C. freundii* na Turquia e durante vários anos esse gene foi relatado em amostras apresentando ligação epidemiológica com esse país (101-103). Desde 2008, este gene tem sido identificado em muitos outros países, predominantemente em *K. pneumoniae*, mas também em outras espécies da família *Enterobacteriaceae* (104). Países do Oriente Médio e do Norte de África têm sido considerados reservatórios de amostras produtoras de OXA-48 (104). Abaixo, temos uma figura proveniente do artigo de Nordmann e colaboradores publicado em 2014 (46) evidenciando a dispersão dessa carbapenemase pelo mundo (Figura 1.5).



**Figura 1.5:** Distribuição geográfica mundial de OXA-48. Imagem traduzida e adaptada de Nordmann e colaboradores, 2014 (46), com autorização para reprodução da imagem fornecida pela Editora Elsevier (ANEXO B).

As variantes OXA-48b e OXA-199 foram descritas inicialmente em *Shewanella xiamenensis*. O gene *bla*<sub>OXA-48b</sub> possui quatro mutações silenciosas comparando-se com a OXA-48 enquanto a OXA-199 possui cinco diferenças nucleotídicas e três diferenças a nível de aminoácidos. Ambos os genes foram encontrados em regiões cromossômicas (105).

A variante OXA-162 é caracterizada por apresentar uma única substituição de aminoácido em relação à OXA-48 e atividade hidrolítica idêntica contra beta-lactâmicos em geral e carbapenemas (99). Ela foi identificada em amostras de *K. pneumoniae* na Turquia, mas atualmente já foi identificada em outras enterobactérias na Alemanha (106).

A OXA-181 foi identificada em múltiplos clones não relacionados de *K. pneumoniae* na Holanda (107), na Índia (108) e Nova Zelândia (109). Também já foi descrita em uma amostra de *E. coli* na Índia e em amostras de *C. freundii* e *P. rettgeri* na França (108). Esta enzima difere da OXA-48 por quatro substituições de aminoácidos, entretanto, apresenta as mesmas propriedades hidrolíticas (48).

A variante OXA-204 foi recentemente identificada em amostras de *K. pneumoniae* provenientes de pacientes da Tunísia e Argélia. Ela exibe duas substituições de aminoácidos

quando comparada a OXA-48 e apresenta um perfil de atividade muito semelhante à OXA-48 (110).

A variante OXA-232 foi identificada na França em amostras de *K. pneumoniae* em pacientes que haviam sido transferidos da Índia. Apresenta cinco substituições de aminoácidos em comparação à OXA-48, mas é apenas uma mutante pontual da OXA-181, exibindo um espectro de hidrólise muito semelhante a esta enzima (111).

As variantes OXA-244 e OXA-245, descritas inicialmente na Espanha em *K. pneumoniae*, possuem substituições em um único aminoácido cada. A amostra produtora de OXA-244 foi isolada de fluido ascítico de um paciente de 51 anos. Já a amostra produtora OXA-245 é originária de um pequeno surto hospitalar que causou cinco infecções em um hospital de Málaga (112).

Dois variantes da família OXA-48 têm perfis de hidrólise muito fraco em relação aos carbapenemas: OXA-163 e OXA-247. A variante OXA-163 foi identificada inicialmente em amostras de *K. pneumoniae* e *E. cloacae* (113), e a OXA-247 foi encontrada em amostra de *K. pneumoniae* (114) ambas descritas na Argentina. A enzima OXA-163, diferentemente das outras representantes da família, possui atividade eficiente contra cefalosporinas de amplo espectro e possui, portanto, perfil ESBL (113).

Recentemente, no Brasil, foi descrito uma nova variante alélica da OXA-48-like designada OXA-370. O gene *bla*<sub>OXA-370</sub> foi encontrado em uma amostra de *E. hormaechei* proveniente do Rio Grande do Sul e difere do *bla*<sub>OXA-48</sub> por apresentar substituições em três nucleotídeos e um aminoácido (troca de uma serina por um ácido glutâmico na posição 212 da proteína), entretanto seu perfil hidrolítico frente aos diferentes beta-lactâmicos não está plenamente estabelecido. A região flanqueadora deste gene foi investigada e foram observadas duas transposases ao redor: uma transposase *tnpA* truncada por uma sequência de inserção IS5075-like *upstream* e foi observada *downstream* ao gene outra transposase *tnpA* truncada por uma IS15-like (115).

Nosso grupo também investigou a presença de amostras produtoras de OXA-370 em nosso país. Em um estudo publicado em 2015, incluindo parte das amostras incluídas no presente trabalho, observamos a produção dessa variante em amostras da família *Enterobacteriaceae* (22 *K. pneumoniae*, um *E. cloacae* e um *E. aerogenes*) no Rio de Janeiro (116).

As infecções por *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases são geralmente de difícil tratamento devido à existência de limitadas escolhas terapêuticas para combater amostras resistentes. Dentre os grupos de antimicrobianos disponíveis, as opções terapêuticas para o tratamento das infecções incluem: aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, polimixinas, fosfomicina e tigeciclina. Entretanto, *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemase, além da resistência a beta-lactâmicos, já apresentam resistência a essas outras classes de antimicrobianos, sendo muitas vezes necessária a combinação desses fármacos para efetivamente ter sucesso terapêutico.

### **1.3.1.2 Resistência a aminoglicosídeos**

Os aminoglicosídeos tem como mecanismo de ação a ligação ao RNA ribossomal bacteriano, induzindo alterações conformacionais que resultam na tradução errônea das proteínas. A resistência a esses antimicrobianos em *K. pneumoniae* pode ocorrer através de diferentes mecanismos que podem coexistir simultaneamente, tais como: (i) modificação enzimática, através das enzimas modificadoras de aminoglicosídeos; (ii) alteração da permeabilidade da membrana externa e aumento da expressão de bombas de efluxo; e (iii) alteração do sítio alvo do antimicrobiano, através da metilação da subunidade 16S do RNA ribossomal (16S rRNA) (117).

A modificação enzimática é o mecanismo mais comum de resistência aos aminoglicosídeos encontrado nas bactérias (117). Estas enzimas catalisam a modificação dos radicais hidroxila ou amina do núcleo 2- deoxistreptamino ou nas moléculas de açúcar desses antimicrobianos, gerando um fármaco quimicamente modificado que se liga fracamente aos ribossomos. As três classes de enzimas são: acetiltransferases (promovem acetilação, usando Acetil Coenzima A como doador), nucleotidiltransferases (promovem a transferência de um AMP proveniente do ATP para a molécula do aminoglicosídeo) e fosfotransferases (catalisam a transferência de um grupo fosfato para a molécula de aminoglicosídeo). Estas enzimas modificadoras são ainda subdivididas em subclasses, baseado no local de modificação do aminoglicosídeo e o espectro de resistência dentro da classe. As acetilases, por exemplo, conseguem promover modificações nas funções da gentamicina e canamicina nas posições 3, 2' e 6' (AAC), as nucleotidiltransferases nas posições 4' e 2'' (ANT), e fosfotransferases nas posições 2' e 3''(APH), dessa forma, essa numeração é utilizada na nomenclatura dessas enzimas, como por exemplo: AAC(6') e ANT-2a (117).

As enzimas da família AAC(6') são as mais comuns, encontradas tanto em Gram-negativos como em Gram-positivos, geralmente associadas a elementos genéticos móveis tais como sequências de inserção, transposons e plasmídios, mas também em integrons. A enzima AAC(6')-IB é provavelmente a acetiltransferase clinicamente mais relevante, sendo responsável pela resistência à amicacina e a outros aminoglicosídeos em vários Gram-negativos pertencentes ao gênero *Acinetobacter* spp. e às famílias *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae* e *Vibrionaceae*, visto que tem sido descrita em aproximadamente 70% dos Gram-negativos de origem clínica (117).

Existe uma variante dessa enzima, através da modificação de dois aminoácidos (troca de um triptofano por uma arginina na posição 102 - Trp102Arg e troca de uma asparagina por um triptofano na posição 179 - Asp179Tyr) que causa resistência tanto a aminoglicosídeos quanto quinolonas: AAC(6')-Ib-cr. Esta variante tem sido detectada em um grande número de regiões geográficas associada a elementos genéticos tais como integrons, e outros genes de importância epidemiológica como os da família *qnr* (que causam resistência a quinolonas) ou genes codificadores de beta-lactamases (*bla<sub>CTX-M</sub>*; *bla<sub>SHV</sub>* e *bla<sub>KPC</sub>*) (117).

Em 2003, foi identificado em amostras clínicas de *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* outro mecanismo enzimático de resistência aos aminoglicosídeos, a metilação da subunidade 16S do RNA ribossomal (16S rRNA) através das RNA metilases (118). A metilação do RNA tem sido apontada como um mecanismo que fornece altos níveis de resistência aos aminoglicosídeos. Esses antimicrobianos são naturalmente produzidos por Actinomicetos que são intrinsecamente resistentes a essa classe devido à proteção ribossomal obtida através de metilação específica em sítios da subunidade 16s do RNA. Assim, esse mecanismo que parecia estar ligado somente a bactérias ambientais agora tem sido descrito em amostras clínicas. Vale ressaltar que as metilases encontradas inicialmente em Actinomicetos são estruturalmente diferentes das encontradas atualmente nas amostras clínicas (119).

Hoje, existem dez classes de 16s rRNA metilases descritas: ArmA, RmtA, RmtB, RmtC, RmtD, RmtE, RmtF, RmtG, RmtH e NpmA. Os genes *armA* (presente em enterobactérias e *Acinetobacter* spp.) e *rmtB* (*Enterobacteriaceae*) parecem ser os genes codificadores de metilases mais comuns sendo detectadas principalmente na Ásia e Europa (120, 121). Os genes *rmtA* e *rmtC* foram relatados inicialmente em *P. aeruginosa* e *P. mirabilis* do Japão, respectivamente (118, 122) enquanto o gene *rmtD* tem sido associado a um clone produtor de uma metalo beta-lactamase (SPM-1) em *P. aeruginosa* no Brasil (123), tendo sido também descrito em *K. pneumoniae* em nosso país (124). A RmtE foi descrita em

*E. coli* isolada de bovinos (125), a RmtF descrita em enterobactérias na Índia (126) e as metilases RmtG e RmtH foram descritas em *K. pneumoniae*, sendo a RmtG no Brasil (124) e a RmtH no Iraque (127). Já a metilase NpmA foi descrita a partir de uma *E. coli* isolada de um paciente no Japão (128).

Estas enzimas conferem níveis bastante elevados de resistência aos aminoglicosídeos utilizados na prática clínica, tais como amicacina, tobramicina e gentamicina sendo que sua associação com elementos genéticos móveis tem se tornado um grande desafio para sua contenção (119).

### **1.3.1.3 Resistência a quinolonas**

As quinolonas agem através de interação com a DNA girase das bactérias, interferindo na síntese de DNA. Os fenômenos de resistência à quinolonas tem sido um problema desde a introdução do primeiro antimicrobiano da classe, o ácido nalidíxico. Diferentes mecanismos de resistência são relacionados a esta classe de antimicrobianos em *K. pneumoniae*, tais como: (i) mutações no sítio de ação do antimicrobiano; (ii) alteração de permeabilidade e aumento da expressão de bombas de efluxo; (iii) resistência mediada por genes plasmidiais (PMQR) (129).

Um dos principais mecanismos de resistência às quinolonas é o acúmulo de mutações nas enzimas bacterianas que são alvo de ação dos antimicrobianos: DNA girase e DNA topoisomerase IV. Ambas as enzimas são proteínas complexas compostas por dois pares de subunidades. As subunidades da DNA girase são: GyrA, uma proteína de 97 kDa codificada pelo gene *gyrA*, e GyrB, uma proteína de 90 kDa codificado pelo gene *gyrB*. Os correspondentes das subunidades da topoisomerase IV são ParC (75 kDa) e ParE (70 kDa) (129).

Em bactérias Gram-negativas, o alvo principal das quinolonas é a subunidade GyrA da DNA girase. No gene *gyrA*, mutações pontuais são observadas principalmente em um domínio conservado na porção N-terminal, denominada região de resistência à quinolonas (*quinolone resistance determining region - QRDR*). Esta região fica localizada próxima ao sítio ativo da tirosina, onde se liga o DNA. Essas mutações pontuais geram mutações nos aminoácidos, sendo as mutações nos resíduos de serina na posição 83 e asparagina na posição 87 as mais relatadas. Mutações pontuais nos genes codificadores das subunidades da DNA topoisomerase IV também estão presentes em bactérias Gram-negativas, mas são descritas em frequência significativamente menor que as mutações na DNA girase (130). Bagel e

colaboradores demonstraram que altos níveis de resistência a fluoroquinolonas podem ser obtidos através de mutações nas subunidades da DNA girase e topoisomerase: amostras com duas mutações em GyrA (S83L e D87G) e uma mutação em ParC (S80I ou E84K) simultaneamente apresentaram concentração inibitória mínima maior que 4µg/ml frente à ciprofloxacina (131).

Os sistemas de efluxo presentes nas bactérias têm sido relacionados também com os mecanismos de resistência a quinolonas. O sistema de efluxo AcrAB-TolC tem sido apontado como um mediador da resistência a quinolonas em *K. pneumoniae* mas também em *E. coli* e *Salmonella* spp. (132). A bomba de efluxo AcrAB-TolC é regulada negativamente pelo gene *acrR* (repressor da bomba). Mutações no gene repressor *acrR* estão relacionadas ao aumento da atividade da bomba e conseqüentemente aumento do efluxo dos antimicrobianos (32). Da mesma forma, temos o gene *marA* que é ativador dessa bomba. Mutações no gene *marR*, que regula negativamente o gene *marA*, também aumentam a atividade da bomba, elevando a resistência aos antimicrobianos(133).

Além da ativação das bombas de efluxo, outro mecanismo de resistência é através da regulação da permeabilidade da membrana pela alteração dos níveis de porinas expressas, reduzindo a entrada das quinolonas nas células (134). Acredita-se que os sistemas de efluxo são capazes de gerar baixo nível de resistência a quinolonas e tornam-se clinicamente relevantes quando combinados com os outros mecanismos de resistência a esses antimicrobianos (como mutações nos genes alvo e alteração da permeabilidade da membrana) (129).

No final dos anos 1990, foi descrito pela primeira vez a resistência às quinolonas mediada por genes plasmidiais (PMQR) que incluem os genes *qnr*, *aac(6)-Ib-cr*, *qep*, *oqxA*, *oqxB* (135). Devido à facilidade de disseminação de determinantes genéticos associados a elementos genéticos móveis, epidemiologicamente a resistência plasmidial a quinolonas tem merecido destaque.

O gene *qnr* foi descrito por Martinez-Martinez e colaboradores em 1998. Este gene foi identificado inicialmente em uma *K. pneumoniae* em um plasmídio (pMG252) que gerava baixo nível de resistência a quinolonas (135). Este gene tem como função se ligar às drogas e dessa forma proteger a DNA girase e a topoisomerase IV da ligação às quinolonas. Até o momento, seis famílias de genes *qnr* foram identificadas (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, e *qnrVC*) (136). Estudos têm mostrado mundialmente a presença de genes *qnr* em vários

representantes da família *Enterobacteriaceae* (*E. coli*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp., *P. mirabilis*, *S. marcescens*, *C. freundii* e *P. stuartii*) e também em *A. baumannii* (137). Vale ressaltar que os genes *qnr* não conferem resistência plena às fluoroquinolonas mas facilitam a seleção de bactérias que contem essa proteção, aumentando os efeitos dos outros mecanismos de resistência (137).

Outro gene de importância disseminado através de plasmídios é o *aac(6')-Ib-cr*. Esta variante do gene *aac(6')-Ib* codifica uma acetiltransferase ativa contra aminoglicosídeos mas que também tem a capacidade de modificar e inativar a ciprofloxacina, como visto no tópico anterior (117).

O gene *qepA*, que codifica uma bomba de efluxo, também tem sido associado à resistência a quinolonas. Esse gene foi encontrado em plasmídios e apresenta similaridade com bombas de efluxo do tipo MF encontradas em microrganismos ambientais tais como Actinomicetos (138).

Os genes *oqxA* e *oqxB*, que codificam a bomba de efluxo OqxAB, que apresenta relevância para a resistência principalmente a quinolonas, foram inicialmente detectados num plasmídio pOLA52, em *E. coli* isolada a partir de dejetos de suínos (139). Esta bomba tem sido associada à resistência a olaquinox que é um antimicrobiano usado como promotor de crescimento em suínos, mas também causa resistência a fluoroquinolonas, beta-lactâmicos, tigeciclina e cloranfenicol. A presença desses genes em amostras clínicas de *K. pneumoniae* têm sido frequentemente relatada na literatura (140). Estudos demonstraram que o gene *rara* funciona como ativador dessa bomba e o gene *oqxR* como repressor sendo ambos encontrados flanqueando os genes *oqxA* e *oqxB* (141).

#### **1.3.1.4 Resistência a fosfomicinas**

Fosfomicinas, derivadas do ácido fosfônico, são conhecidas há pelo menos quatro décadas, e possuem amplo espectro de atividade contra Gram-negativos e Gram-positivos aeróbios (142). Elas agem inibindo a enzima MurA (UDP-N-acetilglicosamina enolpiruvil transferase), que catalisa o primeiro passo da síntese do peptidoglicano. Nesta etapa, ocorre a reação entre o UDP-N-acetilglicosamina (UNAG) e o fosfoenolpiruvato (PEP), formando os produtos enolpiruvil-UDP-N-acetilglicosamina (EP-UNAG) e fosfato inorgânico (143). A partir da emergência de amostras produtoras de carbapenemases multirresistentes, a fosfomicina tem sido cada dia mais utilizada (144).

A mutação dos genes alvo que codificam permeases responsáveis pelo transporte desse fármaco, como os transportadores glicerol-3-fosfato (codificado pelo gene *glpT*) e o transportador de glicose-6-fosfato (codificado pelo gene *uhpT*), bem como mutações no gene alvo do antimicrobiano (gene *murA*) podem estar associados à resistência. Mutações em qualquer um dos genes estruturais dessas vias produzem uma diminuição da entrada do antimicrobiano na célula bacteriana, conferindo diferentes níveis de resistência fosfomicina (144).

Além das mutações, a produção de enzimas com capacidade de modificar a molécula de fosfomicina também tem sido envolvida na resistência. Essas enzimas agem através da catálise de reação que provoca abertura do anel oxirano do fármaco, sendo *fosA*, *fosB*, *fosC* e *fosX* os genes codificadores dessas enzimas que diferem em termos de mecanismo químico, usando substratos diferentes para inativação do antimicrobiano (144).

O gene *fosA* foi identificado pela primeira vez a partir de amostras clínicas de enterobactérias no transposon Tn2921, observado associado a um plasmídio. *fosB* é uma tiol-S-transferase similar a *fosA*, inicialmente descrita em *Staphylococcus epidermidis*. Hidrolases *fosX* partilham 30% a 35% identidade de sequência com FosA e FosB e tem sido detectado em amostras de *Mesorhizobium loti*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* e *Brucella melitensis* na pesquisa de sequências do genoma. Em amostras clínicas, o principal mecanismo que tem sido relacionado à resistência a fosfomicina é a redução da permeabilidade da membrana celular. A contribuição dos genes codificados por plasmídios para a resistência global de fosfomicina em amostras clínicas tem sido menos reportado (144).

#### **1.3.1.5 Resistência a polimixinas**

As polimixinas, peptídeos policatiônicos, realizam seu efeito antimicrobiano rompendo a estrutura da membrana celular bacteriana através da interação específica de seu peptídeo catiônico com as pontes de cálcio e magnésio que estabilizam o LPS da membrana, perturbando a integridade e aumentando a permeabilidade, causando perda de material citoplasmático e levando a morte celular (145). Junto com a tigeciclina, as polimixinas têm sido apontadas como os últimos antimicrobianos eficazes para o tratamento de Gram-negativos multirresistentes produtores de carbapenemases. Desta forma, a emergência de resistência a essa classe é atualmente um grande problema de saúde pública.

A resistência às polimixinas pode ser intrínseca ou adquirida. Bactérias como *Proteus* spp., *Serratia* spp., *Morganella morganii*, *Edwardsiella tarda* e *Burkholderia* spp. são

intrinsecamente resistentes a estes antimicrobianos devido a diferenças na composição dos lipopolissacarídeo (LPS) que compõe a membrana plasmática. Em outros bastonetes Gram-negativos, como *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, e *A. baumannii*, a resistência a estes antimicrobianos é adquirida (146).

Em amostras de *K. pneumoniae*, a resistência as polimixinas e outros antimicrobianos catiônicos pode ocorrer através da modificação dos lipopolissacarídeos (LPS) seguida da adição de 4-amino-4-deocil-arabinose no lipídeo A, que diminui a carga negativa da membrana externa, reduzindo a afinidade das polimixinas com o LPS. Mutações nos sistemas PmrA/PmrB e PhoP/PhoQ também estão relacionados à resistência a polimixina. Ambos os sistemas, PmrAB e PhoPQ, acarretam modificações na expressão do operon *arnBCADTEF* que é responsável pela adição de 4-amino-arabinose no lipídeo A, sendo assim, mutações nesses sistemas podem resultar na alteração do fenótipo de resistência às polimixinas (146).

Outro mecanismo molecular que tem levado a resistência a polimixinas são mutações pontuais e inserções que causem inativação do gene *mgrB*. Este gene de 141 nucleotídeos gera uma proteína de 47 aminoácidos responsável pela regulação negativa do sistema PhoQ/PhoP. Mutações e a inserção de várias IS (como *IS5-like*, *IS903B*, *IS1F-like* e *ISKpn14*) têm sido observadas nos genes *mgrB* de *K. pneumoniae* resistentes a polimixina B de origem clínica (147-151).

Recentemente, foi descrito um novo mecanismo de resistência a esta classe transmitido por plasmídios: o gene *mcr-1*. Este gene foi descrito na China, durante um projeto de vigilância sobre a resistência antimicrobiana em *E. coli* isolada de animais de criação para alimentação, onde observou-se um aumento da resistência a colistina. Foi observado na cepa SHP45 um gene de resistência a polimixina que pode ser transferido por transformação. Dessa forma, descreveu-se o primeiro mecanismo de transferência horizontal através de plasmídios de um gene de resistência as polimixinas (152).

Desde a descrição inicial do gene *mcr-1*, vários artigos têm buscado a prevalência desse determinante de resistência em diferentes espécies. O artigo de revisão publicado por Skov e colaboradores em março de 2016, contemplou 28 artigos recentes relacionados a descrições desse gene. Neste trabalho, observou-se que o gene *mcr-1* já se espalhou por diferentes países, contemplando a maioria dos continentes (Japão, China, França, Dinamarca, Holanda, Camboja, Bélgica, Laos, Malásia, Itália, Vietnã, Tunísia, Argélia, Suíça, Portugal, Canada, Tailândia, Alemanha e Reino Unido). Este gene já foi encontrado em bactérias

isoladas a partir de diferentes animais de consumo, carnes e legumes; isoladas do ambiente; isoladas a partir de pacientes infectados e pacientes assintomáticos colonizados, incluindo viajantes internacionais. Este gene já foi encontrado em diferentes espécies bacterianas, tais como *K. pneumoniae*, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Paratyphi, *Salmonella* Derby, *Shigella sonnei*, sendo encontrado majoritariamente em amostras de *E. coli*, sendo descrito em diferentes plasmídios, que apresentaram alta taxa de transmissibilidade (153).

#### **1.3.1.6 Resistência a tigeciclina**

A tigeciclina é um inibidor de síntese proteica, da família das tetraciclina, capaz de evadir os principais determinantes de resistência ao seu análogo próximo, a tetraciclina, como Tet(A), Tet(E) (154). A resistência a tigeciclina já tem sido reportada em várias espécies de *Enterobacteriaceae* como *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter* spp. e *Salmonella enterica* e têm sido associadas ao aumento da expressão da bomba de efluxo AcrAB-TolC (155).

A expressão da bomba de efluxo AcrAB-TolC através do *operon acrAB* é regulada por seu repressor local, o gene *acrR*. Em nível global, a transcrição dessa bomba também é influenciada por vários ativadores da transcrição da família AraC/XylS, tais como *ramA*, *marA* e *soxS*. Seus repressores são *ramR*, *marR* and *soxR*. Assim mutações nos genes ativadores da transcrição da bomba, bem como nos seus repressores, podem resultar também na superexpressão da bomba de efluxo AcrAB-TolC e contribuir para o fenótipo de multirresistência e resistência a tigeciclina em amostras de *K. pneumoniae*.

Dados da literatura, obtidos em um estudo conduzido na China, que avaliou a presença de mutações em *ramR* e *acrR* em 26 amostras de *K. pneumoniae* apresentando resistência a tigeciclina, observou que as mutações em AcrR (38,5% das amostras) e em RamR (88,4% das amostras) estavam diretamente ligadas a resistência a essa classe de drogas. Além disso, a superexpressão de *rarA* funcionando como um ativador da transcrição da bomba de efluxo OqxAB também tem sido associada a resistência a tigeciclina (155-157).

#### **1.3.2 Fatores de virulência associados a *K. pneumoniae***

*K. pneumoniae* são geralmente consideradas habitantes usuais do trato gastrointestinal sendo frequentemente incapazes de causar doenças em pacientes com boa imunidade. Entretanto, algumas amostras tem a capacidade de causar uma variedade de doenças tais como pneumonias, bacteremias e meningites em quadros graves. Estas infecções invasivas e graves podem ser potencializadas devido à capacidade patogênica da cepa e a

presença de diferentes mecanismos de resistência aos antimicrobianos que levam a um fenótipo de multirresistência mas também pode ser relacionada também ao estado imunológico do hospedeiro. Assim, fatores de virulência podem estar associados a uma melhor adaptabilidade da bactéria em relação ao hospedeiro, contribuindo para o estabelecimento de infecções e na capacidade de se manter no organismo, facilitando, desta forma, a capacidade de disseminação e sobrevivência dessas bactérias.

A busca pelos mecanismos patogênicos das infecções causadas por *Klebsiella* spp. tem identificado os fatores que contribuem para a patogênese dessas infecções. Para investigação da interação de células bacterianas e o hospedeiro tanto estudos *in vivo*, utilizando modelos animais experimentais, quanto *in vitro* têm sido realizados (21). Muitas dessas formas patogênicas das bactérias são conhecidas por terem surgido através da aquisição de fatores de virulência que podem ser codificados por elementos associados a ilhas de patogenicidade e plasmídios. Os fatores mais comuns associados às enterobactérias são: flagelos, LPS, fímbrias, adesina, sistemas de aquisição de ferro e sistemas de secreção de proteínas (19, 21). Quatro componentes principais em *K. pneumoniae* têm sido implicados na patogênese deste microrganismo: adesinas, polissacarídeos capsulares, lipopolissacarídeo (LPS) e sistemas de busca ativa de ferro (sideróforos) (158).

#### **1.3.2.1 Adesinas e fímbrias**

Adesão à mucosa e superfícies de células epiteliais são frequentemente os primeiros passos no desenvolvimento de colonização e também de infecções. Assim, adesinas e fímbrias possuem um papel importante no estabelecimento deste primeiro contato com o hospedeiro. As propriedades de adesão geralmente são mediadas por diferentes tipos de pilli ou fímbrias. As fímbrias são projeções de filamentos na superfície bacteriana de caráter não flagelar. Estas estruturas possuem até 10  $\mu\text{m}$  e têm o diâmetro de 1 a 11 nm sendo constituídas de subunidades de proteínas globulares poliméricas com massa molecular de 15 a 26 kDa (22).

Tem sido descrita na maioria das amostras clínicas de *K. pneumoniae* a presença de fímbrias do tipo 1 (D-manose-sensível, conhecidas também como MS-HA) e fímbrias do tipo 3 (manose-resistente, conhecidas também como MR/K-HA). As fímbrias do tipo 1 já foram relacionadas à adesão a células uroepiteliais da bexiga e células da traquéia. Em estudos experimentais já foi observada a associação à pielonefrite, sendo a subunidade FimH da fímbria tipo 1 mais relacionada à infecções do trato urinário (19).

Em *K. pneumoniae*, as fímbrias do tipo 3 são codificadas pelo *operon mrkABCDF* e já foram associadas à adesão a células endoteliais humanas, epitélios das vias respiratórias, células uroepiteliais, colágeno do tipo IV, assim como a raízes de plantas. Podem ser responsáveis também pela colonização de superfícies abióticas e formação de biofilmes (159).

Adesinas não fimbriais também tem sido descritas em *K. pneumoniae*, como a CF29K que foi associada à adesão de células Intetinais 407 e células CaCo-2. Esta adesina é considerada idêntica a adesina C231-A presente em amostras associadas à diarreia de *E. coli* e pertence à família K88 de adesinas. Seu gene foi descrito em plasmídeo conjugativo que também carregava genes de resistência à cefalosporinas em amostras clínicas de *K. pneumoniae* (160).

### 1.3.2.2 Polissacarídeos capsulares e fenótipo mucoso

*K. pneumoniae* produzem usualmente uma cápsula polissacarídica espessa, hidrofílica, que é responsável por seu aspecto mucoide e brilhante quando semeadas em placas com ágar. Esta cápsula tem sido associada à proteção contra a atividade bactericida do sistema complemento e ao escape da fagocitose. Este determinante de virulência tem sido descrito como um dos mais importantes quando se trata de amostras de *K. pneumoniae* (22).

A cápsula de *K. pneumoniae* é formada por polissacarídeos ácidos e composto por repetições de unidades básicas de quatro ou seis açúcares. Um total de 79 exopolissacarídeos distintos são reconhecidos hoje e estão incluídos no sistema internacional de sorotipagem. O *cluster cps*, responsável pela codificação da cápsula, é formado por uma estrutura em mosaico com um grupo de seis genes conservados em sua extremidade 5': *galF*, *cpsACP*, *wzi*, *wza*, *wzb* e *wzc* que codificam proteínas envolvidas na translocação e processamento da cápsula na superfície bacteriana e são altamente conservados entre os diferentes tipos de cápsulas. Já na extremidade 3' na região do *cluster cps*, os genes que codificam para a glucose-6-fosfato desidrogenase (*gnd*) e UDP-glicose desidrogenase (*ugd*) são os encontrados. A região central, considerada variável, compreende genes que codificam proteínas responsáveis pela polimerização e montagem de subunidades específicas da cápsula e são cruciais para variação do sorotipo capsular (161).

Os sorotipos capsulares K1, K2, K4 e K5 são considerados os mais virulentos em infecções experimentais em camundongos e são também associadas a infecções graves em humanos. Estudos avaliando a distribuição dos sorotipos capsulares entre amostras clínicas de

*K. pneumoniae* tem demonstrado a prevalência de diferentes sorotipos em localidades geográficas distintas (158).

Algumas amostras de *K. pneumoniae* apresentam hipermucoviscosidade devido a produção de grandes quantidades de polissacarídeos capsulares. Estas amostras são resistentes à eliminação através de proteínas do soro e fagocitose. A presença do gene *magA* tem sido associada a hipermucoviscosidade e tem sido descrita em amostras causando abscessos de fígado (162, 163). A proteína codificada pelo gene *magA* foi renomeada recentemente para  $wzy_{KpK1}$  pois tem sido exclusivamente encontrada em amostras de *K. pneumoniae* do sorotipo K1 consideradas hipervirulentas e pertencentes ao Complexo Clonal C23 (164). O gene *rmpA*, codificado por plasmídios, também tem sido associado ao aumento da produção de polissacarídeos capsulares, visto que regula positivamente a síntese dessas moléculas (165).

### 1.3.2.3 Metabolismo da alantoína

Outro mecanismo que tem sido descrito em *K. pneumoniae* é a capacidade de metabolização da alantoína. Alantoína é um composto químico resultante da degradação do ácido úrico que possui a fórmula molecular  $C_4H_6N_4O_3$ , e é uma das formas de excreção de nitrogênio por alguns mamíferos. O nitrogênio, por ser um dos componentes principais de quase todas as macromoléculas que compõem os microrganismos é, portanto, uma molécula essencial. Assim, quando as fontes primárias de nitrogênio não estão disponíveis para os microrganismos ou quando estão em baixas concentrações, diferentes fontes de nitrogênio como purinas, proteínas ou alantoína precisam ser utilizadas. Dessa forma, a capacidade de utilização de alantoína em *K. pneumoniae* pode auxiliar na competição por fontes de nitrogênio e se tornar um importante fator associado à virulência dessa espécie (166).

Em amostras do sorotipo K1, foi observado uma região de aproximadamente 22 kb contendo 19 regiões de codificação de proteínas, sendo 14 associadas ao metabolismo da alantoína. Amostras que continham o gene *allS* conseguiam utilizar esse composto como única fonte de nitrogênio, carbono e energia em condições aeróbicas e anaeróbicas (166).

### 1.3.2.4 Sideróforos

Outro aliado na infecção bacteriana é a produção de sideróforos que realizam o resgate de ferro, essencial para o crescimento bacteriano. Entre as enterobactérias, três sistemas de sideróforos são mais observados: aerobactina, enterobactina e yersiniabactina (167).

Enterobactina, que foi um dos primeiros a serem observados, é um sideróforo catecol

produzido por mais de 90% das enterobactérias. Aerobactina é um sideróforo hidroxamato produzido por uma fração menor de amostras de enterobactérias e tem uma menor afinidade para  $\text{Fe}^{3+}$  livre. Já a yersiniabactina é um sideróforo fenolato encontrado inicialmente em *Yersinia* spp., mas que já tem sido descrito em algumas amostras de outras espécies de enterobactérias. Acredita-se que o gene que codifica este sideróforo possa ser adquirido através da transferência horizontal de genes (167). Lawlor e colaboradores observaram em seu estudo publicado em 2007 que quase todas as amostras clínicas produziam aerobactina, enquanto um número bem menor esteve relacionado com a produção de aerobactina ou yersiniabactina. Neste estudo, foi observado também que as amostras que produzem mais de um sideróforo são consideradas mais virulentas (167).

### **1.3.3 Metodologias de tipagem de *K. pneumoniae***

Do ponto de vista epidemiológico, é frequentemente necessária a determinação da relação clonal entre as cepas encontradas em diferentes partes do mundo, muitas vezes envolvidas em surtos. Se tratando de cepas de *K. pneumoniae* multirresistentes produtoras de carbapenemases, a identificação de possíveis surtos deve ser realizada prontamente para ser uma ferramenta de auxílio nas medidas de controle de infecção.

As metodologias de tipagem são particularmente importantes ao se tratar de bactérias multirresistentes no ambiente hospitalar visto que nestes locais o uso de equipamentos médicos como cateteres, aparelhos de ventilação mecânica dentre outros geralmente se tornam fontes de transmissão de bactérias, favorecendo a disseminação de infecções de bactérias carreadoras de múltipla resistência. Assim, estudos de tipagem bacteriana são extremamente necessários para investigação da fonte de possíveis surtos e para identificar cepas epidêmicas ou endêmicas (168). Atualmente, existem variadas metodologias para tipagem, tanto moleculares quanto não moleculares, que vem sendo utilizadas com esse propósito.

Nas décadas do século passado, várias metodologias foram propostas com o objetivo de obter a diferenciação de cepas de *K. pneumoniae*. Grande parte dessas metodologias disponíveis era baseada em técnicas imunológicas visto que poucas eram as ferramentas de manipulação de DNA. Dentre essas, as de maior importância eram sorotipagem, tipagem por bacteriófagos, tipagem de bacteriocinas e MLEE (*Multilocus enzyme electrophoresis*) (19).

Métodos fenotípicos possuem em geral baixo poder discriminatório quando comparados aos métodos genotípicos pois dividem as amostras em grandes grupos e

apresentam baixa reprodutibilidade. Isto ocorre porque estas técnicas diferenciam os microrganismos através de produtos da expressão de determinados genes, características tais que podem variar de acordo com a fase de crescimento ou mudanças nas condições de crescimento, bem como a partir da ocorrência de mutações espontâneas (168).

Já as metodologias de tipagem molecular realizam a discriminação entre as cepas com base nas diferenças obtidas na sequência ou na organização do DNA genômico. Estas têm sido cada vez mais utilizadas atualmente, sendo as mais importantes: PCR randômicos, ribotipagem, AFLP, PFGE e MLST.

Métodos baseados em amplificação de fragmentos de DNA, como rep-PCR (*repeat-based PCR*), RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*) ou ERIC-PCR (*Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence PCR*) apresentam a vantagem de ser aplicáveis sem o conhecimento prévio da sequência do genoma da bactéria. Para a realização destes métodos são necessários poucos passos. Estes métodos, apesar de úteis para investigações locais de fontes e rotas de dispersão clonal, apresentam baixa reprodutibilidade (19).

O método de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) tem sido apontado como a técnica de tipagem bacteriana mais utilizada ao longo das décadas. A técnica consiste no aprisionamento do DNA total das bactérias em blocos de agarose, seguido pela digestão com enzimas de restrição. A separação dos fragmentos é realizada em eletroforese de campo pulsado onde campos elétricos alternados são aplicados permitindo a separação de fragmentos de grande tamanho. Atualmente a enzima mais utilizada para tipagem de cepas de *K. pneumoniae* tem sido a *XbaI* entretanto outras enzimas já foram utilizadas (*HaeIII* e *SpeI*). Esta metodologia apresenta também alta reprodutibilidade e elevado poder discriminatório porém a comparação inter-laboratorial pode ser um pouco prejudicada visto que existem variados protocolos disponíveis para a realização dessa metodologia (19, 169, 170).

*Multilocus sequence typing* (MLST) é uma técnica de tipagem baseada na amplificação de sete genes conservados do genoma seguido de sequenciamento. Os sete genes usados para o esquema de MLST descrito por Diancourt e colaboradores em 2005 para *K. pneumoniae* são: *pgi* (codificador da enzima fosfoglicose isomerase), *tonB* (codificador do transdutor de energia periplasmático), *gapA* (codificador da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), *rpoB* (codificador da subunidade beta da RNA polimerase), *phoE* (codificador da fosforina E), *mdh* (codificador da enzima malato desidrogenase) e *infB* (codificador do fator de iniciação da tradução 2). Cada gene é sequenciado e a sequência

encontrada é comparada com as existentes no banco de dados. É dado um número de alelo único (*allele number*) para cada sequência diferente de cada gene. Por fim, a combinação de todos os números de alelos gera o ST (*sequence type*) que pode ser comparado com os ST já descritos no banco de dados de *K. pneumoniae* disponível no site <http://bigsddb.web.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html> (171, 172).

Esta metodologia tem apresentado cada dia mais destaque visto que se baseia em genes conservados onde as mutações são acumuladas de forma mais lenta ao contrário das outras metodologias que são baseadas nas diferenças em regiões não caracterizadas do genoma, onde muitas variações entre as cepas são observadas (PFGE, RAPD, REP-PCR). Outra vantagem é a facilidade de comparação inter-laboratorial já que como esta técnica gera sequências de DNA os resultados podem ser comparados em qualquer lugar do mundo, sem que hajam critérios interpretativos envolvidos. Assim, esta metodologia tem se apresentado mais adequada para investigações epidemiológicas contemplando longos períodos e de cepas não relacionadas geograficamente enquanto as outras técnicas são mais utilizadas para investigações de surtos locais (19).

#### **1.4 Sequenciamento genômico**

A grande maioria dos métodos de identificação de genes de resistência, identificação de genes de virulência e tipagem conhecidos atualmente tem a capacidade de avaliar uma pequena fração dos genes de um organismo. Com o intuito de superar essa problemática e, ao mesmo tempo avaliar um grande número de genes, as novas metodologias de sequenciamento genômico já têm sido utilizadas.

Apesar de ainda possuírem um custo relativamente elevado, as metodologias de sequenciamento em massa são apontadas como o futuro das investigações moleculares. Essas metodologias, são consideradas mais rápidas, acuradas e de fácil operação, permitindo o sequenciamento de vários milhões de bases nitrogenadas ao mesmo tempo e gerando uma infinidade de dados, o que facilita muito as análises (173).

O sequenciamento genômico tem sido utilizado para uma ampla gama de objetivos em variados microrganismos e organismos superiores. No campo da genética, o estudo do genoma humano possibilitou a identificação de inúmeras mutações que puderam ser associadas a doenças. No campo da agricultura, o conhecimento amplo do genoma de plantas tem contribuído para o melhoramento das espécies, tendo benefícios para o plantio e qualidade dos alimentos. No campo da microbiologia e da infecção hospitalar, estudos

envolvendo sequenciamento genômico permitiram a identificação dos patógenos pelos laboratórios clínicos com a ajuda de *softwares* especializados. Os dados gerados para identificação dos patógenos podem ser usados também para identificar os mecanismos de resistência, os genes de virulência e também identificar a proximidade filogenética, sendo possível o monitoramento de patógenos ao longo do tempo e em regiões geográficas distintas além de serem úteis para a investigação de surtos (174). Algumas plataformas estão disponíveis para efetuar sequenciamento genômico. Dentre elas, destacamos: 454 da Roche e MiSeq/HiSeq da Illumina.

Após a metodologia do sequenciamento, as sequências obtidas devem ser montadas, para tentar recriar as estruturas do genoma estudado através da utilização de *softwares* especializados. Duas metodologias de montagem são geralmente utilizadas: montagem *de novo*, que é baseada na sobreposição das diferentes sequências obtidas no sequenciamento com objetivo de obter sequências mais longas (*contigs*) e o ressequenciamento ou mapeamento por referência, onde as sequências obtidas no sequenciamento são montadas também por sobreposição, entretanto utilizando uma sequência genômica de referência como base (175, 176).

A montagem do genoma pode apresentar algumas dificuldades. Um exemplo é quando as sequências geradas são muito pequenas, o que pode tornar a montagem *de novo* do genoma um grande desafio. Além disso, regiões repetitivas do genoma com sequências de inserção, transposons e RNA ribossomais apresentam problemas na montagem. Falhas no genoma montado podem ser causados principalmente por repetições dispersas ou arranjadas em sequência, não permitindo que os *contigs* sejam montados efetivamente (175, 176).

Alguns trabalhos já demonstram com êxito a aplicabilidade do sequenciamento genômico para o estudo de genomas bacterianos em *K. pneumoniae*. Um estudo com diferentes amostras oriundas principalmente dos sorotipos K1 e K2 avaliou o potencial de virulência e multirresistência dessas amostras através de sequenciamento de larga escala. Isso permitiu a identificação de *clusters* desses genes, possibilitando a criação e implementação de um banco de dados de livre acesso (BIGSdb – KP, disponível em <http://pubmlst.org/software/database/bigsgdb/>) que permite a rápida extração de informações relevantes de genomas completos, facilitando o estudo de surtos (177).

Outros estudos tem se debruçado em investigar a origem do Complexo Clonal 11 ou Complexo Clonal 258, mais importante se tratando de *K. pneumoniae* produtora de KPC,

conforme descrevemos no tópico 1.3.1.1.1. Através do sequenciamento genômico, De Leo e colaboradores em 2014 observaram que o ST258 pode ser dividido em duas linhagens bem definidas (Clado I e Clado II), sendo o Clado I mais associado com amostras produtoras de KPC-2, e o Clado II com KPC-3 (69). Outros estudos também tem usado o sequenciamento genômico para identificar novos e importantes fatores de virulência. Em 2014, Lery e colaboradores, identificaram um novo determinante de virulência em *K. pneumoniae*, da família das fosfolipases D, a partir da comparação do genoma de uma amostra virulenta do sorotipo capsular K2 com cepas com menor capacidade de virulência (178).

### **1.5 Justificativa e relevância**

A resistência bacteriana é um problema de saúde pública crescente em todo o mundo e a disseminação dos genes de resistência aos antimicrobianos é uma preocupação recorrente. A produção de carbapenemases tem se tornado cada dia mais importante neste contexto, principalmente se tratando de bastonetes Gram-negativos.

Em nosso país, já foram descritas as carbapenemases de grande importância epidemiológica mundial em enterobactérias: KPC em 2006; NDM e OXA-370 em 2013. A produção destas carbapenemases confere resistência a todos os beta-lactâmicos disponíveis para a prática clínica e muitas vezes estão associadas à resistência a outras classes de antimicrobianos, como aminoglicosídeos e fluoroquinolonas. Assim, o rápido reconhecimento de amostras produtoras destas enzimas no ambiente hospitalar é importante para a seleção do agente antimicrobiano adequado para o tratamento da infecção e minimização dos danos decorrentes da infecção para o paciente e possibilita um menor tempo de internação e a diminuição dos custos de tratamento.

Devido à importância dos bastonetes Gram-negativos da família *Enterobacteriaceae* multirresistentes em nosso país, principalmente *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases envolvidas em infecções, estudos que verifiquem e estabeleçam o perfil de resistência dessas amostras tornam-se cada dia mais importantes. Também se fazem necessários estudos que investiguem a presença de fatores de virulência e patogenicidade associados a essas amostras, principalmente como ferramentas para controle epidemiológico.

Estudos que estabeleçam o grau de similaridade entre as amostras também são muito importantes. Para este fim, as metodologias de tipagem molecular, como eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) e *Multilocus sequence typing* (MLST), que são considerados métodos de referência devido ao alto poder discriminatório devem ser utilizadas. Além da

detecção da disseminação do clone resistente dentro de um determinado centro de saúde, a utilização dessas metodologias de tipagem molecular, também permitem a identificação da disseminação de clones epidêmicos em diferentes partes do Brasil e do mundo.

Trabalhos que busquem elucidar o ambiente genético em que os genes codificadores de carbapenemases estão inseridos e a identificação da associação com transposons e o plasmídeo carreador do gene podem auxiliar na compreensão da disseminação deste tipo de resistência no nosso país, tornando-se um importante passo para o desenvolvimento de estratégias destinadas a prevenir a propagação destes patógenos em nosso meio.

Com a utilização do sequenciamento genômico para análises moleculares, acreditamos que seja possível obter informações mais relevantes a respeito das amostras produtoras de carbapenemases no Brasil, tais como a investigação de genes de resistência, análises de mutações em genes intrínsecos envolvidos na resistência bacteriana, investigação do ambiente genético dos diferentes genes de resistência, da presença de genes de virulência e a análise da relação filogenética entre as amostras produtoras de carbapenemases em nosso país.

O Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar, que tem atuado como Centro Colaborador do Ministério da Saúde na Rede Nacional de Monitoramento de Resistência a Antimicrobianos da ANVISA, projeto desenvolvido em parceria com a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) e com a Coordenação-Geral de Laboratórios em Saúde Pública da Secretaria de Vigilância em Saúde (CGLAB/SVS/MS), apoiado institucionalmente pela Vice-Presidência de Referência e Pesquisa da FIOCRUZ, recebe amostras bacterianas resistentes aos carbapenemas isoladas em vários hospitais do Brasil. Podemos observar que entre janeiro de 2010 a junho de 2014, nosso laboratório recebeu 5.211 amostras de *K. pneumoniae* resistentes ou com resistência intermediária aos carbapenemas, sendo 4.020 (77%), confirmadas molecularmente como produtoras de carbapenemases.

Desta forma, a relevância deste estudo deve-se a crescente incidência de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases no Brasil e a carência de dados regionais e nacionais. Outro fator relevante é a dificuldade do tratamento de infecções causadas *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase, uma vez que as bactérias carregam plasmídios e elementos genéticos com determinantes de resistência a múltiplos antimicrobianos. Portanto, a detecção prematura deste mecanismo de resistência e o controle da disseminação destes patógenos no ambiente hospitalar tem se mostrado de grande importância. Desta maneira estudos que investiguem e caracterizem molecularmente essas amostras tem se tornado cada dia mais necessários.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Realizar a caracterização molecular de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapenemases do tipo KPC, NDM e OXA-48-like provenientes de diferentes estados brasileiros e obtidas de diferentes materiais clínicos no período entre 2010 a 2014.

### 2.2 Objetivos específicos

- Confirmar a variante alélica dos genes  $bla_{KPC}$ ,  $bla_{NDM}$  e  $bla_{OXA-48-like}$  através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento.
- Determinar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos.
- Identificar a presença de genes de resistência a beta-lactâmicos, aminoglicosídeos e quinolonas através de PCR.
- Identificar a presença de genes de virulência descritos em *K. pneumoniae* através de PCR.
- Avaliar o polimorfismo genético das amostras de *K. pneumoniae* através das técnicas de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) e *Multilocus sequence typing* (MLST).
- Determinar o tamanho do plasmídeo carreador dos genes codificadores de carbapenemases (KPC, NDM e OXA-48-like) através de técnicas moleculares como extração plasmidial e hibridização.
- Investigar a presença de genes de resistência e virulência, caracterizar o ambiente genético dos diferentes genes de resistência e realizar análise da relação filogenética entre as amostras produtoras de carbapenemases através do sequenciamento genômico de amostras selecionadas.

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1 Seleção das amostras**

De janeiro de 2010 a junho de 2014 foram recebidas no Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar (LAPIH – IOC – FIOCRUZ) 5.211 amostras de *K. pneumoniae* resistentes ou com resistência intermediária aos carbapenemas. Dentre estas amostras, 3.968 eram positivas para KPC, 20 para NDM e 32 para OXA-48-like, detectadas através de PCR realizado previamente. Estas amostras fazem parte da Coleção de Culturas de Bactérias de Origem Hospitalar (CCBH) e encontram-se preservadas em Ágar BHI com glicerol (armazenadas a -20<sup>0</sup> C) e foram enviadas voluntariamente pelos Laboratórios Centrais dos estados de origem. Para este estudo, foi selecionado um total de 66 amostras: 32 amostras positivas para KPC, 12 amostras positivas para NDM e 22 amostras positivas para OXA-48-like.

O critério para a seleção das amostras positivas para KPC foi a inclusão de cepas provenientes de onze estados brasileiros (Alagoas, Amazonas, Ceará, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro e Santa Catarina) representantes dos principais clones (definidos por PFGE/MLST) presentes no período onde observamos a grande disseminação de KPC em nosso país (2010), a partir dos resultados obtidos durante a dissertação de mestrado.

Da mesma forma, o critério para a seleção das amostras positivas para NDM e OXA-48-like foi a inclusão de cepas provenientes do período onde observamos o início da disseminação dessas carbapenemases em nosso país, entre 2013 e julho de 2014, isoladas no estado do Rio de Janeiro.

Um fluxograma com as metodologias realizadas neste estudo foi incluído no item 3.12, na página 69.

#### **3.2 Identificação das amostras de *K. pneumoniae* incluídas no estudo**

Para a realização dos experimentos incluídos neste trabalho, realizamos a confirmação da identificação. As amostras foram retiradas do estoque e semeadas em meio seletivo indicador Agar EMB (Oxoid) para a confirmação da pureza das culturas e incubadas a 37 °C por 18 a 24 horas. A confirmação da espécie bacteriana foi realizada através da observação da morfologia da colônia (colônias rosadas, com aspecto mucoide e centro negro na semeadura

em ágar EMB), a coloração das bactérias pela metodologia de Gram (bastonetes Gram-negativos) e provas bioquímicas convencionais. Para os testes bioquímicos, foi utilizado o meio de TSI para detecção da fermentação de carboidratos e produção de sulfato de hidrogênio; meio de Citrato de Simmons (Oxoid) para a observação da capacidade de utilização do citrato como única fonte de carbono; meio de SIM (Oxoid) para a avaliação da motilidade, produção de indol e gás sulfídrico; foi avaliada também a capacidade de utilização de aminoácidos como a descarboxilação da lisina (Oxoid), ornitina (Oxoid) e arginina (Oxoid) e ágar base ureia que avalia a capacidade de degradar a ureia em duas moléculas de amônia pela ação da enzima urease (179, 180).

### **3.3 Detecção molecular dos genes codificadores de carbapenemases e identificação da variante alélica**

#### **3.3.1 Extração de DNA pela metodologia de Tiocianato de Guanidina**

O Ácido Desoxirribonucleico (DNA) total das amostras incluídas no estudo foi extraído pelo método conhecido como tiocianato de guanidina, descrito por Caetano-Anolles e Gresshoff em 1997 (181). O crescimento bacteriano das amostras incluídas no estudo foi primeiramente semeado em meio ágar nutriente (Oxoid) (incubação em estufa a 37° C). No dia seguinte, uma colônia isolada foi semeada em 3 ml de caldo TSB (*Tryptic Soy Broth*) e o caldo foi submetido a agitação a 37°C por 12 horas. Deste crescimento, 1,5 ml foi transferido para um microtubo tipo *Eppendorf*, e em seguida, centrifugado por 10 minutos (10000rpm). As colônias bacterianas formaram um pequeno sedimento ao fundo e o sobrenadante foi descartado. Ao mesmo microtubo foram adicionados os 1,5 ml restantes do crescimento bacteriano, seguido da etapa de centrifugação (10 minutos a 10000 rpm). O sobrenadante foi novamente descartado. Ao sedimento formado foi adicionado 1 ml de solução salina (NaCl 0,9%), seguida de homogeneização em vórtex. Esta etapa foi repetida duas vezes, sendo intercalada por 10 minutos de centrifugação (10000 rpm). O sedimento foi suspenso em 100 µl de tampão TE (100mM Tris / 10mM EDTA). Em seguida, adicionou-se 500 µl da solução de Tiocianato de Guanidina (5M tiocianato de guanidina, 0,1M de EDTA, sarcosil 0,5%), realizou-se a homogeneização por inversão e o tubo foi incubado por 5 minutos a -20°C. Após esta etapa, foram adicionados à mistura 250 µl de acetato de potássio 5M (estocado a -20°C), seguida de nova homogeneização por inversão, e posteriormente incubação por 5 minutos a -20°C.

Após este período, foram adicionados à mistura 500 µl de solução de clorofórmio-álcool isoamílico, seguido da agitação em vórtex até a completa homogeneização. O resultado desta etapa foi a obtenção de uma solução de cor leitosa. Essa solução foi novamente centrifugada por 10 minutos (10000 rpm), onde se pode obter uma solução trifásica. Aproximadamente 750 µl da fase superior foram retirados e transferidos para um novo microtubo tipo *Eppendorf*, que já continha 380 µl de isopropanol. A mistura foi mantida em freezer (-20°C) por 12 horas e na manhã seguinte, foi centrifugada por 10 minutos (10000 rpm). O sobrenadante foi desprezado e o DNA foi então mantido no fundo como um pequeno sedimento. Ao sedimento, foi adicionado 150 µl de álcool 70%, seguido de centrifugação por 10 minutos (10000rpm). Esta etapa foi repetida duas vezes. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi mantido em temperatura ambiente para que todo o álcool remanescente evaporasse. O sedimento foi ressuspensão em 100 µl de tampão TE, por 3h horas em estufa ou banho-maria a 37°C. O DNA foi posteriormente mantido em freezer a - 20°C para a realização dos testes moleculares.

### 3.3.2 Detecção molecular dos genes codificadores das carbapenemases KPC, NDM e OXA-48-like.

A detecção dos genes *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>NDM</sub> e *bla*<sub>OXA-48-like</sub> nas amostras de *K. pneumoniae* incluídas no estudo foi realizada através de reação em cadeia da polimerase (PCR) com a utilização dos iniciadores descritos na literatura, cujas sequencias estão apresentadas na Tabela 3.1.

**Tabela 3.1:** Iniciadores específicos para a detecção dos genes *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>NDM</sub> e *bla*<sub>OXA-48-like</sub> utilizados nas reações de PCR.

Região alvo	Sequencia do iniciador (5' → 3')	Tamanho do produto	Referência
<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	KPC-F: TGTCACTGTATCGCCGTC KPC-R: CTCAGTGCTCTACAGAAAACC	1011 pb	Ygiti <i>et al.</i> , 2001 (49)
<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	NDM-F: GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC NDM-R: CGGAATGGCTCATCACGATC	608 pb	Nordmann <i>et al.</i> , 2011 (48)
<i>bla</i> <sub>OXA-48-like</sub>	OXA-48-F: TTGGTGGCATCGATTATCGG OXA-48-R: GAGCACTTCTTTTGTGATGGC	755 pb	Poirel, <i>et al.</i> , 2010 (97)

Para a realização da reação de PCR num volume final de 25 µl, as quantidades e concentrações dos reagentes utilizados estão na Tabela 3.2.

**Tabela 3.2:** Quantidades e concentrações das reações de PCR para detecção de genes codificadores das carbapenemases *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>NDM</sub> e *bla*<sub>OXA-48-like</sub>.

Reagente	Quantidade (µl)	Concentração
DNA total	1 µl	≅ 25ng/ µl
Água Milli-Q	14,25 µl	-
Tampão PCR (GoTaq Flexi-Promega)	5 µl	5X
Iniciadores	1,25 µl de cada	20 pmoles/ µl
Desoxinucleotídeos (dNTP)	0,5 µl	10 mM
Solução MgCl <sub>2</sub> (GoTaq Flexi-Promega)	1,5 µl	1,5 mM
Taq DNA polymerase (GoTaq Flexi-Promega)	0,25 µl	5U/ µl

Para amplificação do gene *bla*<sub>KPC</sub>, as condições de amplificação no equipamento termociclador (Biorad) foram: um ciclo de 3 minutos a 94 °C para desnaturação inicial do DNA, 35 ciclos de: 1 minuto a 94°C para desnaturação, 1 minuto a 50°C para ligação dos iniciadores e 1 minuto a 72°C para extensão da cadeia nucleotídica, seguidos de uma extensão final de 10 min a 72°C. Para o gene *bla*<sub>NDM</sub>: 10 minutos a 94°C; 36 ciclos de amplificação: 30 segundos a 94°C, 40 segundos a 52°C, e 50 segundos a 72°C; seguido de 5 minutos a 72°C para extensão final. Para o gene *bla*<sub>OXA-370</sub>, utilizamos um ciclo de 5 minutos a 94 °C para desnaturação inicial do DNA, 30 ciclos de: 1 minuto a 94°C; 1 minuto a 57°C e 1 minuto a 72°C, seguidos de uma extensão final de 5 min a 72°C.

O resultado da reação de PCR, onde se esperou a amplificação dos genes alvo, foi visualizado através de eletroforese em gel de agarose (Invitrogen) a 1,5% em TBE 0,4X (EDTA 0,5M pH 8,0; Tris 1M pH 8,0; Ácido Bórico 0,035 M). A eletroforese foi realizada com tampão de corrida TBE 0,4X sob uma corrente de 130 Volts. Após a corrida eletroforética, o gel foi corado com brometo de etídio (0,5g/L), observado sob luz ultravioleta em equipamento L-Pix EX- Loccus Biotecnologia, e fotografado utilizando o *software Loccus LPix Image EX* (versão 2.7).

### 3.3.3 Identificação da variante alélica dos genes codificadores das carbapenemases KPC NDM e OXA-48-like

Os produtos de PCR gerados foram purificados utilizando o kit comercial “GFX PCR DNA Purification Kit” (GE Healthcare). Em seguida, foram sequenciados na Plataforma de Sequenciamento DNA- PDTIS do Laboratório de Sequenciamento e Bioinformática do IOC-

FIOCRUZ que utiliza o sequenciador 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems). As sequências de DNA geradas foram analisadas com a ajuda do *software* Geneious (versão 6.1.8). A análise foi realizada comparando-se as sequências obtidas nas amostras do estudo com as sequências dos genes codificadores de carbapenemases de referência depositados no website <http://www.lahey.org/studies/>, que dispõe das classificações de beta-lactamases e das sequências nucleotídicas e aminoacídicas das mesmas.

### **3.4 Detecção das regiões flanqueadoras dos genes codificadores de carbapenemases (*bla*<sub>KPC</sub> e *bla*<sub>NDM</sub>)**

Na literatura, o gene *bla*<sub>KPC</sub> têm sido associado ao transposon Tn4401 (54), o gene *bla*<sub>NDM</sub> à sequência de inserção IS*Aba125* e ao gene *ble*<sub>MBL</sub> (48), entretanto, para o gene *bla*<sub>OXA-370</sub>, por ser uma descrição recente, ainda não existem iniciadores disponíveis na literatura para amplificação do seu ambiente genético.

Assim, a detecção da região flanqueadora dos genes codificadores de carbapenemases (*bla*<sub>KPC</sub> e *bla*<sub>NDM</sub>) foi realizada através de reações de PCR, em todas as amostras produtoras dessas carbapenemases (KPC=32 e NDM=12) utilizando os iniciadores descritos na literatura. Os iniciadores utilizados estão descritos na Tabela 3.3. É importante salientar que nas amostras positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub> a detecção do transposon Tn4401 já havia sido realizada durante a dissertação de mestrado.

**Tabela 3.3:** Iniciadores específicos utilizados para a detecção dos elementos genéticos mais associados às carbapenemases *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>NDM</sub> e *bla*<sub>OXA-48-like</sub>.

Elemento genético	Iniciadores utilizados	Tamanho produto	Referência			
Tn4401 (relacionado ao <i>bla</i> <sub>KPC</sub> )	<i>bla</i> <sub>KPC</sub> - F <i>bla</i> <sub>KPC</sub> - R	CTGTCTTGTCTCTCATGGCC CCTCGCTGTGCTTGTCATCC	795 pb	Naas <i>et al.</i> , 2008 (54)		
	ISKpn6 - F ISKpn6 - F	GGCACGGCAAATGACTA GAAGATGCCAAGGTCAATGC	649 pb			
	IR direita - F IR direita - R	ACGACCACGCACGCACAAAC GCATCAAACGGAAGCAAAAAG	220 pb			
	ISKpn7 - F ISKpn7 - R	TGACCCTGAGCGGCGAAAGC CACAGCGGCAGCAAGAAAGC	703 pb		Kitchel <i>et al.</i> , 2009 (55)	
	TnpA -F TnpA -R	GCGACCGGTCAGTTCCTTCT CACCTACACCACGACGAACC	198 pb			
	IR esquerda - F IR esquerda - R	TCACCGGCCCTCACCTTTGG CTTAGCAAATGTGGTGAACG	462 pb		Naas <i>et al.</i> , 2008 (54)	
	IS <i>Aba125</i> e <i>ble</i> <sub>MBL</sub> (relacionado ao <i>bla</i> <sub>NDM</sub> )	IS <i>Aba125</i> ext	ACACCATTAGAGAAATTTGC		1567 pb	Poirel <i>et al.</i> , 2011 (48)
		<i>ble</i> <sub>MBL</sub> -R	GGCGATGACAGCATCATCCG			

Para a realização da reação de PCR num volume final de 25 µl, as quantidades e concentrações dos reagentes utilizados para amplificação dos genes estão descritos na Tabela 3.4.

**Tabela 3.4:** Quantidades e concentrações das reações de PCR para detecção das regiões flanqueadoras dos genes *bla*<sub>KPC</sub> e *bla*<sub>NDM</sub>.

Reagente	Quantidade (µl)	Concentração
DNA total	1 µl	≅ 25ng/ µl
Água Milli-Q	9,5 µl	-
MIX para PCR (JumpStart™ REDTaq® ReadyMix™ Reaction Mix – Sigma)	12,5 µl	5X
Iniciadores	1,0 µl	20 pmoles/µl

Para as condições de amplificação dos genes do Tn4401 foram utilizados 30 ciclos de 5 minutos a 94°C para desnaturação, 45 segundos a 55°C para anelamento e 45 segundos a 72°C para extensão, seguidos de uma extensão final de 10 min a 72°C para a amplificação.

Para a amplificação da região que contempla os genes IS*Aba125* e *ble*<sub>MBL</sub> as condições de amplificação foram: 5 minutos a 95°C para desnaturação inicial; seguida de 35 ciclos 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 50°C, 1 minuto a 72°C, seguido de uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

Após a reação de PCR, os produtos de amplificados foram observados através de eletroforese em gel de agarose (Invitrogen) a 1,5% em TBE 0,4X, sob uma corrente de 130 Volts. Após a corrida eletroforética, os géis foram corados com brometo de etídio (0,5g/L), observados e fotografados sob luz ultravioleta em equipamento L-Pix EX- Loccus Biotecnologia, utilizando o *software Loccus LPix Image EX* (versão 2.7).

### **3.5 Determinação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos.**

#### **3.5.1 Disco difusão**

O teste de susceptibilidade aos antimicrobianos foi realizado em todas as amostras de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases selecionadas para o estudo (n=66). A partir de cultura recente em ágar nutriente (Oxoid), foram selecionadas de 1 a 2 colônias isoladas de cada amostra para obtenção de uma suspensão com turbidez equivalente ao padrão 0,5 na escala de MacFarland em solução salina (NaCl 0,9%). A suspensão foi semeada através da utilização de swab estéril em toda a superfície do meio Mueller Hinton Agar (MHA; Oxoid) para obtenção de crescimento semi-confluyente. Após no máximo 15 minutos, foram aplicados os discos de papel de filtro contendo os antimicrobianos selecionados (OXOID), mantendo-se uma distância de no mínimo 2,5 cm entre os discos. Os seguintes antimicrobianos foram testados: cefepime (30µg); ceftazidima (30µg); cefotaxima (5µg); piperacilina/ tazobactam (110 µg); gentamicina (10µg); amicacina (30µg); ciprofloxacina (5µg), sulfametoxazole/ trimetoprima (25 µg) e fosfomicina/trometamol (200µg).

Após a aplicação dos discos contendo os antimicrobianos, as placas foram incubadas em estufa a 35°C, por 16-18h, em aerobiose, segundo as recomendações do CLSI 2015 (182). Após esse período, os diâmetros dos halos de inibição obtidos foram avaliados para cada antimicrobiano de acordo com o CLSI 2015 (183). Para controle do experimento, foram utilizadas as amostras *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *E. coli* ATCC 35218 conforme recomendações do CLSI.

#### **3.5.2 Determinação da concentração inibitória mínima de carbapenemas, tigeciclina e polimixina B.**

A determinação da concentração inibitória mínima foi obtida para imipenem, meropenem, polimixina B e tigeciclina através de Etest® (AB Biodisk, Solna, Suécia) para todas as amostras incluídas no estudo (n=66).

Para tal, a preparação das amostras e a semeadura em ágar Mueller Hinton foram efetuadas de acordo com o que foi estabelecido no tópico anterior (3.4.1). Entretanto, utilizamos fitas de Etest®, que possuem concentrações distintas de cada antimicrobiano, que possibilitam a determinação da concentração inibitória mínima para cada fármaco.

Como controle, foram utilizadas as amostras *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *E. coli* ATCC 35218 de acordo com as recomendações do CLSI 2015. Para interpretação dos resultados dos carbapenemas, tigeciclina e polimixina B, utilizamos a Nota Técnica da ANVISA N°. 01/2013 (184).

### **3.5.3 Análise de perfil de multirresistência**

Realizamos avaliação do perfil de multirresistência das amostras incluídas no estudo. Agrupamos como não sensíveis aos antimicrobianos as amostras que apresentaram como intermediárias e resistentes de acordo com os critérios do CLSI 2015 e Nota Técnica da ANVISA N°. 01/2013. O critério de multirresistência utilizado foi o definido por Magiorakos e colaboradores em 2012 (185), no qual é definida como multirresistente a enterobactéria com resistência a pelo menos um antimicrobiano em três categorias a seguir: aminoglicosídeos, cefalosporinas de amplo espectro, penicilinas associadas a inibidores de beta-lactamases, carbapenemas, fluoroquinolonas, inibidores da via do folato, glicilciclina, ácidos fosfônicos e polimixinas com a base nos resultados obtidos no teste de difusão em ágar e Etest®.

### **3.5.4 Análises estatísticas**

Realizamos comparação entre susceptibilidade e não susceptibilidade aos antimicrobianos entre as amostras de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases do tipo KPC, NDM e OXA-48-like. Para tal, foi realizado o teste de Qui Quadrado, com correção de Yates (quando necessário), ou o teste exato de Fisher (para comparações de menos de 40 amostras). O valor de p menor ou igual a 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

Para a comparação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) obtida para cada antimicrobiano, realizamos o teste T de Student não pareado com correção de Welch para amostras que possuíssem variâncias diferentes. Consideramos como estatisticamente significativo o valor de p menor ou igual a 0,05.

### 3.6 Detecção dos genes codificadores de resistência

Foram realizadas reações de PCR para a detecção dos genes codificadores de beta-lactamases (*bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> e *bla*<sub>CTX-M</sub>), genes adquiridos codificadores de resistência a quinolonas (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*), genes codificadores de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos [*aac*(3')-IIa, *aadA*, *aadB*, *aac*(6')-Ib] e metilases (*armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD* e *npmA*) nas amostras de *K. pneumoniae* (n=66). Os iniciadores utilizados foram determinados em trabalhos científicos publicados na literatura e estão exemplificados na Tabela 3.5.

**Tabela 3.5:** Iniciadores específicos para a detecção dos genes de resistência utilizados nas reações de PCR.

Classe do antimicrobiano	Gene alvo	Sequencia do iniciador (5' → 3')	Tamanho do produto (pb)	Temperatura de anelamento da PCR	Referências
Beta-lactâmicos	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	CTX-M-F: ATGTGCAGYAACCAGTAARGTKATGGC CTX-M-R: TGGGTRAARTARGTSACCAGAAYCAGCGG	593pb	50°C	Mulvey et al., 2003 (186)
	<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	SHV-F: TTATCTCCCTGTTAGCCACC SHV-R: GATTTGCTGATTTTCGCTCGG	797pb	60°C	Hasman et al., 2005 (187)
	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	TEM-F: GCGGAACCCCTATTTG TEM-R: ACCAATGCTTAATCAGTGAG	859pb	60°C	Hasman et al., 2005 (187)
Quinolonas	<i>qnrA</i>	QnrAm-F: AGAGGATTTCTCACGCCAGG QnrAm-R: TGCCAGGCACAGATCTTGAC	580 pb	54°C	Cattoir et al, 2007 (188)
	<i>qnrB</i>	QnrBm-F: GGMATHGAAATTCGCCACTGTC QnrBm-R: TTTGCGYGYCGCCAGTCGAAAC	264 pb	54°C	Cattoir et al, 2007 (188)
	<i>qnrS</i>	QnrSm-F: GCAAGTTCATTGAACAGGGT QnrSm-R: TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG	428 pb	54°C	Cattoir et al, 2007 (188)
Aminoglicosídeos	<i>aac(3)-IIa</i>	aac(3)-IIa-F: CGCTAAACTCCGTTACC aac(3)-IIa-R: TAGCACTGAGCAAAGCC	255 pb	55°C	Melano et al, 2003 (189)
	<i>aadA</i>	aadA-F: ATGAGGGAAGCGGTGATCGC aadA-R: TCTTCCAACCTGATCTGCGCG	795 pb	55°C	Enne et al, 2006 (190)
	<i>aadB</i>	aadB-R: CGTCATGGAGGAGTTGGACT aadB-R: CGCAAGACCTCAACCTTTTC	252 pb	55°C	Díaz et al, 2004 (191)
	<i>aac(6)-Ib</i>	aac(6)-Ib-F: TTGCGATGCTCTATGAGTGG aac(6)-Ib-R: CTCGAATGCCTGGCGTGTTT	482 pb	55°C	Warburg et al, 2012 (192)
	<i>armA</i>	armA-F: TATGGGGGTCTTACTATTCTGCCTAT armA-R: TCTTCCATTCCTTCTCCTTT	513 pb	45°C	Fritsche et al, 2008 (193)
	<i>rmtA</i>	rmtA-F: CTAGCGTCCATCCTTTCCTC rmtA-R: TTTGCTTCCATGCCCTTGCC	634 pb	45°C	Fritsche et al, 2008 (193)
	<i>rmtB</i>	rmtB-F: TCAACGATGCCCTCACCTC rmtB-R: GCAGGGCAAAGGTAATAATCC	439 pb	45°C	Fritsche et al, 2008 (193)
	<i>rmtC</i>	rmtC-F: GCCAAAGTACTCACAAGTGG rmtC-R: CTCAGATCTGACCCAACAAG	751 pb	45°C	Fritsche et al, 2008 (193)
	<i>rmtD</i>	rmtD-F: CAGCGAACTGAAGGAAAAAC rmtD-R: CAGCACGTAAAACAGCTC	729 pb	45°C	Castanheira et. al., 2008 (194)
	<i>npmA</i>	npmA-F: CTCAAAGGAACAAAGACGG npmA-R: GAAACATGGCCAGAAACTC	640 pb	45°C	Fritsche et al, 2008 (193)

Para a realização da reação de PCR num volume final de 25 µL, as quantidades e concentrações dos reagentes utilizados foram as mesmas utilizadas para amplificação dos genes codificadores de carbapenemases (tópico 3.3.2).

Para amplificação dos genes, utilizamos um ciclo inicial de cinco minutos a 94 °C, 30 ciclos de: 1 minuto a 94°C para desnaturação, 1 minuto na temperatura de anelamento sinalizada na Tabela 3.5 e 1 minuto a 72°C para extensão da cadeia nucleotídica, seguidos de uma extensão final de 10 min a 72°C. Após a amplificação por PCR, os produtos gerados foram observados através de eletroforese em gel de agarose 1,5% (Invitrogen) em TBE 0,4X, sob uma corrente de 130 Volts. Após a eletroforese, os géis foram corados com brometo de etídio (0,5g/L), observados e fotografados sob luz ultravioleta em equipamento L-Pix EX-Loccus Biotecnologia, utilizando o *software* *Loccus LPix Image EX* (versão 2.7).

Realizamos comparação estatística entre os genes relacionados à resistência entre as amostras de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases, conforme exemplificado no tópico 3.5.4.

### **3.7 Detecção dos genes relacionados à virulência**

Foram pesquisados nas amostras de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases (n=66) através de PCR, utilizando iniciadores descritos na literatura, genes envolvidos na produção de fímbrias e adesinas (*mrkD*, *cf29a*, *fimH* e *ycfM*); transporte de ferro e sideróforos (*kfu*, *IroN*, *ybtS*, *entB*); responsável pelo fenótipo mucoso (*magA*); e metabolismo da alantoína (*allS*) que está envolvida na absorção do nitrogênio.

A realização PCR num volume final de 25 µl, contou com mesmas quantidades e concentrações dos reagentes utilizados para amplificação dos genes codificadores de carbapenemases (tópico 3.3.1).

Na PCR, utilizamos um ciclo inicial de cinco minutos a 94 °C, seguido de 35 ciclos de: 1 minuto a 94°C para desnaturação, 1 minuto na temperatura de anelamento informada na Tabela 3.6 e 1 minuto a 72°C para extensão da cadeia nucleotídica, seguidos de uma extensão final de 5 min a 72°C.

**Tabela 3.6:** Iniciadores utilizados para busca de genes de virulência nas amostras de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases.

Região alvo	Sequencia do iniciador (5' → 3')	Tamanho do produto (pb)	Temp. de anelamento da PCR	Referência
<i>mrkD</i>	mrkD-1: TAT(T/C)G(G/T)CTT AAT GGC GCT GG mrkD-2: TAATCGTACGTCAGGTTAAAGA(C/T)C	920 pb	50°C	Brisse et al, 2009 (158)
<i>cf29a</i>	cf29a-F: GACTCTGATTGCACTGGCTGTG cf29a-F: GTTATAAGTTACTGCCACGTTT	826 pb	51°C	Brisse et al, 2009 (158)
<i>fimH</i>	fimH-f: GCTCTGGCCGATAC(C/T)AC(C/G)ACGG fimH-R: GC(G/A)(A/T)A(G/A)TAA CG(T/C)GCCTGGAACGG	423 pb	55°C	Brisse et al, 2009 (158)
<i>ycfM</i>	ycfM-F: CGATTGAGCATCAGGATCAG ycfM-R: GTTGGTGCGGTTGTTTCAC	161 pb	50°C	Lafeuille et al, 2013(195)
<i>kfu</i>	kfu-F: GAAGTGACGCTGTTTCTGGC kfu-R: TTTCTGTGGCCAGTGACTC	797 pb	55°C	Ma et al., 2005 (196)
<i>IroN</i>	IroN-F: GCATAGGCGGATACGAACAT Iron-R: CACAGGGCAATTGCTTACCT	556 pb	50°C	Yu et al, 2008 (197)
<i>ybtS</i>	ybtS-F: CAAAAATGGGCGGTGGATTC ybtS-R: CCTGACGGAACATAAACGAGCG	484 pb	59°C	Batchman et al, 2011(198)
<i>entB</i>	entB-F: CGCCCAGCCGAAAGAGCAGA entB-R: CATCGGCACCGAATCCAGAC	508 pb	55°C	Lafeuille et al, 2013(195)
<i>magA</i>	magA-F: GGT GCT CTT TAC ATC ATT GC magA-R: GCA ATG GCC ATT TGC GTT AG	1280 pb	50°C	Fang et al, 2004 (163)
<i>allS</i>	allS-F: CCG TTA GGC AAT CCA GAC allS-R: TCT GAT TTA (A/T)CC CAC ATT	1090 pb	49°C	Chou et al., 2004 (166)

Após a amplificação por PCR, os produtos de amplificação obtidos foram observados através de eletroforese em gel de agarose 1,5% (Invitrogen) em TBE 0,4X, sob uma corrente de 130 Volts. Após a corrida de eletroforese, os géis foram corados com brometo de etídio (0,5g/L), observados e fotografados sob luz ultravioleta em equipamento L-Pix EX- Loccus Biotecnologia, utilizando o *software Loccus LPix Image EX* (versão 2.7).

Realizamos também comparação estatística entre os genes relacionados à virulência entre as amostras de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases, conforme exemplificado no tópico 3.5.4.

### 3.8 Análise do polimorfismo genético através de PFGE.

Através de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) (199), realizamos a análise do polimorfismo genético de todas as amostras de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases incluídas no estudo. Vale ressaltar que nas amostras positivas para KPC (n=32) esta técnica já havia sido realizada durante a dissertação de mestrado.

Para a extração de DNA, as amostras foram semeadas em ágar nutriente em tubo (Oxoid), e incubadas a 37 °C por 24 horas. Após a incubação, foi realizada suspensão bacteriana, adicionando 01 ml de BSC (EDTA 0,5M pH 8.0, TRIS-HCl 1M pH 8) até que a suspensão alcançasse o padrão de turvação 3 da escala de Mac Farland. Em seguida, 200 µl da suspensão foram transferidos para um microtubo tipo *Eppendorf* contendo 5 µl de proteinase K (50 mg/ µl - Sigma). À suspensão, foram adicionados 200 µl de agarose 1% (0,1 g de agarose *low melting* [Seaken gold], 0,5 ml de SDS 1%, 9,4 ml de TE [TRIS-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 0,1 MM pH 8.0]). A mistura foi rapidamente homogeneizada e distribuída nos moldes específicos, produzidos pelo fabricante do equipamento (BioRad).

Após a solidificação dos blocos de agarose contendo DNA bacteriano, que ocorreu em geladeira por 05 minutos, os mesmos foram transferidos para tubos Falcon (15 ml) contendo 2 ml de solução de lise (NaCl 1M, TRIS-HCl 6 mM pH 7.6, EDTA 100mM pH 8.0, BRIJ-58 0,5%, desoxicolato 0,2%, sarcosina 0,5%, lisozima 1 mg/ml) e 5 µl de proteinase K (50 mg/ µl). Os tubos tipo Falcon foram incubados a 50°C por 2 horas. Após a incubação, foram realizadas três lavagens com 10 ml de água milli Q a 50°C por 15 minutos e uma vez com 7 ml de Tampão TE a 50°C por 15 minutos. Após as etapas de lavagem, os blocos de agarose estão prontos para utilização. Os blocos de agarose foram armazenados em geladeira (4°C) em 2ml de tampão TE.

Um pedaço correspondente a terço de um bloco de agarose foi transferido para um microtubo tipo *Eppendorf* para a realização da digestão enzimática. Uma solução tampão da enzima *XbaI* foi preparada (90 µl de água esterilizada e 10 µl de solução tampão da enzima – Roche), foi adicionada ao microtubo que continha um pedaço do bloco de agarose e em seguida, incubada a 4°C por 30 minutos. Em seguida, os blocos de agarose foram tratados com a enzima de restrição *XbaI* (20U) (Roche) por 3 horas a 37°C.

Para a corrida eletroforética, foi preparado um gel de agarose 1,1% (Seaken gold), em TBE 0,4X (TRIS 44,5 mM, ácido bórico 44,5 mM, EDTA 1mM pH 8.3). A separação dos fragmentos ocorreu através de eletroforese em gel de campo pulsado, utilizando o sistema CHEF-DRIII (BioRad, Richmond, EUA). As seguintes condições para a eletroforese foram utilizadas: tempo de pulso crescente de 0,5 a 35 segundos, por 15 horas a 6V/cm, na temperatura de 13°C. Para padronização e para facilitar a comparação dos géis gerados, foram utilizados padrões de peso molecular Lambda DNA *Ladder Pulse* (50-1000 Kb - Sigma) em cada corrida.

Após a eletroforese, os géis foram corados com brometo de etídio (0,5g/L), visualizados e fotografados sob luz ultravioleta utilizando-se ferramenta de fotodocumentação Lpix EX- Loccus Biotecnologia e fotografado utilizando o *software Loccus LPix Image EX* (versão 2.7).

As análises dos géis e a confecção do dendrograma foram realizadas através do *software GelCompar II* (versão 1.50, Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Os agrupamentos foram realizados utilizando o coeficiente de *Dice*, e os valores de otimização e tolerância utilizados para análise foram fornecidos pelo próprio programa, através de ferramenta específica para esta análise.

### **3.9 Análise do polimorfismo genético através de MLST**

#### **3.9.1 Amplificação por PCR**

Realizamos a técnica da *Multilocus sequence typing* em pelo menos um representante de cada clone definido por PFGE das amostras produtoras de carbapenemases. Vale ressaltar que nas amostras positivas para KPC a avaliação por MLST já havia sido realizada durante a dissertação de mestrado. Os iniciadores utilizados nas reações foram descritos por Diancourt et al, 2005 (171) e estão exemplificados na tabela abaixo.

**Tabela 3.7:** Iniciadores específicos utilizados nas reações de PCR para a detecção dos genes incluídos no esquema de MLST de *K. pneumoniae*.

<b>Gene alvo</b>	<b>Iniciadores utilizados</b>	<b>Tamanho do produto</b>
<i>rpoB</i>	rpoB F:Vic3oF: GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAGGCGAAATGGC <b>WGAGAACCA</b>	1075 pb
	rpoB R:Vic2oR: TTGTGAGCGGATAACAATTTTCGAGTCTTCGAAGT <b>TGTAACC</b>	
<i>gapA</i>	gap F:gapA173oF: GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTATGAAATATGACT <b>CCACTCACGG</b>	662 pb
	gap R:gapA181oR: TTGTGAGCGGATAACAATTTCTTCAGAAGCGGC <b>TTTGATGGCTT</b>	
<i>mdh</i>	mdh F:mdh130oF: GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA <b>CCCAACTCGCTTCAGGTTTCAG</b>	756 pb
	mdh R:mdh867oR: TTGTGAGCGGATAACAATTTCCCGTTTTTCCCA <b>GCAGCAG</b>	
<i>pgi</i>	pgi F:pgi1FoF: GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAGAGAAAAACCT <b>GCCTGTACTGCTGGC</b>	566 pb
	pgi R:pgi1RoR: TTGTGAGCGGATAACAATTTCCGCGCCACGCTTT <b>ATAGCGGTTAAT</b>	
<i>phoE</i>	phoE F:phoE604.1oF: GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAACCTACCGCAAC <b>ACCGACTTCTTCGG</b>	602 pb
	phoE R:phoE604.2oR: TTGTGAGCGGATAACAATTTCTGATCAGAACTGG <b>TAGGTGAT</b>	
<i>infB</i>	infB F:infB1FoF: GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTACTCGCTGCTGGA <b>CTATATTCG</b>	462 pb
	infB R:infB1RoR: TTGTGAGCGGATAACAATTTTC <b>CGCTTTCAGCTCAAGAACTTC</b>	
<i>tonB</i>	tonB F:tonB1FoF: GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTACTTTATACCTCG <b>GTACATCAGGTT</b>	539pb
	tonB R:tonB2RoR: TTGTGAGCGGATAACAATTTTCATTCGCCGGCTGR <b>GCRGAGAG</b>	

Para a realização da reação de PCR num volume final de 25 µl, as quantidades e concentrações dos reagentes utilizados para amplificação dos genes do esquema de MLST estão na tabela abaixo.

**Tabela 3.8:** Quantidades e concentrações das reações de PCR para detecção de genes do esquema de MLST.

Reagente	Quantidade (µl)	Concentração
DNA total	1 µl	25ng/µl
Água Milli-Q	9,5 µl	-
MIX para PCR (JumpStart™ REDTaq® ReadyMix™ Reaction Mix – Sigma)	12,5 µl	5X
Iniciadores	1,0 µl	20 pmoles/µl

Para as condições de amplificação dos genes, realizamos um ciclo inicial de 2 minutos para desnaturação a 94°C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C para desnaturação, 01 minuto a 50°C para ligação dos iniciadores e 30 segundos a 72° C para extensão, seguidos de uma extensão final de 05 minutos.

Após a reação de PCR, os produtos de amplificação gerados foram observados através de eletroforese em gel de agarose (Invitrogen) a 1,5% em TBE 0,4X, sob uma corrente de 130 Volts. Após a eletroforese, os géis foram corados com brometo de etídio (0,5g/L), observados e fotografados sob luz ultravioleta em equipamento L-Pix EX- Loccus Biotecnologia, utilizando o *software Loccus LPix Image EX* (versão 2.7).

### 3.9.2 Sequenciamento

Os produtos da reação de PCR foram purificados através do kit “GfX PCR DNA Purification Kit” (GE Healthcare). Para o sequenciamento, foram utilizados iniciadores universais para sequenciamento, descritos no esquema de MLST de *K. pneumoniae*, conforme tabela abaixo (106).

**Tabela 3.9:** Iniciadores específicos utilizados nas reações de sequenciamento no esquema de MLST de *K. pneumoniae*.

Genes alvo	Iniciadores utilizados	
Genes incluídos no esquema de MLST (iniciadores de sequenciamento universal)	F:primer oF:	GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA
	R:primer oR:	TTGTGAGCGGATAACAATTTC

Os produtos purificados foram sequenciados no sequenciador 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems), na Plataforma de Sequenciamento DNA- PDTIS do Laboratório de

Sequenciamento e Bioinformática do IOC- FIOCRUZ. A análise da qualidade das sequencias obtidas foi realizada com auxílio do *software* Phred (versão 19.0), onde somente as sequencias que obtiveram  $\geq 20$  foram individualmente analisadas. Para a análise da composição das sequencias obtidas, o *software* Geneious (versão 6.1.8) foi utilizado.

Posteriormente, essas sequencias foram comparadas com as sequencias já disponíveis no banco de dados de MLST de *K. pneumoniae*, para a determinação de cada um dos números de alelo e conseqüentemente a discriminação de cada ST, com a ajuda do website <http://bigsdh.web.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>. Utilizando o *software* Eburst (disponível em <http://eburst.mlst.net/>), avaliamos a relação filogenética entre os ST observados. Para tal, consideramos amostras pertencentes ao mesmo Complexo Clonal aquelas que apresentaram diferença em apenas um alelo do MLST.

### **3.10 Análise plasmidial**

A detecção dos plasmídios carreadores dos genes codificadores das carbapenemases (*bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>NDM</sub> e *bla*<sub>OXA-48-like</sub>) foi realizada em pelo menos um representante de cada clone definido por PFGE/MLST. Devido à disponibilidade das técnicas no laboratório e a boa reprodutibilidade entre as técnicas de extração plasmidial utilizadas, realizamos a extração plasmidial utilizando duas metodologias: extração pelo método de Kado e Liu nas amostras positivas para KPC e o método S1 nuclease nas amostras positivas para *bla*<sub>OXA-48-like</sub> e *bla*<sub>NDM</sub>. Entretanto, nas amostras onde não foi possível visualizar plasmídios através da técnica de S1 nuclease, realizou-se a tentativa de visualização com a metodologia de Kado e Liu. É importante salientar que nas amostras positivas para KPC a detecção do gene carreador de *bla*<sub>KPC-2</sub> já havia sido realizada durante a dissertação de mestrado.

Para a realização da metodologia de extração plasmidial por Kado e Liu em 1981 (200), as amostras foram semeadas em placa de ágar Mueller Hinton (Oxoid), e foram incubadas por 18-24 horas a 37°C. Uma pequena porção das colônias foi retirada com o auxílio de uma agulha bacteriológica estéril e foi em seguida suspensa em microtubos contendo 200 µL de solução de lise com pH ajustado (SDS 0,1M; TRIS 0,05M; pH12,6). Essa solução foi então incubada em banho-maria a 55°C por 01 hora. A cada 20 minutos de incubação no banho, realizamos homogeneização por inversão para haver completa mistura entre a bactéria e a solução de lise. Após o período determinado (01 hora), as amostras foram retiradas do banho-maria e foi adicionado 200 µL de fenol-clorofórmio não tamponado (1:1). Esta mistura foi homogeneizada até que se tornasse de coloração esbranquiçada e em seguida,

foi centrifugada por 15 minutos (13.000 rpm). O sobrenadante translúcido foi cuidadosamente transferido para outro microtubo.

Para realização da corrida eletroforética, foi adicionado em cada uma das amostras, o tampão de corrida azul de bromocresol (0,2 volumes), misturando com movimentos circulares e suaves. Esta mistura foi depositada nos poços do gel de agarose (0,8%) (Invitrogen) e em seguida este gel foi submetido a ensaio de eletroforese em tampão TAE 1x (Tris-Acetato 40mM; EDTA 1mM; pH8,0), com corrente de 50 volts por 2 horas e meia. O gel foi em seguida corado com brometo de etídio (0,5g/l) por 30 minutos e depois fotografado sobre luz UV, utilizando o equipamento L-Pix EX- Loccus Biotecnologia, utilizando o *software* de obtenção de imagens *Loccus LPix Image EX* (versão 2.7).

Para a realização de extração plasmidial através da metodologia de S1 nuclease (201), utilizamos primeiramente a mesma extração de DNA total utilizada no tópico de PFGE (eletroforese em gel de campo pulsado – tópico 3.8). Para a realização da digestão enzimática, um pedaço correspondente a um terço de um bloco de agarose foi transferido para um microtubo tipo *Eppendorf*. O bloco de agarose contendo DNA genômico foi exposto a uma solução tampão (5µL do tampão do fabricante da enzima com 45 µL de água destilada) por 30 minutos. Em seguida, os blocos de agarose foram tratados com a enzima de restrição S1 nuclease (2U) (Promega), que tem a capacidade de linearizar os plasmídios, por 3 horas a 37°C.

Para a corrida eletroforética, foi preparado gel de agarose 0,8% (Seaken gold), em TBE 0,4X (TRIS 44,5 mM, ácido bórico 44,5 mM, EDTA 1mM pH 8.3). A separação dos fragmentos ocorreu através de eletroforese em gel de campo pulsado, utilizando o sistema CHEF-DRIII (BioRad, Richmond, EUA), utilizando as seguintes condições de corrida: tempo de pulso crescente de 0,5 a 35 segundos, por 14 horas a 6V/cm, na temperatura de 13°C.

Para a avaliação do tamanho dos plasmídios, todos os géis foram corridos com marcadores de peso molecular específicos: nos géis de corrida da metodologia de Kado e Liu, utilizamos o *Supercoiled DNA Ladder* (New England BioLabs) e nos géis de corrida utilizando S1 nuclease, utilizamos o *Lambda DNA Ladder Pulse* (50-1000 Kb - Sigma). Após a corrida, utilizamos o *software Loccus LabImage 1D* (versão 4.1) para calcular o tamanho das bandas dos plasmídios. Este software realiza este cálculo com base no padrão de migração e no tamanho dos marcadores de peso molecular utilizados.

### 3.10.1 Hibridização com sonda do gene codificador das carbapenemase (*bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>NDM</sub> e *bla*<sub>OXA-48-like</sub>)

Esta metodologia visa elucidar se os genes codificadores de carbapenemases estavam localizados em plasmídios nas amostras. A técnica utilizada foi a descrita por Sambrook & Russell em 2001 (202) e baseia-se na transferência de DNA contido em gel de agarose para membranas de nylon e a posterior hibridização dessas membranas com sondas marcadas com digoxigenina. As sondas foram confeccionadas por PCR, usando como DNA molde os genes de referência para codificação das carbapenemases, e utilizando também, além dos desoxinucleotídeos usuais, um nucleotídeo marcado com digoxigenina, 11-dUTP (Roche).

O primeiro passo foi a realização da metodologia extração plasmidial, como descrita no tópico anterior. De posse do gel contendo os plasmídios, realizamos a transferência do DNA do gel para a membrana Hybond N+ (Amershan) através do equipamento VacuGene™ XL Vacuum Blotting System (GE Healthcare). Este sistema é composto de uma bomba de vácuo (mantido a uma pressão de 50 mbar durante a transferência) e um aparato onde o gel e a membrana são dispostos. Durante a transferência, o gel foi inicialmente tratado com a solução de depurinação (HCl 0,25 M) por 10 minutos. Após a remoção desta solução foi adicionado ao gel a solução de desnaturação (NaCl 1,5 M e NaOH 0,5 N), também por 10 minutos. Essa solução foi também retirada e adicionou-se a solução de neutralização (Tris-HCl 0,5 M pH 8,0 e NaCl 1,5 M) por 10 min. Por último, após a retirada da última solução, foi adicionado SSC 20 X (NaCl 3,0M; Citrato de sódio 0,3M), de modo a cobrir toda a superfície do gel, por 2 horas. Depois da etapa de transferência, a membrana foi exposta por aproximadamente 20 segundos à radiação ultravioleta (UV Crosslinker, Hoefer) para fixação dos fragmentos de DNA. A membrana foi secada e guardada para utilização posterior.

Após a transferência, as membranas foram incubadas em 10 ml solução de pré-hibridização [5X SSC, 2% agente bloqueador (Roche), 0,1% N-laurilsarcosil, 0,02% SDS] durante 1 hora a 62°C sob agitação, no forno de hibridização (Techne hybridiser HB-1D, Techne, Cambridge, U.K.). Um volume de 50 µL da sonda marcada preparada anteriormente foi desnaturado por fervura durante 10 minutos, seguido de banho de gelo por cinco minutos. Após a etapa de pré-hibridização, a solução foi retirada e adicionou-se ao frasco 10 ml de solução de hibridização (10 ml solução de pré-hibridização acrescida de 50µL da sonda desnaturada). A hibridização ocorreu no forno de hibridização, a 62° C por 12 horas.

No dia seguinte, as membranas foram lavadas com solução de baixa estringência (2X SSC, 0,1% SDS) por duas vezes durante 5 minutos a temperatura ambiente sob agitação. Em seguida, foram lavadas por duas vezes com solução de alta estringência (0,1X SSC; 0,1% SDS) a 62°C com agitação por 15 minutos.

Após as etapas de lavagem, a membrana foi lavada em tampão 1 (100 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl). Esta etapa foi seguida da incubação por 30 minutos da membrana em tampão 2 (100 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 1% agente bloqueador), sob agitação. Realizou-se tratamento da membrana com 25 ml de solução de anticorpo (25 ml tampão 1 e 5µL de anticorpo contra DIG conjugado a fosfatase alcalina - Roche), por 30 minutos sob agitação. Após a marcação com anticorpo, a membrana foi lavada por duas vezes com tampão 1 por 10 minutos sob agitação.

Para revelação, a membrana foi equilibrada por 2 minutos em tampão 3 (100 mM Tris-base; 100 mM NaCl; 50mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9,5). Em seguida, foram adicionados à membrana 15 ml da solução de revelação NBT (*Nitro blue tetrazolium chloride* - Roche) mantido a 37° C ao abrigo de luz. O resultado pode ser observado de 2-24 horas após a adição do agente revelador. As membranas foram secas em estufa e guardadas em local seco ao abrigo de luz.

### **3.11 Sequenciamento genômico**

Foram selecionadas 11 amostras produtoras de carbapenemases a partir dos resultados obtidos para as metodologias de tipagem (PFGE e MLST) para a realização do sequenciamento genômico: cinco amostras positivas para *bla*<sub>KPC</sub> (CCBH5623, CCBH5745, CCBH5982, CCBH6306, CCBH6707), três amostras positivas para *bla*<sub>OXA-48-like</sub> (CCBH13796, CCBH14119, CCBH14393) e três amostras positivas para *bla*<sub>NDM</sub> (CCBH13327, CCBH15949, CCBH16302). Devido à disponibilidade de verbas e a boa reprodutibilidade entre as técnicas de sequenciamento utilizadas, realizamos o sequenciamento utilizando duas metodologias: 454 da Roche e Illumina MiSeq.

Com o sequenciamento genômico pesquisamos outros genes de virulência e resistência que não puderem ser investigados através de PCR além de realizar análise da região flanqueadora dos principais genes de resistência descritos. Objetivamos também realizar análise filogenômica das amostras com o intuito de comparar com os resultados obtidos no MLST.

### 3.11.1 Sequenciamento genômico utilizando a plataforma 454 (Roche)

Duas (CCBH5623 e CCBH5982) das cinco amostras positivas para KPC foram submetidas ao sequenciamento genômico utilizando a plataforma 454 GS FLX Titanium (Roche) no Instituto Evandro Chagas – Centro de Inovações Tecnológicas (Belém-Pará).

O DNA para sequenciamento de genoma completo foi extraído com o auxílio do equipamento MagNa Pure (Roche), utilizando o Kit MagNA Pure LC DNA Isolation Kit III. A biblioteca gênica foi preparada utilizando-se o Kit GS FLX Titanium Rapid Library Preparation. Após a realização da biblioteca de fragmentos foi realizada a PCR emulsão (emPCR) para titulação utilizando o kit GS FLX Titanium SV emPCR Kit (Lib-L) seguida da realização da emPCR para sequenciamento com o kit GS FLX Titanium LV emPCR Kit (Lib-L). O sequenciamento das amostras no equipamento 454 GS FLX Titanium (Roche) foi realizado utilizando-se o kit GS FLX Titanium Sequencing Kit XL+.

As sequências obtidas foram podadas e filtradas através de um escore Phred > 20. A montagem *de novo* dos dois genomas foi realizada através do montador Newbler (2.9). A anotação dos *contigs* obtidos foi feita através da anotação automática utilizando a plataforma RAST (*Rapid Annotation using Subsystem Technology* - <http://rast.nmpdr.org/>) e as análises individuais dos *contigs* foi realizada através do *software* Geneious (6.1.8).

### 3.11.2 Sequenciamento genômico utilizando a plataforma MiSeq (Illumina)

As demais amostras foram submetidas ao sequenciamento genômico utilizando a plataforma MiSeq (Illumina) no Departamento de Bioquímica, Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro.

O DNA genômico das amostras foi extraído usando o kit QIAamp Blood DNA Mini Kit (Qiagen, Alemanha). As bibliotecas gênicas foram preparadas com o Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina Inc, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. O DNA total foi sequenciado no sistema Illumina MiSeq utilizando o kit MiSeq Reagent v.2 500 cycles kit.

As sequências obtidas foram podadas e filtradas através de um escore Phred > 20. A montagem *de novo* dos genomas foi realizada através do montador A5-MiSeq pipeline (203). A anotação dos *contigs* obtidos foi feita através da anotação automática utilizando a plataforma RAST (*Rapid Annotation using Subsystem Technology* - <http://rast.nmpdr.org/>) e as análises individuais dos *contigs* foi realizada através do *software* Geneious (6.1.8).

### **3.11.3 Análise de genes de resistência adquirida através das Plataformas ResFinder e do banco de dados do Instituto Pasteur BIGSdb-Kp.**

Os *contigs* obtidos foram submetidos para análise na plataforma ResFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk//services/ResFinder/>), que identifica genes de resistência antimicrobiana adquiridos em sequências de DNA de bactérias. Os genes identificados através desta plataforma estão relacionados à resistência a: aminoglicosídeos, beta-lactamases, polimixinas, fosfomicinas, ácido fusídico, macrolídeos, lincosaminas, estreptograminas, fenicóis, fluoroquinolonas, nitroimidazol, oxazolidinonas, rifampicina, sulfonamidas, tetraciclina, trimetoprima e glicopeptídeos.

Os *contigs* foram submetidos também à comparação com o banco de dados do Instituto Pasteur (<http://bigsdbs.web.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>). Neste banco, estão depositados genes de resistência a beta-lactâmicos, aminoglicosídeos e quinolonas. Sequências gênicas de resistência a metais pesados *pbrABCR*, *pcoABCDERS*, *silCERS*, e *terWXY* também estão incluídos nesse banco de dados.

### **3.11.4 Análise da região flanqueadora dos principais genes de resistência adquiridos observados**

Os *contigs* que continham os principais genes de resistência observados foram avaliados individualmente utilizando o *software* Geneious (6.1.8). A anotação dessas regiões foi feita através da plataforma RAST (*Rapid Annotation using Subsystem Technology* - <http://rast.nmpdr.org/>) e curadoria manual, através de buscas utilizando BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool* - <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

### **3.11.5 Análise de mutações em genes relacionados à resistência a quinolonas, tigeciclina, e fosfomicina**

Foi realizada pesquisa de mutações, utilizando o *software* Geneious (v. 6.1.8) relacionadas à resistência a quinolonas, nas proteínas geradas pelos genes *gyrA*, *gyrB*, *parC* e *parE*, comparando as sequências das amostras sequenciadas com aquelas disponíveis no banco de dados originárias de amostras sensíveis (129). Foram pesquisados também genes associados à resistência a esta classe que não puderam ser investigados através de PCR: *norA*, *qepA*, *qnrC*, *qnrD*, *oqxA* e *oqxB* (129).

Buscamos mutações nas proteínas originárias dos genes codificadores da bomba de efluxo AcrAB-TolC (*acrA*, *acrB* e *tolC*) e reguladores dessas bombas de efluxo relacionados

à resistência a tigeciclina (*acrR*, *marA*, *marR*, *ramA*, *ramR*, *rarR*, *rob*, *rpsJ*, *soxR* e *soxS*) comparando as sequências das amostras sequenciadas com aquelas disponíveis no banco de dados originárias de amostras sensíveis, além de investigar a presença do gene *tetX*, também relacionada a resistência a esse antimicrobiano (155).

Foi realizada também busca de mutações em genes relacionados à resistência a fosfomicina: *glpT*, *murA* e *uhpT* em comparação com sequências de amostras de referência sensíveis, além de termos pesquisado a presença dos genes *fosA*, *fosA3*, *fosB*, *fosC2* e *fosX* também associados a resistência a esse antimicrobiano (144).

### **3.11.6 Análise dos genes relacionados à síntese das porinas**

Foi realizada avaliação dos genes codificadores das porinas OmpK35 e OmKp36 para pesquisa de mutações utilizando o *software* Geneious (v. 6.1.8). Comparamos as sequências encontradas nas amostras deste estudo com as sequências disponibilizadas no banco de dados.

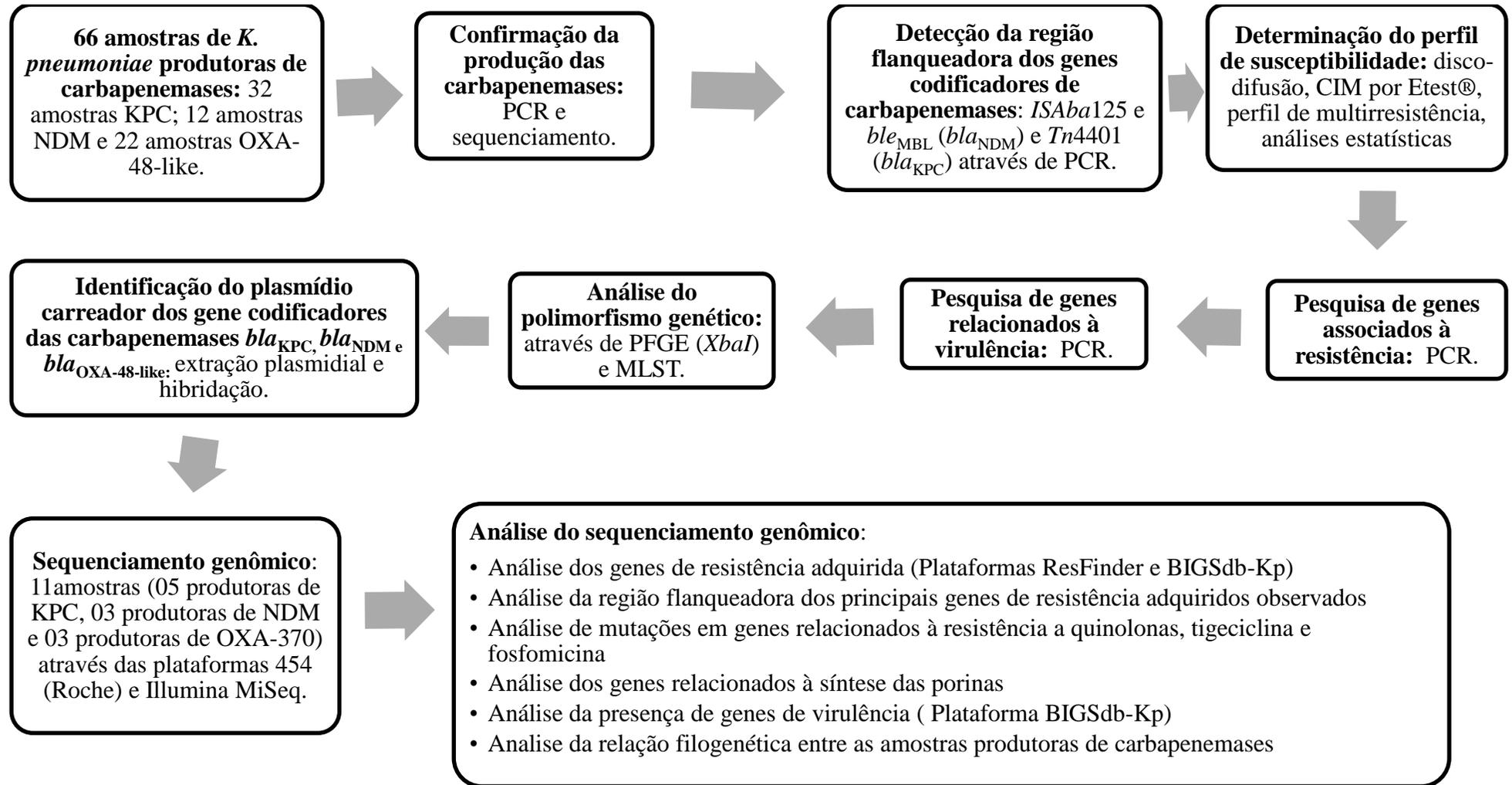
### **3.11.7 Análise da presença de genes de virulência**

Os *contigs* foram submetidos à comparação com o banco de dados do Instituto Pasteur BIGSdb-Kp (<http://bigsdB.web.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>) (177). Neste banco, estão depositados os seguintes genes de virulência: *rmpA* e *rmpA2* (reguladores do fenótipo mucóide); *kvgAS* (sistema de dois componentes, encontrados em amostras virulentas do CG43); o cluster *mrkABCDF* (codificante de fímbrias), *kfuABC* (relacionado ao transporte de erro); *allS* (cluster alantoína), *iucABCDiutA* (aerobactina); *ybt* (yersiniabactina); *mcc* (microcina E492) e *clb* (colibactina). Realizamos busca nos genomas também dos genes pesquisados através das reações de PCR que não estão incluídos no banco de dados (tópico 3.7).

### **3.11.8 Análise da relação filogenética entre as amostras produtoras de carbapenemases**

Realizamos análise filogenética utilizando o *software* disponível on-line CSI Phylogeny 1.1 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/CSIPhylogeny/>), que é uma plataforma que filtra, avalia e faz a validação dos SNP, inferindo filogenia, comparando-se com uma amostra de referência. É uma plataforma que foi desenvolvida para realização de análises filogenéticas utilizando genomas obtidos através de diferentes plataformas de sequenciamento genômico (204).

### 3.12 Fluxograma da metodologia



## 4. RESULTADOS

### 4.1 Amostras bacterianas

As 66 amostras incluídas no estudo foram confirmadas como pertencentes à espécie *K. pneumoniae* através dos testes bioquímicos realizados. Os materiais clínicos mais frequentes dentre essas amostras produtoras das carbapenemases KPC, NDM e OXA-48-like isoladas no período de 2010 a 2014 foram: swab retal (36,3%), sangue (26,8%,) e urina (17,9%). As amostras produtoras de KPC foram originárias de onze estados brasileiros e selecionadas a partir da dissertação de mestrado enquanto que as amostras produtoras de OXA-48-like e NDM foram provenientes do Rio de Janeiro (Tabela 4.1).

A confirmação da presença dos genes codificadores de carbapenemases previamente identificados pela equipe da rotina do laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar foi realizada através de PCR. Todas as amostras possuíram os genes codificadores de carbapenemases informados anteriormente ( $bla_{KPC}=32$ ,  $bla_{NDM}=12$ ,  $bla_{OXA-48-like}=22$ ).

A identificação da variante alélica dos genes  $bla_{KPC}$ ,  $bla_{NDM}$  e  $bla_{OXA-48-like}$  foi realizada através de sequenciamento do produto de PCR obtido de todas as 66 amostras incluídas no estudo. Todas as amostras positivas para KPC apresentaram a variante alélica  $bla_{KPC-2}$ , as amostras positivas para NDM apresentaram a variante alélica  $bla_{NDM-1}$  e as amostras positivas para OXA-48-like apresentaram a variante alélica  $bla_{OXA-370}$ .

**Tabela 4.1:** Espécimes clínicos e estados de origem das 66 amostras de *K. pneumoniae* produtores de carbapenemases.

Espécimes Clínicos	Número de amostras isoladas nos Estados – Regiões Geográficas											Total n(%)
	Norte e Nordeste					Sudeste e Sul				Centro- Oeste		
	AL	AM	CE	PE	MA	MG	ES	RJ	SC	DF	GO	
Catéter vascular					1 (KPC)			1 (KPC); 1 (NDM)	1 (KPC)	2 (KPC)		6 (8,9)
Líquidos abdominais							1 (KPC)					1 (1,4)
Liquor								1 (NDM)				1 (1,4)
Urina			1 (KPC)	1 (KPC)		2 (KPC)	1 (KPC)	1(KPC); 1 (OXA-48-like); 2 (NDM)		2 (KPC)	1 (KPC)	12 (17,9)
Sangue		1 (KPC)	2 (KPC)	3 (KPC)			1 (KPC)	1 (KPC); 4 (NDM)		5 (KPC)	1 (KPC)	18 (26,8)
Secreções do trato respiratório inferior								1 (OXA-48-like)		1 (KPC)	1 (KPC)	4 (5,9)
Swab retal								20 (OXA-48-like); 4 (NDM)				24 (36,3)
ND	1 (KPC)											1 (1,4)
<b>Total: n(%)</b>	1 (1,4)	1 (1,4)	3 (4,4)	4 (5,9)	1 (1,4)	2 (2,9)	3 (4,4)	37 (56,0)	1 (1,4)	10 (14,9)	3 (4,4)	66 (100)

## 4.2 Detecção das regiões flanqueadoras dos genes codificadores de carbapenemases (*bla*<sub>KPC-2</sub> e *bla*<sub>NDM-1</sub>)

A pesquisa do ambiente genético onde os genes *bla*<sub>KPC-2</sub> e *bla*<sub>NDM-2</sub> estão inseridos foi realizada nas 32 amostras positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub> e nas 12 amostras positivas para *bla*<sub>NDM-1</sub> incluídas no estudo. Em todas as amostras foi possível amplificar as sequências *tnpA* e *ISKpn6*, caracterizando a estrutura parcial do transposon Tn4401. Em nenhuma das amostras obtivemos amplificação das sequências invertidas repetitivas IR. Em 84,3% (27/32) das amostras foi possível obter amplificação por PCR da região da sequência de inserção *ISKpn7* (703 pb) que caracteriza a isoforma b deste transposon.

Em relação ao gene *bla*<sub>NDM-1</sub>, todas as amostras amplificaram uma região de 1567pb correspondente à sequência de inserção *ISAbal25*, ao gene *bla*<sub>NDM-1</sub> e ao gene *ble*<sub>MBL</sub> (relacionado a resistência a bleomicina). Assim, em todas as amostras foi possível observar a associação dessa carbapenemase com o ambiente genético descrito na literatura.

## 4.3 Determinação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

### 4.3.1 Difusão em ágar

Classificamos como resistentes as amostras classificadas como intermediárias e resistentes nos testes aplicados. Através do teste de difusão em ágar, foram observados altos percentuais de resistência aos antimicrobianos testados de acordo com os critérios do CLSI 2015 (Tabela 4.2).

Em relação ao perfil de resistência global de todas as amostras incluídas no estudo (n=66), observamos alta resistência aos beta-lactâmicos testados [cefotaxima (98,4%), cefepime (96,9%), ceftazidima (95,4%), piperacilina/tazobactam (100%)]. O menor percentual de resistência observado foi a fosfomicina/trometamol (22,7%). 93,9% das amostras foram resistentes a ciprofloxacina e 87,8% a sulfametoxazole/trimetoprima. Em relação aos aminoglicosídeos testados, 63,6% das amostras foi resistente a gentamicina e 68,1% a ampicacina.

As amostras positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub> (n=32) foram 100% resistentes a piperacilina/tazobactam e mais de 90% das amostras foram resistentes a cefotaxima, cefepime, ceftazidima. Em relação às outras classes de antimicrobianos, 96% foram

resistentes à ciprofloxacina, 84% à sulfametoxazole/trimetoprima, 65,2% à gentamicina e amicacina; e 21% à fosfomicina/trometamol.

Se tratando das amostras positivas para *bla*<sub>NDM-1</sub> (n=12), observamos 100% de resistência a todos os beta-lactâmicos testados. Em relação aos aminoglicosídeos, observamos 75% de resistência à gentamicina e 25% a amicacina. 75% das amostras foram resistentes a sulfametoxazole/trimetoprima e a ciprofloxacina, e 8,3% resistentes a fosfomicina/trometamol.

Dentre as amostras positivas para *bla*<sub>OXA-370</sub> (n=22), observamos 100% de resistência a todos os beta-lactâmicos testados. Observamos também 100% de resistência a ciprofloxacina, sulfametoxazole/trimetoprima, enquanto 95,5% foram resistentes a amicacina, 54% gentamicina e 31% a fosfomicina/trometamol.

Através da análise estatística, observamos que em relação à amicacina, os diferentes percentuais de resistência observados (amostras positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub> = 65,2%; *bla*<sub>NDM-1</sub>=25%; *bla*<sub>OXA-370</sub>=95,5%) foram estatisticamente significativos entre os grupos [*bla*<sub>KPC-2</sub> e *bla*<sub>NDM-1</sub> (p= 0,0151); *bla*<sub>NDM-1</sub> e *bla*<sub>OXA-370</sub> (p= 0,000016) e *bla*<sub>KPC-2</sub> e *bla*<sub>OXA-370</sub> (p= 0,009579)]. Em relação à ciprofloxacina, os percentuais observados também foram relevantes [*bla*<sub>KPC</sub> e *bla*<sub>NDM-1</sub> (p= 0,0245) e *bla*<sub>NDM-1</sub> e *bla*<sub>OXA-370</sub> (p=0,03676)]. Já, frente à sulfametoxazole/trimetoprima, observamos diferença significativa entre as amostras positivas para *bla*<sub>NDM-1</sub> e *bla*<sub>OXA-370</sub> (p= 0,0368).

#### **4.3.2 Determinação da concentração inibitória mínima frente à carbapenemas, tigeciclina e polimixina B**

A determinação da concentração inibitória mínima através de Etest mostrou altos níveis de resistência aos carbapenemas de acordo com os critérios estabelecidos pelo CLSI 2015 e resistência variável a polimixina B e tigeciclina de acordo com os critérios da Nota Técnica N°01/2013 da ANVISA entre as amostras produtoras de carbapenemases (Tabela 4.2).

Dentre todas as amostras produtoras de carbapenemases os percentuais de resistência foram: 98,5% para meropenem; 96,9% para imipenem; 68,1% para tigeciclina; e 6,0% para polimixina B. As CIM<sub>50</sub> foram para estes antimicrobianos foram respectivamente: 16.0 µg/ml; 24 µg/ml; 1.5 µg/ml; 0.75 µg/ml.

Dentre as amostras positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub>, observamos 96,8% de amostras resistentes a imipenem e meropenem, com CIM<sub>50</sub> de  $\geq 32.0$   $\mu\text{g/ml}$  para todos os carbapenemas. Para tigeciclina, 62,5% foram resistentes com CIM<sub>50</sub> = 1.5  $\mu\text{g/ml}$ . Frente à polimixina B, 3,1% foram resistentes com CIM<sub>50</sub> = 0.75  $\mu\text{g/ml}$ .

Nas amostras positivas para *bla*<sub>NDM-1</sub>, observamos 100% resistentes a imipenem e meropenem (CIM<sub>50</sub> = 32 $\mu\text{g/ml}$  para meropenem e 24.0  $\mu\text{g/ml}$  para imipenem). 8,3% das amostras foram resistentes a polimixina B (CIM<sub>50</sub> = 0.5  $\mu\text{g/ml}$ ) e 33,3% resistentes a tigeciclina (CIM<sub>50</sub> = 1.0  $\mu\text{g/ml}$ ).

Dentre as amostras positivas para *bla*<sub>OXA-370</sub>, observamos 100% de amostras resistentes a meropenem e 95,4% resistentes a imipenem. A CIM<sub>50</sub> foi 2.0  $\mu\text{g/ml}$  para imipenem e 6.0  $\mu\text{g/ml}$  para meropenem. 95,4% das amostras foram resistentes a tigeciclina (CIM<sub>50</sub> = 1.5  $\mu\text{g/ml}$ ) e 9,0% resistentes a polimixina B (CIM<sub>50</sub> = 1.5  $\mu\text{g/ml}$ ).

Através da análise estatística, observamos que o maior percentual de resistência a tigeciclina das amostras positivas para *bla*<sub>OXA-370</sub> foi estatisticamente significativo quando comparado com as amostras positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub> e *bla*<sub>NDM-1</sub> [*bla*<sub>NDM-1</sub> e *bla*<sub>OXA-370</sub> (p= 0,0002); *bla*<sub>KPC-2</sub> e *bla*<sub>OXA-370</sub> (p= 0,00530)].

Em relação à comparação da variação das CIM, observamos que as amostras positivas para *bla*<sub>OXA-370</sub> obtiveram menores concentrações inibitórias mínimas frente à meropenem e imipenem quando comparadas às amostras positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub> e *bla*<sub>NDM-1</sub> [para meropenem: *bla*<sub>NDM-1</sub> e *bla*<sub>OXA-370</sub> (p=0,046), *bla*<sub>KPC-2</sub> e *bla*<sub>OXA-370</sub> (p=0,0001); para imipenem: *bla*<sub>NDM-1</sub> e *bla*<sub>OXA-370</sub> (p=0,0234), *bla*<sub>KPC-2</sub> e *bla*<sub>OXA-370</sub> (p=0,0001)].

**Tabela 4.2:** Susceptibilidade aos antimicrobianos das amostras de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases através do método de difusão em ágar e concentração inibitória mínima através do Etest.

Perfil de resist.	Difusão em Ágar									Concentração Inibitória Mínima (Etest)											
	Resistência* - N(%)									Meropenem			Imipenem			Tigeciclina			Polimixina B		
	CTX	FEP	CAZ	PTZ	GEN	AK	CIP	SXT	FOT	R N(%)	CIM <sub>50</sub>	Var.	R N(%)	CIM <sub>50</sub>	Var.	R N(%)	CIM <sub>50</sub>	Var.	NS N(%)	CIM <sub>50</sub>	Var.
Produção de KPC-2	31 (96,9)	30 (93,8)	29 (90,6)	32 (100,0)	21 (65,2)	<b>21<sup>a</sup></b> <b>(65,2)</b>	<b>31<sup>b</sup></b> <b>(96,9)</b>	27 (84,4)	7 (21,9)	31 (96,8)	32,0	<b>0.50 - 32,0<sup>d</sup></b>	31 (96,8)	32,0	<b>1,0 - 32,0<sup>e</sup></b>	<b>20<sup>f</sup></b> <b>(62,5)</b>	1,5	0,50 - 12,0	1 (3,1)	0,75	0,25 - 16,0
Produção de NDM-1	12 (100,0)	12 (100,0)	12 (100,0)	12 (100,0)	9 (75,0)	<b>3<sup>a</sup></b> <b>(25,0)</b>	<b>9<sup>b</sup></b> <b>(75,0)</b>	<b>9<sup>c</sup></b> <b>(75,0)</b>	1 (8,3)	12 (100,0)	32,0	<b>0.50 - 32,0<sup>d</sup></b>	12 (100,0)	24,0	<b>1,0 - 32,0<sup>e</sup></b>	<b>4<sup>f</sup></b> <b>(33,3)</b>	1,0	0,38 - 8,0	1 (8,3)	0,5	0,38 - 3,0
Produção de OXA-370	22 (100,0)	22 (100,0)	22 (100,0)	22 (100,0)	12 (54,5)	<b>21<sup>a</sup></b> <b>(95,5)</b>	<b>22<sup>b</sup></b> <b>(100,0)</b>	<b>22<sup>c</sup></b> <b>(100,0)</b>	7 (31,8)	22 (100,0)	6,0	<b>1,5 - 32,0<sup>d</sup></b>	21 (95,4)	2,0	<b>0,75 - 32,0<sup>e</sup></b>	<b>21<sup>f</sup></b> <b>(95,4)</b>	1,5	1,0 - 8,0	2 (9,0)	1,5	0,50 - 4,0
TOTAL	65 (98,4)	64 (96,9)	63 (95,4)	66 (100,0)	42 (63,6)	45 (68,1)	62 (93,9)	58 (87,8)	15 (22,7)	65 (98,4)	16,0	0,5 - 32,0	64 (96,9)	24,0	0,75 - 32,0	45 (68,1)	1,5	0,38 - 12,0	6 (6,0)	0,75	0,25 - 16

Legenda: CTX: cefotaxima; FEP: cefepime; CAZ: ceftazidima; PTZ: piperacilina/tazobactam; GEN: gentamicina; AK: amicacina; CIP: ciprofloxacina; SXT: sulfametoxazole/trimetoprima; FOT: fosfomicina/trometamol; R: resistência; CIM: concentração inibitória mínima; Var.: variação da concentração inibitória mínima; \*: classificamos como resistentes as amostras classificadas como intermediárias e resistentes nos testes.

**Para nível de significância de 95%:**

<sup>a</sup> Diferença estatisticamente significativa entre amostras positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub> e *bla*<sub>NDM-1</sub> (p= 0,0151); *bla*<sub>NDM-1</sub> e *bla*<sub>OXA-370</sub> (p= 0,000016) e *bla*<sub>KPC-2</sub> e *bla*<sub>OXA-370</sub> (p= 0,009579).

<sup>b</sup> Diferença estatisticamente significativa entre amostras positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub> e *bla*<sub>NDM-1</sub> (p= 0,0245) e *bla*<sub>NDM-1</sub> e *bla*<sub>OXA-370</sub> (p=0,03676).

<sup>c</sup> Diferença estatisticamente significativa entre amostras positivas para *bla*<sub>NDM-1</sub> e *bla*<sub>OXA-370</sub> (p= 0,0368).

<sup>d</sup> Diferença estatisticamente significativa entre amostras positivas para *bla*<sub>NDM-1</sub> e *bla*<sub>OXA-370</sub> (p=0,046) e *bla*<sub>KPC-2</sub> e *bla*<sub>OXA-370</sub> (p=0,0001).

<sup>e</sup> Diferença estatisticamente significativa entre amostras positivas para *bla*<sub>NDM-1</sub> e *bla*<sub>OXA-370</sub> (p=0,0234) e *bla*<sub>KPC-2</sub> e *bla*<sub>OXA-370</sub> (p=0,0001).

<sup>f</sup> Diferença estatisticamente significativa entre amostras positivas para *bla*<sub>NDM-1</sub> e *bla*<sub>OXA-370</sub> (p= 0,0002) e *bla*<sub>KPC-2</sub> e *bla*<sub>OXA-370</sub> (p= 0,0053).

### 4.3.3 Análise de perfil de multirresistência

Realizamos a análise do perfil de multirresistência de acordo com os critérios estabelecidos por Magiorakos et al, 2012 (185), conforme descrito na metodologia (tópico 3.5.3). Os antimicrobianos testados foram categorizados em nove classes. Neste critério, a amostra é considerada multirresistente quando apresenta resistência a três categorias de antimicrobianos.

Observamos ao todo 14 perfis distintos de multirresistência sendo todas as amostras incluídas neste trabalho consideradas multirresistentes. Uma amostra positiva para *bla*<sub>NDM-1</sub> foi resistente a somente três categorias enquanto nove amostras (sete positivas para *bla*<sub>OXA-370</sub> e duas para *bla*<sub>KPC-2</sub>) foram resistentes a oito das nove classes de antimicrobianos testadas, sendo sensível somente a polimixina B. Três amostras (uma positiva para *bla*<sub>KPC-2</sub> e duas positivas para *bla*<sub>OXA-370</sub>) foram resistentes também a oito classes, sendo sensíveis somente a fosfomicina. Observamos também que todas as amostras resistentes a polimixina B foram sensíveis a fosfomicina/trometamol.

O perfil de multirresistência mais encontrado entre todas as amostras produtoras de carbapenemases foi à resistência a todas as classes, com exceção de polimixina B e fosfomicina, sendo responsável por 43,9%. Este perfil foi mais frequente também entre as amostras positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub> e *bla*<sub>OXA-370</sub> (43,8% e 54,5% respectivamente). Entre as amostras positivas para *bla*<sub>NDM-1</sub>, o perfil mais encontrado foi a resistência a todas as classes, com exceção da polimixina B, tigeciclina e fosfomicina (n=6, 50%). Os perfis de multirresistência observados estão disponibilizados na Tabela 4.3.

**Tabela 4.3:** Perfis de multirresistência aos antimicrobianos observados nas amostras de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases segundo o critério de Magiorakos e colaboradores (2012) (185).

Nº classes apresentando resistência	Antimicrobianos									N (%) amostras positivas para <i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	N (%) amostras positivas para <i>bla</i> <sub>OXA-370</sub>	N (%) amostras positivas para <i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	N (%) total amostras
	Beta-lactâmicos (03 classes)			Demais classes (06 classes)									
	Cef. amplo espectro	Carbapen.	Penic. + Inib. beta-lactamase	Aminoglic.	Inibidor da via de síntese do folato	Quinol.	Glicilc.	Poli. B	Ac. Fosfônico				
CTX/CAZ/FEP	MEM / IMP	PTZ	AK/GN	SXT	CIP	TIG	PB	FOT					
8	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	S	NS	2 (6,3)	7 (31,8)	-	9 (13,6)
8	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	S	1 (3,1)	2 (9,1)		3 (4,5)
7	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	S	S	14 (43,8)	12 (54,5)	3 (25,0)	29 (43,9)
7	NS	NS	NS	NS	NS	NS	S	S	NS	1 (3,1)	-	-	1 (1,5)
7	S	NS	NS	NS	NS	NS	NS	S	NS	1 (3,1)	-	-	1 (1,5)
7	NS	NS	NS	S	NS	NS	NS	S	NS	1 (3,1)	-	-	1 (1,5)
6	NS	NS	NS	NS	NS	NS	S	S	S	6 (18,8)	1 (4,5)	6 (50,0)	13 (19,6)
5	NS	NS	NS	NS	S	NS	S	S	S	2 (6,3)	-	-	2 (3,0)
5	NS	NS	NS	S	NS	NS	S	S	S	1 (3,1)	-	-	1 (1,5)
5	NS	NS	NS	S	S	NS	NS	S	S	1 (3,1)	-	-	1 (1,5)
5	NS	NS	NS	S	S	NS	S	S	NS	1 (3,1)	-	-	1 (1,5)
5	NS	NS	NS	S	S	S	NS	NS	S	-	-	1 (8,3)	1 (1,5)
4	NS	NS	NS	S	S	S	S	S	NS	1 (3,1)	-	1 (8,3)	2 (3,0)
3	NS	NS	NS	S	S	S	S	S	S	-	-	1 (0,0)	1 (1,5)

Legenda: CTX: cefotaxima; FEP: cefepime; CAZ: ceftazidima; PTZ: piperacilina/tazobactam; GEN: gentamicina; AK: amicacina; CIP: ciprofloxacina; SXT: sulfametoxazole/trimetoprima; FOT: fosfomicina/trometamol; PB: polimixina B; TIG: tigeciclina; NS: Não suscetível; S: sensível.

#### 4.4 Detecção dos genes codificadores de beta-lactamases

Dentre todas as amostras incluídas no estudo, observamos altos percentuais de positividade para os genes *bla*<sub>CTX-M</sub> (n= 51; 77,2%), *bla*<sub>SHV</sub> (n=63; 95,4%), *bla*<sub>TEM</sub> (n= 59; 89,5%).

O gene *bla*<sub>SHV</sub> foi encontrado em mais de 91% das amostras produtoras de carbapenemases. O gene *bla*<sub>TEM</sub> foi encontrado em todas as amostras positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub> e *bla*<sub>NDM-1</sub> tendo sido observado em 68,1% (n=15) das amostras positivas para *bla*<sub>OXA-370</sub>. Assim, observamos um valor de p significativo na comparação da detecção de *bla*<sub>TEM</sub> nas amostras positivas para *bla*<sub>OXA-370</sub> quando comparamos com as amostras positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub> e *bla*<sub>NDM-1</sub> (p=0,00062 e p=0,0317 respectivamente).

As amostras positivas para *bla*<sub>OXA-370</sub> tiveram também o maior percentual de positividade para *bla*<sub>CTX-M</sub> (n=20; 90,9%) e *bla*<sub>SHV</sub> (n=22; 100%). As amostras positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub> e *bla*<sub>NDM-1</sub> apresentaram os seguintes percentuais de positividade respectivamente: *bla*<sub>CTX-M</sub> (n=22; 68,7%) e *bla*<sub>SHV</sub> (n=30; 93,7%); *bla*<sub>CTX-M</sub> (n=9; 75%) e *bla*<sub>SHV</sub> (n=11; 91,6%) (Tabela 4.4).

**Tabela 4.4:** Percentual de detecção de genes codificadores das beta-lactamases *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> e *bla*<sub>TEM</sub> nas amostras produtoras de carbapenemases do tipo KPC, NDM e OXA-370.

Beta-lactamases	Fenótipo de resistência aos carbapenemases			Total amostras produtoras de carbapenemase (n=66)
	Amostras positivas para <i>bla</i> <sub>KPC-2</sub> (n=32)	Amostras positivas para <i>bla</i> <sub>NDM-1</sub> (n=12)	Amostras positivas para <i>bla</i> <sub>OXA-370</sub> (n=22)	
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> (%)	22 (68,7%)	9 (75%)	20 (90,9%)	51 (77,2%)
<i>bla</i> <sub>SHV</sub> (%)	30 (93,7%)	11 (91,6%)	22 (100%)	63 (95,4%)
<i>bla</i> <sub>TEM</sub> (%)	<b>32 (100%)<sup>a</sup></b>	<b>12 (100%)<sup>a</sup></b>	<b>15 (68,1%)<sup>a</sup></b>	59 (89,5%)

**Para nível de significância de 95%:**

<sup>a</sup> Diferença estatisticamente significativa entre amostras positivas para *bla*<sub>NDM-1</sub> e *bla*<sub>OXA-370</sub> (p= 0,0317); *bla*<sub>KPC-2</sub> e *bla*<sub>OXA-370</sub> (p=0,00062).

Observamos associação de genes codificadores de beta-lactamases em todas as amostras sendo a associação de *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub> e *bla*<sub>TEM</sub> a mais encontrada, presente em 66,6% das amostras, seguida da presença de *bla*<sub>SHV</sub> e *bla*<sub>TEM</sub> presente em 17,9% das amostras (Tabela 4.5).

**Tabela 4.5:** Perfil de detecção das beta-lactamases *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> e *bla*<sub>TEM</sub> nas amostras produtoras de carbapenemases do tipo KPC, NDM e OXA-370.

Perfil de detecção de beta-lactamases	Fenótipo de resistência aos carbapenemas			Total amostras produtoras de carbapenemase (n=66)
	Amostras positivas para <i>bla</i> <sub>KPC-2</sub> (n=32)	Amostras positivas para <i>bla</i> <sub>NDM-1</sub> (n=12)	Amostras positivas para <i>bla</i> <sub>OXA-370</sub> (n=22)	
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> (+), <i>bla</i> <sub>SHV</sub> (+), <i>bla</i> <sub>TEM</sub> (+)	21 (65,6%)	9 (75%)	14 (63,6%)	44 (66,6%)
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> (+), <i>bla</i> <sub>SHV</sub> (+), <i>bla</i> <sub>TEM</sub> (-)	-	-	6 (27,2%)	6 (8,9%)
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> (+), <i>bla</i> <sub>SHV</sub> (-), <i>bla</i> <sub>TEM</sub> (+)	1 (3,2%)	-	-	1 (1,4%)
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> (-), <i>bla</i> <sub>SHV</sub> (+), <i>bla</i> <sub>TEM</sub> (+)	9 (28,1%)	2 (16,6%)	1 (4,5%)	12 (17,9%)
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> (-), <i>bla</i> <sub>SHV</sub> (+), <i>bla</i> <sub>TEM</sub> (-)	-	-	1 (4,5%)	1 (1,4%)
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> (-), <i>bla</i> <sub>SHV</sub> (-), <i>bla</i> <sub>TEM</sub> (+)	1 (3,2%)	1 (8,3%)	-	2 (2,9%)

#### 4.5 Detecção dos genes codificadores de resistência a aminoglicosídeos

Dentre os genes codificadores de metilases, somente um foi encontrado: o gene *rmtB* foi detectado na amostra CCBH14393 positiva para *bla*<sub>OXA-370</sub>. Em relação aos genes codificadores de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, o gene *aadB* não foi observado em nenhuma amostra. A presença do gene *aadA* foi mais frequente nas amostras positivas para *bla*<sub>NDM-1</sub> quando comparadas às amostras positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub> (p= 0,018) e *bla*<sub>OXA-370</sub> (p= 0,0003).

O gene *aac(6')-Ib* foi o mais encontrado nas amostras positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub> (93,75%) e nas amostras positivas para *bla*<sub>OXA-370</sub> (100%), enquanto que o *aac(3')-IIa* foi o mais observado entre as amostras positivas para *bla*<sub>NDM-1</sub> (91,6%). A detecção de *aac(3')-IIa* foi significativamente menor nas amostras positivas para *bla*<sub>OXA-370</sub> em relação às demais [*bla*<sub>NDM-1</sub> e *bla*<sub>OXA-370</sub> (p= 0,00001) e *bla*<sub>KPC-2</sub> e *bla*<sub>OXA-370</sub> (p= 0,000066)] (Tabela 4.6).

**Tabela 4.6:** Percentual de detecção de genes relacionados a resistência a aminoglicosídeos *aac(3')-IIa*, *aadA* e *aac(6')-Ib* nas amostras produtoras de carbapenemases do tipo KPC, NDM e OXA-370.

Resistência a aminoglicosídeos	Fenótipo de resistência aos carbapenemases			Total amostras produtoras de carbapenemase (n=66)
	Amostras positivas para <i>bla</i> <sub>KPC-2</sub> (n=32)	Amostras positivas para <i>bla</i> <sub>NDM-1</sub> (n=12)	Amostras positivas para <i>bla</i> <sub>OXA-370</sub> (n=22)	
<i>aadA</i>	14 (43,7%) <sup>a</sup>	10 (83,3%) <sup>a</sup>	4 (18,1%) <sup>a</sup>	28 (42,4%)
<i>aac(3')-IIa</i>	22 (68,7%) <sup>b</sup>	11 (91,6%) <sup>b</sup>	3 (13,6%) <sup>b</sup>	36 (54,5%)
<i>aac(6')-Ib</i>	30 (93,75%)	10 (83,3%)	22 (100%)	62 (93,9%)

**Para nível de significância de 95%:**

<sup>a</sup> Diferença estatisticamente significativa entre amostras positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub> e *bla*<sub>NDM-1</sub> (p= 0,018); *bla*<sub>NDM-1</sub> e *bla*<sub>OXA-370</sub> (p=0,0003).

<sup>b</sup> Diferença estatisticamente significativa entre amostras positivas para *bla*<sub>NDM-1</sub> e *bla*<sub>OXA-370</sub> (p= 0,00001) e *bla*<sub>KPC-2</sub> e *bla*<sub>OXA-370</sub> (p= 0,000066).

Observamos associação de genes codificadores de aminoglicosídeos em todas as amostras, sendo a associação de todas as enzimas a mais observada (30,3% das amostras), seguida da presença de apenas *aac(6')-Ib* em 34,3% das amostras (Tabela 4.7).

**Tabela 4.7:** Perfil de detecção de genes relacionados a resistência a aminoglicosídeos *aac(3')-IIa*, *aadA*, *aac(6')-Ib* e *rmtB* nas amostras produtoras de carbapenemases do tipo KPC, NDM e OXA-370.

Perfil de detecção de genes de resistência a aminoglicosídeos	Fenótipo de resistência aos carbapenemases			Total amostras produtoras de carbapenemase (n=66)
	Amostras positivas para <i>bla</i> <sub>KPC-2</sub> (n=32)	Amostras positivas para <i>bla</i> <sub>NDM-1</sub> (n=13)	Amostras positivas para <i>bla</i> <sub>OXA-370</sub> (n=22)	
<i>aadA</i> (+), <i>aac(3')-IIa</i> (+), <i>aac(6')-Ib</i> (+), <i>rmtB</i> (-)	10 (31,2%)	9 (75%)	1 (4,5%)	20 (30,3%)
<i>aadA</i> (+), <i>aac(3')-IIa</i> (+), <i>aac(6')-Ib</i> (-), <i>rmtB</i> (-)	1 (3,1%)	-	-	1 (1,5%)
<i>aadA</i> (+), <i>aac(3')-IIa</i> (-), <i>aac(6')-Ib</i> (+), <i>rmtB</i> (-)	3 (9,3%)	-	3 (13,6%)	6 (9,0%)
<i>aadA</i> (+), <i>aac(3')-IIa</i> (-), <i>aac(6')-Ib</i> (-), <i>rmtB</i> (-)	-	1 (7,6%)	-	1 (1,5%)
<i>aadA</i> (-), <i>aac(3')-IIa</i> (+), <i>aac(6')-Ib</i> (+), <i>rmtB</i> (-)	10 (31,2%)	1 (7,6%)	1 (4,5%)	12 (18,1%)
<i>aadA</i> (-), <i>aac(3')-IIa</i> (+), <i>aac(6')-Ib</i> (+), <i>rmtB</i> (+)	-	-	1 (4,5%)	1 (1,5%)
<i>aadA</i> (-), <i>aac(3')-IIa</i> (+), <i>aac(6')-Ib</i> (-), <i>rmtB</i> (-)	1 (3,1%)	1 (7,6%)	-	2 (3,0%)
<i>aadA</i> (-), <i>aac(3')-IIa</i> (-), <i>aac(6')-Ib</i> (+), <i>rmtB</i> (-)	7 (21,8%)	-	16 (72,7%)	23 (34,3%)

#### 4.6 Detecção dos genes codificadores de resistência a quinolonas

Os três genes de resistência a quinolonas pesquisados foram encontrados entre as amostras testadas, sendo os percentuais observados: 56,0% para *qnrB* (n=37); 53,0% para *qnrS* (n=35) e 17,9% para *qnrA* (n=12).

Dentre as amostras positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub>, observamos a detecção de *qnrB* em 93,7%, *qnrS* em 78,1% e *qnrA* em 15,6% das amostras. Dentre as amostras positivas para *bla*<sub>NDM-1</sub>, observamos variáveis percentuais de detecção desses genes, com maior positividade para o gene *qnrS* (66,6%). Nenhuma amostra positiva para *bla*<sub>OXA-370</sub> foi positiva também para *qnrB*.

Através do teste estatístico, observamos que a presença do gene *qnrB* foi significativamente maior nas amostras positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub> quando comparadas com as amostras positivas para *bla*<sub>NDM-1</sub> (p= 0,00422905) e *bla*<sub>OXA-370</sub> (p= 0,00000000001), enquanto que o gene *qnrS* foi significativamente menos encontrado nas amostras positivas para *bla*<sub>OXA-370</sub> que as demais [*bla*<sub>NDM-1</sub> e *bla*<sub>OXA-370</sub> (p= 0,0009094) e *bla*<sub>KPC-2</sub> e *bla*<sub>OXA-370</sub> (p= 0,00000061)] (Tabela 4.8).

**Tabela 4.8:** Percentual de detecção de genes relacionados a resistência a quinolonas *qnrA*, *qnrB* e *qnrS* nas amostras produtoras de carbapenemases do tipo KPC, NDM e OXA-370.

Resistência a quinolonas	Fenótipo de resistência aos carbapenemases			Total amostras produtoras de carbapenemase (n=66)
	Amostras positivas para <i>bla</i> <sub>KPC-2</sub> (n=32)	Amostras positivas para <i>bla</i> <sub>NDM-1</sub> (n=12)	Amostras positivas para <i>bla</i> <sub>OXA-370</sub> (n=22)	
<i>qnrA</i> (%)	5 (15,6%)	5 (38,4%)	2 (9,0%)	12 (17,9%)
<i>qnrB</i> (%)	<b>30 (93,7%)<sup>a</sup></b>	<b>7 (58,3%)<sup>a</sup></b>	<b>- (0%)<sup>a</sup></b>	37 (56,0%)
<i>qnrS</i> (%)	<b>25 (78,1%)<sup>b</sup></b>	<b>8 (66,6%)<sup>b</sup></b>	<b>2 (9,0%)<sup>b</sup></b>	35 (53,0%)

**Para nível de significância de 95%:**

<sup>a</sup> Diferença estatisticamente significativa entre amostras positivas para de *bla*<sub>KPC-2</sub> e *bla*<sub>NDM-1</sub> (p= 0,00422905); *bla*<sub>NDM-1</sub> e *bla*<sub>OXA-370</sub> (p=0,0001472) e *bla*<sub>KPC-2</sub> e *bla*<sub>OXA-370</sub> (p= 0,00000000001).

<sup>b</sup> Diferença estatisticamente significativa entre amostras positivas para *bla*<sub>NDM-1</sub> e *bla*<sub>OXA-370</sub> (p= 0,0009094) e *bla*<sub>KPC-2</sub> e *bla*<sub>OXA-370</sub> (p= 0,00000061).

Observamos associação de genes codificadores de resistência a quinolonas em 49 amostras (74,2%), sendo a associação de *qnrB* e *qnrS* a mais encontrada, presente em 36,3% das amostras. Em 19 amostras (37,3%) não foi detectado nenhum dos genes *qnr* pesquisados (Tabela 4.9).

**Tabela 4.9:** Perfil de detecção de genes relacionados a resistência a quinolonas *qnrA*, *qnrB* e *qnrS* nas amostras produtoras de carbapenemases do tipo KPC, NDM e OXA-370.

Perfil de detecção de genes de resistência a quinolonas	Fenótipo de resistência aos carbapenemas			Total amostras produtoras de carbapenemase (n=66)
	Amostras positivas para <i>bla</i> <sub>KPC-2</sub> (n=32)	Amostras positivas para <i>bla</i> <sub>NDM-1</sub> (n=12)	Amostras positivas para <i>bla</i> <sub>OXA-370</sub> (n=22)	
<i>qnrA</i> (+), <i>qnrB</i> (+), <i>qnrS</i> (+)	4 (12,5%)	2 (16,6%)	-	6 (9,0%)
<i>qnrA</i> (+), <i>qnrB</i> (-), <i>qnrS</i> (+)	-	1 (8,3%)	-	1 (1,5%)
<i>qnrA</i> (+), <i>qnrB</i> (-), <i>qnrS</i> (-)	1 (3,2%)	2 (16,6%)	2 (9,0%)	5 (7,5%)
<i>qnrA</i> (-), <i>qnrB</i> (+), <i>qnrS</i> (+)	21 (65,6%)	3 (25%)	-	24 (36,3%)
<i>qnrA</i> (-), <i>qnrB</i> (+), <i>qnrS</i> (-)	5 (15,6%)	2 (16,6%)	-	7 (10,6%)
<i>qnrA</i> (-), <i>qnrB</i> (-), <i>qnrS</i> (+)	-	2 (16,6%)	2 (9,0%)	4 (6,0%)
<i>qnrA</i> (-), <i>qnrB</i> (-), <i>qnrS</i> (-)	1 (3,2%)	-	18 (81,8%)	19 (28,7%)

#### 4.7 Detecção dos genes relacionados à virulência

Os genes *entB*, *fimH* e *ycfM* foram detectados em todas amostras estudadas, já os genes *cf29a*, *IroN* e *magA* não foram encontrados. Os demais genes foram descritos em percentuais variáveis (Tabela 4.10).

Observamos diferenças estatísticas significativas em relação à detecção dos genes *kfu* e *ybtS*. O gene *kfu* foi mais observado nas amostras positivas para *bla*<sub>NDM-1</sub> quando comparadas às demais amostras [*bla*<sub>KPC-2</sub> e *bla*<sub>NDM-1</sub> (p= 0,00032688); *bla*<sub>NDM-1</sub> e *bla*<sub>OXA-370</sub> (p= 0,0002118)]. Em relação ao gene *ybtS*, este foi mais encontrado nas amostras positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub> quando comparamos com as amostras positivas para *bla*<sub>OXA-370</sub> (p=0,00019).

**Tabela 4.10:** Percentual de detecção de genes relacionados à virulência nas amostras produtoras de carbapenemases do tipo KPC, NDM e OXA-370.

Genes de virulência	Fenótipo de resistência aos carbapenemas			Total amostras produtoras de carbapenemase (n=66)	
	Amostras positivas para <i>bla</i> <sub>KPC-2</sub> (n=32)	Amostras positivas para <i>bla</i> <sub>NDM-1</sub> (n=12)	Amostras positivas para <i>bla</i> <sub>OXA-370</sub> (n=22)		
Produção de fímbrias e adesinas	<i>mrkD</i>	30 (93,7%)	12 (100%)	22 (100%)	64 (96,9%)
	<i>cf29a</i>	- (0%)	- (0%)	- (0%)	- (0%)
	<i>fimH</i>	32 (100%)	12 (100%)	22 (100%)	66 (100%)
	<i>ycfM</i>	32 (100%)	12 (100%)	22 (100%)	66 (100%)
Transporte de ferro e sideróforos	<i>kfu</i>	<b>4 (12,5%)<sup>a</sup></b>	<b>8 (66,6%)<sup>a</sup></b>	<b>1 (4,5%)<sup>a</sup></b>	13 (19,6%)
	<i>IroN</i>	- (0%)	- (0%)	- (0%)	- (0%)
	<i>ybtS</i>	<b>17 (53,2%)<sup>b</sup></b>	2 (16,6%)	<b>1 (4,5%)<sup>b</sup></b>	20 (30,3%)
	<i>entB</i>	32 (100%)	12 (100%)	22 (100%)	66 (100%)
Fenótipo mucoso	<i>magA</i>	- (0%)	- (0%)	- (0%)	- (0%)
Metabolismo da alantoína	<i>allS</i>	2 (6,25%)	1 (8,3%)	- (0%)	3 (4,4%)

**Para nível de significância de 95%:**

<sup>a</sup> Diferença estatisticamente significativa entre amostras positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub> e *bla*<sub>OXA-370</sub> (p= 0,00032); *bla*<sub>NDM-1</sub> e *bla*<sub>OXA-370</sub> (p= 0,00021).

<sup>b</sup> Diferença estatisticamente significativa entre amostras positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub> e *bla*<sub>OXA-370</sub> (p=0,00019).

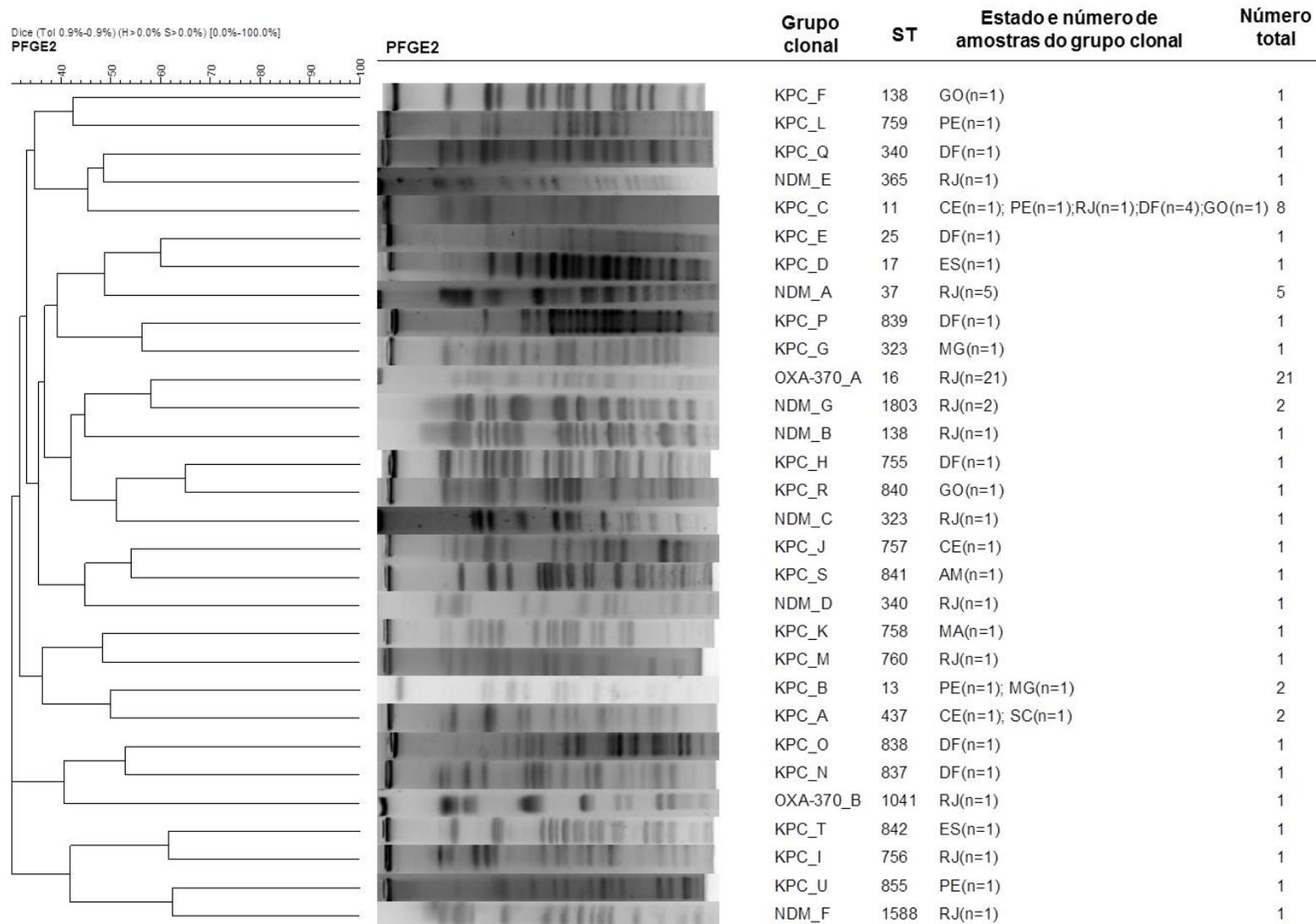
#### 4.8 Análise do polimorfismo genético através de PFGE

Foi observado um total de 30 grupos clonais nas amostras positivas para carbapenemases, sendo 21 grupos clonais nas amostras positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub> (n=32), sete grupos clonais nas amostras positivas para *bla*<sub>NDM-1</sub> (n=12) e dois grupos clonais nas amostras positivas para *bla*<sub>OXA-370</sub> (n=22). Não observamos amostras com os mesmos perfis de fragmentação por PFGE produtoras de diferentes carbapenemases. Consideramos como pertencentes ao mesmo grupo clonal amostras com no mínimo 80% de similaridade, com auxílio do *software GelCompar II* (versão 1.50), utilizando o coeficiente de Dice.

Dentre as amostras positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub>, os grupos clonais mais frequentes foram KPC\_C (n=8; 25%), KPC\_Q (n=3; 9,3%), KPC\_A (n=2; 6,25%) e KPC\_B (n=2; 6,25%). Vale ressaltar que não observamos um grande número de clones prevalentes se tratando das amostras positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub> visto que as amostras incluídas neste trabalho foram selecionadas a partir da dissertação de mestrado. Já entre as amostras positivas para *bla*<sub>NDM-1</sub>,

o grupo clonal mais encontrado foi NDM\_A (n= 5; 41,64%). Entre as amostras positivas para *bla*<sub>OXA-370</sub>, 95,4% pertenceram ao clone OXA-370\_A (n=21).

Abaixo podemos observar o dendrograma gerado através do *software GelCompar II* com um representante de cada grupo clonal (Figura 4.1).



**Figura 4.1:** Dendrograma representativo dos 30 perfis de fragmentação de DNA cromossomal encontrados nas 66 amostras de *K. pneumoniae* produtoras das carbapenemases  $bla_{KPC-2}$ ,  $bla_{NDM-1}$  e  $bla_{OXA-370}$ , obtido através do software *GelCompar II*.

#### 4.9 Análise do polimorfismo genético através de MLST.

A partir da análise da tipagem genética por PFGE, foi selecionado pelo menos um representante de cada clone para serem processadas pelo MLST para a definição do “*sequence type*”, totalizando 48 amostras (KPC=32; NDM=12 e OXA-370=4) (Tabela 4.11). Vale ressaltar que selecionamos apenas quatro amostras positivas para *bla*<sub>OXA-370</sub> (três pertencentes ao grupo clonal OXA-370\_A e uma do grupo clonal OXA-370\_B) devido a grande similaridade através do PFGE das 22 amostras classificadas como OXA-370\_A (Tabela 4.11).

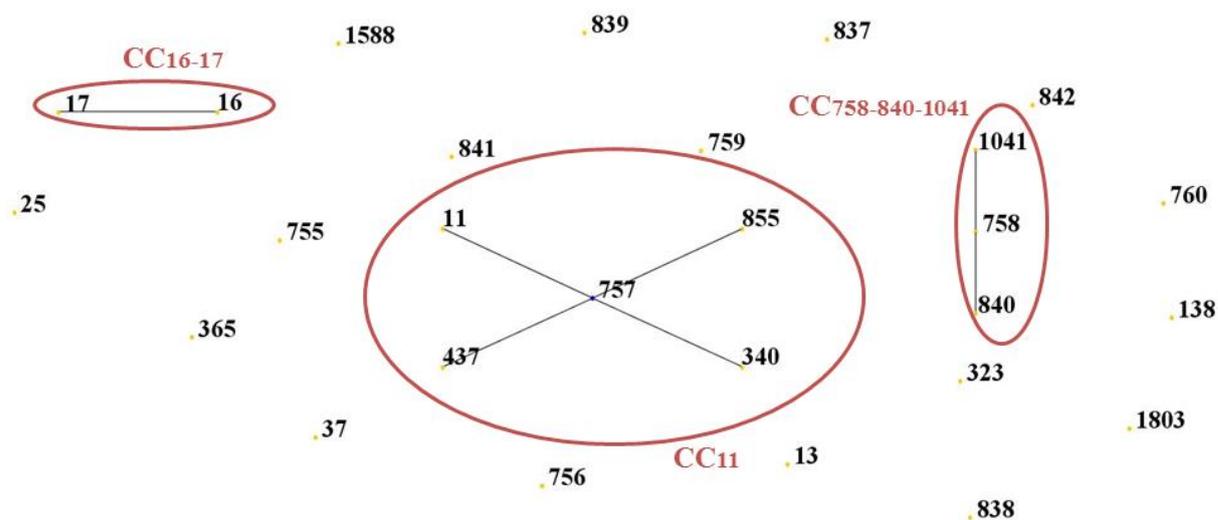
Observamos 30 grupos clonais por PFGE e 27 *sequence types* diferentes através do MLST. Esta diferença ocorreu porque os grupos clonais KPC\_F e NDM\_B foram classificados como ST138; os grupos clonais KPC\_G e NDM\_C foram classificados como ST323; e KPC\_Q e NDM\_D foram classificados como ST340. Estes grupos clonais, apesar de serem classificados como pertencentes ao mesmo ST, apresentaram perfis de fragmentação de DNA cromossômico distintos como é possível observar na Figura 4.1. Informações referentes à análise de MLST podem ser observadas na Tabela 4.11.

**Tabela 4.11:** Distribuição dos perfis clonais em relação aos *sequence types* das 67 amostras de *K. pneumoniae* produtores de carbapenemases.

Perfil de resistência	Perfil PFGE	CC	ST	Perfil alélico							N° de amostras
				<i>gapA</i>	<i>infB</i>	<i>mdh</i>	<i>pgi</i>	<i>phoE</i>	<i>rpoB</i>	<i>tonB</i>	
Amostras positivas para <i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	KPC_A	11	437	3	3	1	1	1	1	31	2
	KPC_B	-	13	2	3	1	1	10	1	19	2
	KPC_C	11	11	3	3	1	1	1	1	4	8
	KPC_D	16-17	17	2	1	1	1	4	4	4	1
	KPC_E	-	25	2	1	1	1	10	4	13	1
	KPC_F	-	138	18	22	26	23	31	13	49	1
	KPC_G	-	323	2	1	1	1	9	1	93	1
	KPC_H	-	755	4	1	1	1	25	1	35	1
	KPC_I	-	756	2	9	1	1	13	1	10	1
	KPC_J	11	757	3	3	1	1	1	1	22	1
	KPC_K	758-840-1041	758	2	1	1	1	7	1	19	1
	KPC_L	-	759	2	1	1	6	7	1	4	1
	KPC_M	-	760	2	1	71	1	4	3	18	1
	KPC_N	-	837	29	24	21	27	44	22	175	1
	KPC_O	-	838	16	24	21	49	47	22	176	1
	KPC_P	-	839	3	1	1	1	9	4	177	1
	KPC_Q	11	340	3	3	1	1	1	1	18	3
	KPC_R	758-840-1041	840	2	1	1	1	7	1	9	1
	KPC_S	-	841	18	15	64	59	11	13	51	1
	KPC_T	-	842	18	67	26	63	142	1	169	1
KPC_U	11	855	3	3	1	1	1	1	26	1	
Amostras positivas para <i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	NDM_A	-	37	2	9	2	1	13	1	16	5
	NDM_B	-	138	18	22	26	23	31	13	49	1
	NDM_C	-	323	2	1	1	1	9	1	93	1
	NDM_D	11	340	3	3	1	1	1	1	18	1
	NDM_E	-	365	16	18	57	62	76	22	104	1
	NDM_F	-	1588	2	6	1	3	10	1	56	2
	NDM_G	-	1803	18	22	161	22	11	13	192	1
Amostras positivas para <i>bla</i> <sub>OXA-370</sub>	OXA-370_A	16-17	16	2	1	2	1	4	4	4	3
	OXA-370_B	758-840-1041	1041	2	1	1	1	7	1	22	1

Com a ajuda do *software Eburst* disponível *on line* (<http://eburst.mlst.net/>), avaliamos a relação filogenética entre os *sequence types*. Considerando amostras pertencentes ao mesmo Complexo Clonal aquelas que apresentaram diferença em apenas um alelo do MLST, observamos três complexos clonais entre os 27 ST descritos, o CC11, CC16-17 e CC758-840-1041.

Dentre as amostras testadas, 16 pertenciam ao CC11, sendo 15 positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub> pertencentes aos *sequence types* ST11, ST340, ST437, ST757, ST855 e uma positiva para *bla*<sub>NDM-1</sub> do ST340. O CC16-17 contemplou uma amostra positiva para *bla*<sub>KPC-2</sub> (ST17) e três amostras positivas para *bla*<sub>OXA-370</sub> (ST16). Já o CC758-840-1041, foi formado por duas amostras positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub> (ST758 e ST840) e uma positiva para *bla*<sub>OXA-370</sub> (ST1041) (Figura 4.2).



**Figura 4.2:** Figura produzida pelo *software Eburst*, apresentando a relação ancestral dos 27 *sequence types* encontrados e os três complexos clonais: CC11, o CC16-17 e o CC758-840-1041.

#### 4.10 Identificação dos plasmídios carreadores dos genes codificadores de carbapenemases

Realizamos a metodologia de extração plasmidial, corrida em gel de agarose, transferência para membrana e hibridização dos plasmídios com as sondas para detecção dos genes codificadores de carbapenemases (*bla*<sub>KPC-2</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub> e *bla*<sub>OXA-370</sub>) em 48 amostras, sendo ao menos um representante de cada grupo clonal definido por PFGE/MLST (KPC=32; NDM=12; OXA-370=4). A extração dos plasmídios foi realizada através da metodologia de Kado e Liu nas amostras positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub> durante a dissertação de mestrado, S1 nuclease nas amostras positivas para *bla*<sub>OXA-370</sub> e ambas as técnicas nas amostras positivas para *bla*<sub>NDM-1</sub>.

Nas amostras positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub>, conseguimos observar marcação com a sonda *bla*<sub>KPC-2</sub> em 31 amostras (96%), com exceção da amostra CCBH6030 (grupo clonal KPC\_D/ST17). Na amostra negativa, a técnica de S1 nuclease foi realizada, porém sem êxito. Os plasmídios marcados com a sonda *bla*<sub>KPC-2</sub> apresentaram tamanho entre de 58 e 2kb, sendo que 41,9% (13/31) deles tiveram o tamanho aproximado de 40kb. Em sete amostras o gene *bla*<sub>KPC-2</sub> foi observado em mais de uma banda de plasmídio (Tabela 4.12).

Nas amostras positivas para *bla*<sub>NDM-1</sub>, só conseguimos observar a marcação dos plasmídios em uma amostra, CCBH13327, num plasmídio de 190 kb. Nas demais amostras,

apesar de terem sido tentadas ambas as técnicas de extração plasmidial (Kado e Liu; e S1 nuclease), não foi possível identificar os plasmídios possivelmente carreadores do gene *bla*<sub>NDM-1</sub> (Tabela 4.12).

Nas amostras positivas para *bla*<sub>OXA-370</sub>, observamos marcação em plasmídios nas 04 amostras avaliadas (três amostras do ST16 e uma amostra do ST1041). Na amostra CCBH13796 (ST1041), encontramos um plasmídio de 50 kb. Na amostra CCBH13791, pertencente ao ST16, encontramos marcação num plasmídio de 117kb. Nas duas outras amostras do mesmo ST (CCBH14393 e CCBH14420) observamos marcação em um plasmídio de 25kb (Tabela 4.12).

**Tabela 4.12:** Plasmídios carreadores dos genes *bla*<sub>KPC-2</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub> e *bla*<sub>OXA-370</sub> das 48 amostras em que a extração plasmidial e hibridização foram realizadas.

Perfil de resistência	Amostra	ST	CC	Hibridização		
				Sonda <i>bla</i> <sub>KPC</sub>	Sonda <i>bla</i> <sub>NDM</sub>	Sonda <i>bla</i> <sub>OXA-370</sub>
	CCBH5623	437	11	40kb	-	-
	CCBH5625	755	-	40kb	-	-
	CCBH5641	340	11	20kb e 13kb	-	-
	CCBH5658	11	11	60kb	-	-
	CCBH5659	138	-	60kb	-	-
	CCBH5745	340	11	40kb	-	-
	CCBH5788	13	-	5kb	-	-
	CCBH5982	11	11	40kb	-	-
	CCBH5991	11	11	40kb	-	-
	CCBH6010	837	-	44kb	-	-
	CCBH6030	17	16-17	ND	-	-
	CCBH6091	756	-	40kb	-	-
	CCBH6209	11	11	40kb	-	-
Amostras positivas para <i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	CCBH6298	838	-	40kb	-	-
	CCBH6306	839	-	40kb	-	-
	CCBH6354	757	11	39kb	-	-
	CCBH6366	437	11	40kb	-	-
	CCBH6370	11	11	48kb, 25kb e 3kb	-	-
	CCBH6428	323	-	58kb e 6kb	-	-
	CCBH6511	840	758-840-1041	10kb	-	-
	CCBH6524	758	758-840-1041	40kb	-	-
	CCBH6527	855	11	21kb, 7kb e 3kb	-	-
	CCBH6530	13	-	39kb	-	-
	CCBH6556	340	11	50kb, 15kb e 6kb	-	-
	CCBH6566	841	-	6kb	-	-
	CCBH6603	842	-	40kb	-	-
	CCBH6633	11	11	43kb	-	-
	CCBH6707	25	-	33kb	-	-
	CCBH6740	11	11	15kb, 7kb e 5kb	-	-

Perfil de resistência	Amostra	ST	CC	Hibridização		
				Sonda <i>bla</i> <sub>KPC</sub>	Sonda <i>bla</i> <sub>NDM</sub>	Sonda <i>bla</i> <sub>OXA-370</sub>
Amostras positivas para <i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	CCBH6742	759	-	46kb, 35kb e 8kb	-	-
	CCBH6798	11	11	5kb	-	-
	CCBH6806	760	-	40kb	-	-
Amostras positivas para <i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	CCBH13327	323	-	-	190kb	-
	CCBH15668	37	-	-	ND	-
	CCBH15669	37	-	-	ND	-
	CCBH15779	365	-	-	ND	-
	CCBH15948	37	-	-	ND	-
	CCBH15949	37	-	-	ND	-
	CCBH16046	1588	-	-	ND	-
	CCBH16047	340	11	-	ND	-
	CCBH16302	138	-	-	ND	-
	CCBH16328	1588	-	-	ND	-
	CCBH16385	1803	-	-	ND	-
CCBH16528	37	-	-	ND	-	
Amostras positivas para <i>bla</i> <sub>OXA-370</sub>	CCBH13791	16	16-17	-	-	117kb
	CCBH13796	1041	758-840-1041	-	-	50kb
	CCBH14393	16	16-17	-	-	25kb
	CCBH14420	16	16-17	-	-	25kb

Legenda: ND: não determinado.

#### 4.11 Análise do sequenciamento genômico

Com o objetivo de investigar mais profundamente as bactérias produtoras de carbapenemases selecionamos 11 amostras para a realização do sequenciamento genômico: cinco positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub> [CCBH5623 – ST437 (CC11); CCBH5745 – ST340 (CC11); CCBH5982 – ST11 (CC11); CCBH6306 – ST839; CCBH6707 – ST25] sendo três amostras provenientes do CC11, o mais importante mundialmente se tratando de amostras positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub>; três amostras positivas para *bla*<sub>OXA-370</sub> (CCBH13796 – ST1041, CCBH14119 – ST16, CCBH14393 – ST16) correspondentes aos dois *sequence types* encontrados nas amostras de OXA-370 em nosso trabalho; três amostras positivas para *bla*<sub>NDM-1</sub> (CCBH13327 – ST323; CCBH15949 – ST37, CCBH16302 – ST138), uma correlacionada ao *sequence type* mais observado dentre as amostras positivas para *bla*<sub>NDM-1</sub> e duas amostras de outros ST.

Devido à disponibilidade de verbas e a boa reprodutibilidade entre as técnicas de sequenciamento utilizadas, realizamos o sequenciamento utilizando duas metodologias: 454 da Roche (duas amostras positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub>: CCBH5623 – ST437 e CCBH5982 – ST11) e Illumina MiSeq (demais amostras). As montagens dos genomas sequenciados pela plataforma 454 da Roche foram realizadas através do Newbler, enquanto as montagens dos

dados do Illumina foram realizadas com o *software* A5-MiSeq pipeline. As informações das corridas e das montagens dos genomas podem ser observadas na

Tabela **4.13**.

A amostra CCBH13796 positiva para *bla*<sub>OXA-370</sub> do ST1041 apresentou os parâmetros de corrida e de montagem do genoma diferente das demais amostras (

Tabela **4.13**). Dessa forma, realizamos uma avaliação do genoma da amostra através das plataformas KmerFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/KmerFinder/>, que realiza a predição da espécie através da utilização de um algoritmo específico) e SpeciesFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/SpeciesFinder/>, que realiza a predição da espécie utilizando os dados do 16S do genoma). Esta amostra foi considerada como *K. pneumoniae* pelos dois métodos de predição mas que continha também DNA proveniente de *Burkholderia* sp. Acreditamos que esta amostra tenha sido contaminada durante a preparação para o sequenciamento genômico que foi realizado posteriormente às demais metodologias. Por esta amostra ser representativa do único clone diferente encontrado positivo para *bla*<sub>OXA-370</sub>, decidimos mantê-la em nossas análises, utilizando esta amostra somente na pesquisa de genes relacionados e já descritos em amostras de *K. pneumoniae*.

**Tabela 4.13:** Características das corridas de sequenciamento e da montagem dos genomas das 11 amostras produtoras de carbapenemases.

Perfil de resistência	Amostra	ST	Método seq.	Reads geradas	Número total de bases geradas	Tamanho médio das reads geradas	Tamanho do genoma	Cobertura	Conteúdo GC (%)	Contigs gerados	N50	Tamanho do maior contig	Sequências codificadoras de proteínas	RNA
Amostras positivas para <i>bla<sub>KPC-2</sub></i>	CCBH5623	437	454 (Roche)	196.857	121.933.012	676 pb	5.543.078	21X	57.3 %	81	203.700	560.490	5362	90
	CCBH5745	340	MiSeq (Illumina)	3.104.622	563.502.381	289pb	5.870.155	95X	56.9 %	71	220.445	516.965	5708	119
	CCBH5982	11	454 (Roche)	134.075	85.183.936	667pb	5.706.127	14X	57.2 %	104	145.821	435.763	5574	85
	CCBH6306	839	MiSeq (Illumina)	2.335.942	665.614.319	285 pb	5.495.411	121X	57.4 %	98	195.563	371.307	5214	123
	CCBH6707	25	MiSeq (Illumina)	2.675.928	762.225.440	285 pb	5.643.638	135X	57.1 %	48	273291	505.892	5389	111
Amostras positivas para <i>bla<sub>NDM-1</sub></i>	CCBH13327	323	MiSeq (Illumina)	1.487.108	334.997.634	226 pb	6.023.847	55X	56.6 %	106	133.213	598.663	5722	99
	CCBH15949	37	MiSeq (Illumina)	3.238.938	944.147.564	291 pb	5.800.512	162X	56.6 %	72	326.590	584.148	5538	117
	CCBH16302	138	MiSeq (Illumina)	3.552.084	1.036.061.615	290 pb	6.039.753	171X	56.9 %	74	281.436	1.006.522	5833	116
Amostras positivas para <i>bla<sub>OXA-370</sub></i>	CCBH13796	1041	MiSeq (Illumina)	3.161.190	915.989.996	289 pb	13.139.197	69X	61.8 %	3280	7.889	788.823	12948	187
	CCBH14119	16	MiSeq (Illumina)	2.952.490	860.748.748	291 pb	5.639.872	152X	57.1 %	73	262.182	576.005	5431	117
	CCBH14393	16	MiSeq (Illumina)	3.066.638	882.469.427	287 pb	5.791.089	152X	57.0 %	92	299.378	712.448	5570	104

Legenda: Método seq.: método de sequenciamento.

#### **4.11.1 Análise de genes de resistência adquiridos**

Realizamos a pesquisa de genes de resistência adquiridos que causam resistência a beta-lactâmicos, quinolonas, aminoglicosídeos e outros antimicrobianos associados a *K. pneumoniae* através das plataformas disponíveis *online* ResFinder e BIGSdb-Kp. Os genes de resistência encontrados estão demonstrados na Tabela 4.14.

**Tabela 4.14:** Características das amostras e genes de resistência encontrados no Sequenciamento Genômico.

Amostra	ST	Material Clínico	Susc. aos ATB	Amb. carbapenem.		Genes de resistência adquiridos encontrados no sequenciamento genômico										
				Transp	Plas	Genes de resistência a beta-lactâmicos	Genes de resistência a aminoglicosídeos	Genes de resistência a quinolonas	Genes de resistência a outros antimicrobianos							
									Fos	Sulf	MSL	Fenic	Tetrac	Rif	Trim	
<i>bla<sub>KPC-2</sub></i>	5623	437	Sangue	AK, PB	Tn4401 b	40kb	<i>bla<sub>KPC-2</sub></i> ; <i>bla<sub>CTX-M-15</sub></i> ; <i>bla<sub>SHV-11</sub></i> ; <i>bla<sub>TEM-1</sub></i> ; <i>bla<sub>OXA-1</sub></i>	<i>aac(6')Ib-cr</i> ; <i>aacC2</i>	<i>qnrB1</i> ; <i>aac(6')Ib-cr</i> ; <i>oqxA</i> ; <i>oqxB</i>	<i>fosA</i>	<i>sul1</i>	<i>mphA</i>	<i>catB3</i>	<i>tet(D)</i> ; <i>tet(R)</i> ; <i>tet(A)</i>	-	<i>dfrA30</i>
	5745	340	Urina	AK, FOT, PB	Tn4401 b	40kb	<i>bla<sub>KPC-2</sub></i> ; <i>bla<sub>CTX-M-15</sub></i> ; <i>bla<sub>SHV-11</sub></i>	<i>strA</i> ; <i>strB</i> ; <i>aacC2</i>	<i>oqxA</i> ; <i>oqxB</i>	<i>fosA</i>	<i>sul2</i>	-	-	-	-	-
	5982	11	Sangue	AK, FOT, TIG, PB	Tn4401 b	40kb	<i>bla<sub>KPC-2</sub></i> ; <i>bla<sub>SHV-11</sub></i> ; <i>bla<sub>TEM-1</sub></i> ; <i>bla<sub>OXA-2</sub></i>	<i>aac(3)-Iia</i> ; <i>aadA</i> ; <i>aac(6)-Ib</i>	<i>oqxA</i> ; <i>oqxB</i>	<i>fosA</i>	<i>sul1</i>	<i>mphA</i>	<i>catA1</i>	-	-	<i>dfrA12</i>
	6306	839	Sangue	FEP, CAZ, GN, AK, SXT, TIG, PB	Tn4401 b	40kb	<i>bla<sub>KPC-2</sub></i> ; <i>bla<sub>SHV-1</sub></i>	-	<i>oqxA</i> ; <i>oqxB</i>	<i>fosA</i>	-	-	-	<i>tet(D)</i>	-	-
	6707	25	Urina	FOT, PB	<i>ISKpn6 e tnpA</i>	33kb	<i>bla<sub>KPC-2</sub></i> ; <i>bla<sub>CTX-M-8</sub></i> ; <i>bla<sub>SHV-11</sub></i> ; <i>bla<sub>TEM-1</sub></i> ; <i>bla<sub>OXA-9</sub></i>	<i>aac(6')-Ib</i> ; <i>aadA</i>	<i>oqxA</i> ; <i>oqxB</i>	<i>fosA</i>	<i>sul1</i> ; <i>sul2</i>	-	<i>cmlA1</i>	-	-	<i>dfrA15</i>
<i>bla<sub>NDM-1</sub></i>	13327	323	Swab retal	FOT, PB	<i>ISAbA125</i>	190kb	<i>bla<sub>NDM-1</sub></i> ; <i>bla<sub>CTX-M-2</sub></i> ; <i>bla<sub>SHV-99</sub></i> ; <i>bla<sub>TEM-15</sub></i> ; <i>bla<sub>CARB-2</sub></i>	<i>aac(3)-Iia</i> ; <i>aac(6')-Iq</i> ; <i>aadA2</i>	<i>qnrA1</i> ; <i>oqxA</i> ; <i>oqxB</i>	<i>fosA</i>	<i>sul1</i>	-	<i>catA1</i>	<i>tet(D)</i>	<i>arr-5</i>	<i>dfrA16</i> ; <i>dfrA8</i>
	15949	37	Sangue	FOT, PB	<i>ISAbA125</i>	ND	<i>bla<sub>NDM-1</sub></i> ; <i>bla<sub>CTX-M-15</sub></i> ; <i>bla<sub>SHV-11</sub></i> ; <i>bla<sub>TEM-1</sub></i> ; <i>bla<sub>OXA-1</sub></i>	<i>aac(6')Ib-cr</i> ; <i>aac(3)-Iia</i> ; <i>strB</i> ; <i>strA</i>	<i>qnrB1</i> ; <i>aac(6')Ib-cr</i> ; <i>oqxA</i> ; <i>oqxB</i>	<i>fosA</i>	<i>sul2</i>	-	<i>catB3</i>	-	-	<i>dfrA14</i>
	16302	138	Swab retal	AK, FOT, PB	<i>ISAbA125</i>	ND	<i>bla<sub>NDM-1</sub></i> ; <i>bla<sub>CTX-M-15</sub></i> ; <i>bla<sub>TEM-1</sub></i> ; <i>bla<sub>OXA-1</sub></i> ; <i>bla<sub>OKP-B</sub></i>	<i>aac(6')Ib-cr</i> ; <i>aac(3)-Iia</i> ; <i>strB</i> ; <i>strA</i>	<i>qnrB1</i> ; <i>aac(6')Ib-cr</i> ; <i>oqxA</i> ; <i>oqxB</i>	<i>fosA</i>	<i>sul2</i>	-	<i>catB3</i>	-	-	<i>dfrA14</i>
<i>bla<sub>OXA-370</sub></i>	13796	1041	Aspirado traqueal	AK, FOT, PB	ND	50kb	<i>bla<sub>OXA-370</sub></i> ; <i>bla<sub>CTX-M-2</sub></i> ; <i>bla<sub>SHV-121</sub></i> ; <i>bla<sub>TEM-1</sub></i>	<i>aac(3)-Iia</i> ; <i>aac(6')-Ib</i>	<i>oqxA</i> ; <i>oqxB</i>	<i>fosA</i>	<i>sul1</i>	-	-	<i>tet(D)</i>	-	-
	14119	16	Swab retal	GN, FOT, TIG, PB	ND	ND	<i>bla<sub>OXA-370</sub></i> ; <i>bla<sub>CTX-M-15</sub></i> ; <i>bla<sub>SHV-1</sub></i> ; <i>bla<sub>OXA-1</sub></i>	<i>aac(6')Ib-cr</i> ; <i>aadA2</i> ; <i>aph(3')-Ia</i> ; <i>ant(3)-Ia</i>	<i>aac(6')Ib-cr</i> ; <i>oqxA</i> ; <i>oqxB</i>	<i>fosA</i>	<i>sul1</i>	<i>mphA</i>	<i>catB3</i>	NEG	-	<i>dfrA12</i>
	14393	16	Swab retal	FOT, PB	ND	25kb	<i>bla<sub>OXA-370</sub></i> ; <i>bla<sub>CTX-M-15</sub></i> ; <i>bla<sub>SHV-1</sub></i> ; <i>bla<sub>TEM-1</sub></i> ; <i>bla<sub>OXA-1</sub></i> ; <i>bla<sub>OXA-2</sub></i>	<i>aac(6')Ib-cr</i> ; <i>aadA2</i> ; <i>aacA4</i> ; <i>aac(3)-Iid</i> ; <i>strA</i> ; <i>strB</i> ; <i>rmtB</i>	<i>aac(6')Ib-cr</i> ; <i>oqxA</i> ; <i>oqxB</i>	<i>fosA</i>	<i>sul1</i> ; <i>sul2</i>	<i>mphA</i>	<i>catB3</i>	<i>tet(G)</i>	<i>arr-3</i>	<i>dfrA12</i>

Legenda: Susc. aos ATB: susceptibilidade aos antimicrobianos; Transp: transposon; Plasm: plasmídeo; Aminoglic.: aminoglicosídeos; Fos: fosfomicinas; Sulf: sulfonamidas; MSL : macrolídeos, lincosaminas e estreptograminas; Fenic.: fenicóis; Tetrac.: tetraciclinas; Rif.: rifampicinas; Trim.: trimetoprima; WT: proteína sem mutação; AK: amicacina; PB: polimixina B; FOT: fosfomicina/trometamol; TIG: tigeciclina; FEP: cefepime; CAZ: ceftazidima; GN: gentamicina; SXT: sulfametoxazole/trimetoprima.

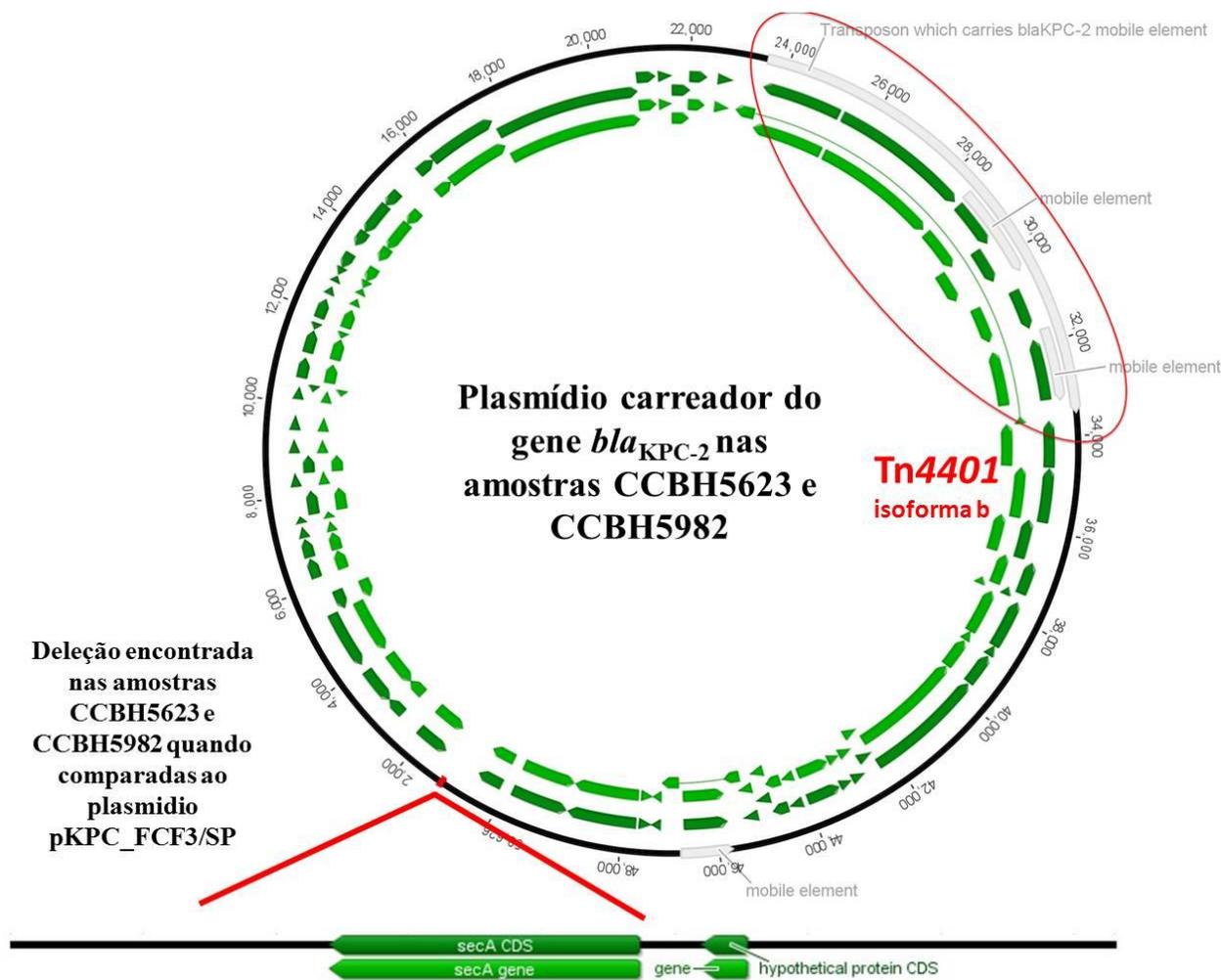
#### 4.11.1.1 Avaliação do ambiente genético dos genes de resistência.

A avaliação do ambiente genético dos genes codificadores de carbapenemases (*bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>NDM</sub> e *bla*<sub>OXA-370</sub>), de resistência mais significativos epidemiologicamente encontrados [*bla*<sub>CTX-M</sub>; *aac(6')Ib-cr*; *qnr*, *rmtB*], bem como nos genes encontrados em todas as amostras testadas (*oqxA*, *oqxB* e *fosA*) foi realizada a partir da análise minuciosa da anotação dos *contigs* (usando a plataforma de anotação automática RAST e avaliação junto ao BLAST).

##### 4.11.1.1.1 Ambiente genético dos genes codificadores de carbapenemases *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>NDM</sub> e *bla*<sub>OXA-370</sub>

Nas amostras CCBH5623 (ST437) e CCBH5982 (ST11), o gene *bla*<sub>KPC-2</sub> foi encontrado em *contigs* de 50.627 pb e 50.454 pb respectivamente, tamanho similar aos plasmídios experimentalmente encontrados (aproximadamente 40kb). Realizando comparações no BLAST, observamos que estes *contigs* apresentaram 99% de identidade com o plasmídio pKPC\_FCF3/SP de 54,6 kb, isolado em 2009 de uma amostra de *K. pneumoniae* do ST442, obtida de uma hemocultura em São Paulo (Número de acesso GenBank: CP004367.2). Neste plasmídio, o gene *bla*<sub>KPC-2</sub> encontra-se associado ao Tn4401 isoforma b.

Comparando-se a sequência dos *contigs* com o plasmídio do banco de dados, a amostra CCBH5623 apresentou uma deleção de 3.979 pb e a amostra CCBH5982 de 4.153 pb na região que codifica o gene *secA* (função desconhecida) e uma proteína hipotética. A figura representativa da estrutura do plasmídio das amostras encontra-se a seguir.

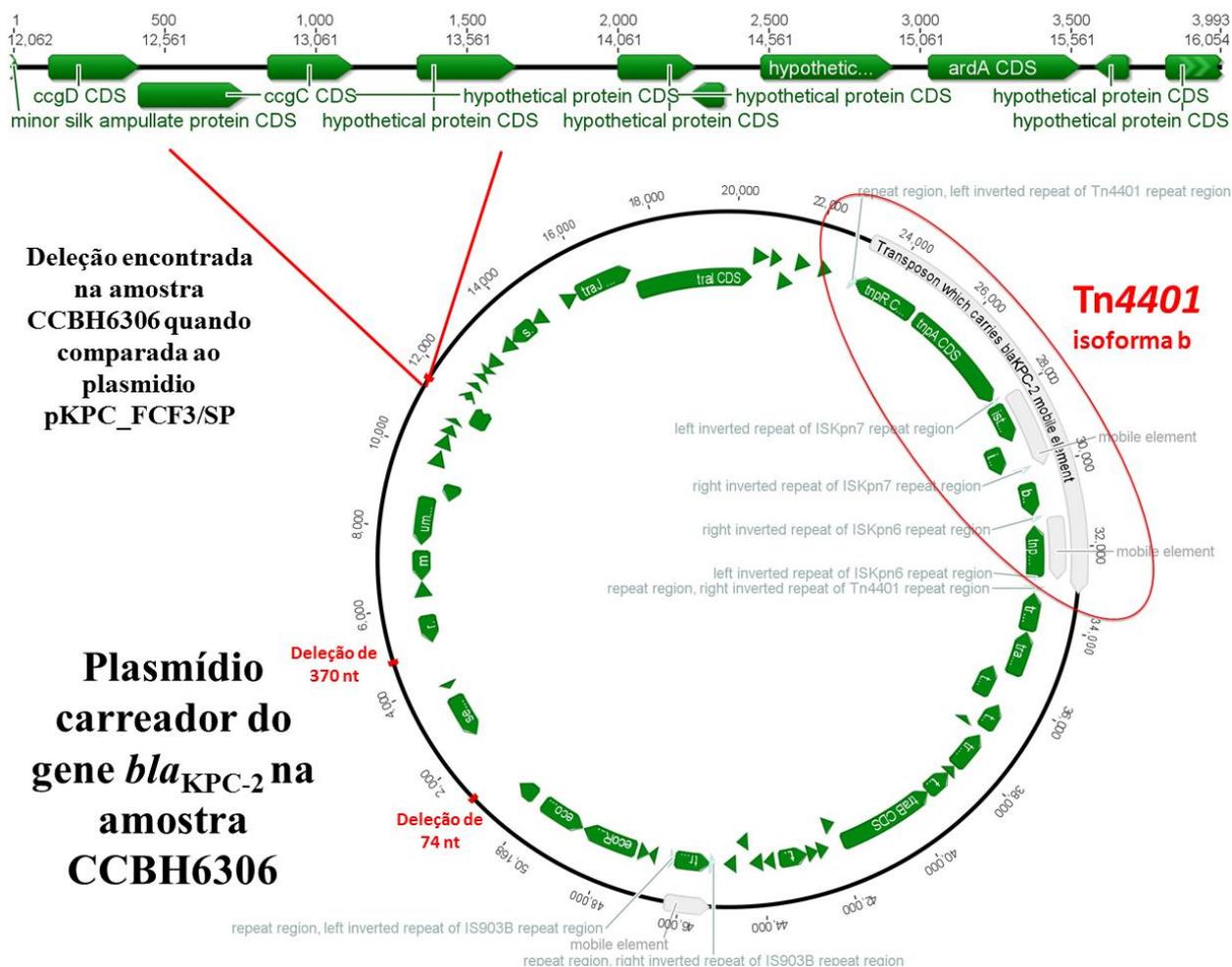


**Figura 4.3:** Figura representativa do plasmídio carreador do gene  $bla_{KPC-2}$  nas amostras CCBH5623 e CCBH5982. Assinalado em uma elipse vermelha está a região do transposon Tn4401 e em destaque na parte inferior da imagem, encontra-se a região com deleção em comparação com o plasmídio pKPC\_FCF3/SP.

Na amostra CCBH5745 (ST340), o gene  $bla_{KPC-2}$  foi encontrado em *contigs* de 53.565 pb e experimentalmente obteve um plasmídio de aproximadamente 40kb. Após análise do BLAST observamos que esta amostra apresentou também 99% de identidade com o plasmídio pKPC\_FCF3/SP isolado em São Paulo. Observamos mutações pontuais silenciosas (que não modificaram a sequência primária das proteínas codificadas) em genes de transposases mas encontramos uma inserção de uma adenina provocando alteração no quadro de leitura do gene *secA*, cuja função é desconhecida.

Na amostra CCBH6306 (ST839), cujo plasmídio experimentalmente também apresentou aproximadamente 40kb, observamos o gene  $bla_{KPC-2}$  num *contig* de 50.170 pb. Assim como as demais amostras, apresentou identidade de 99% com o plasmídio

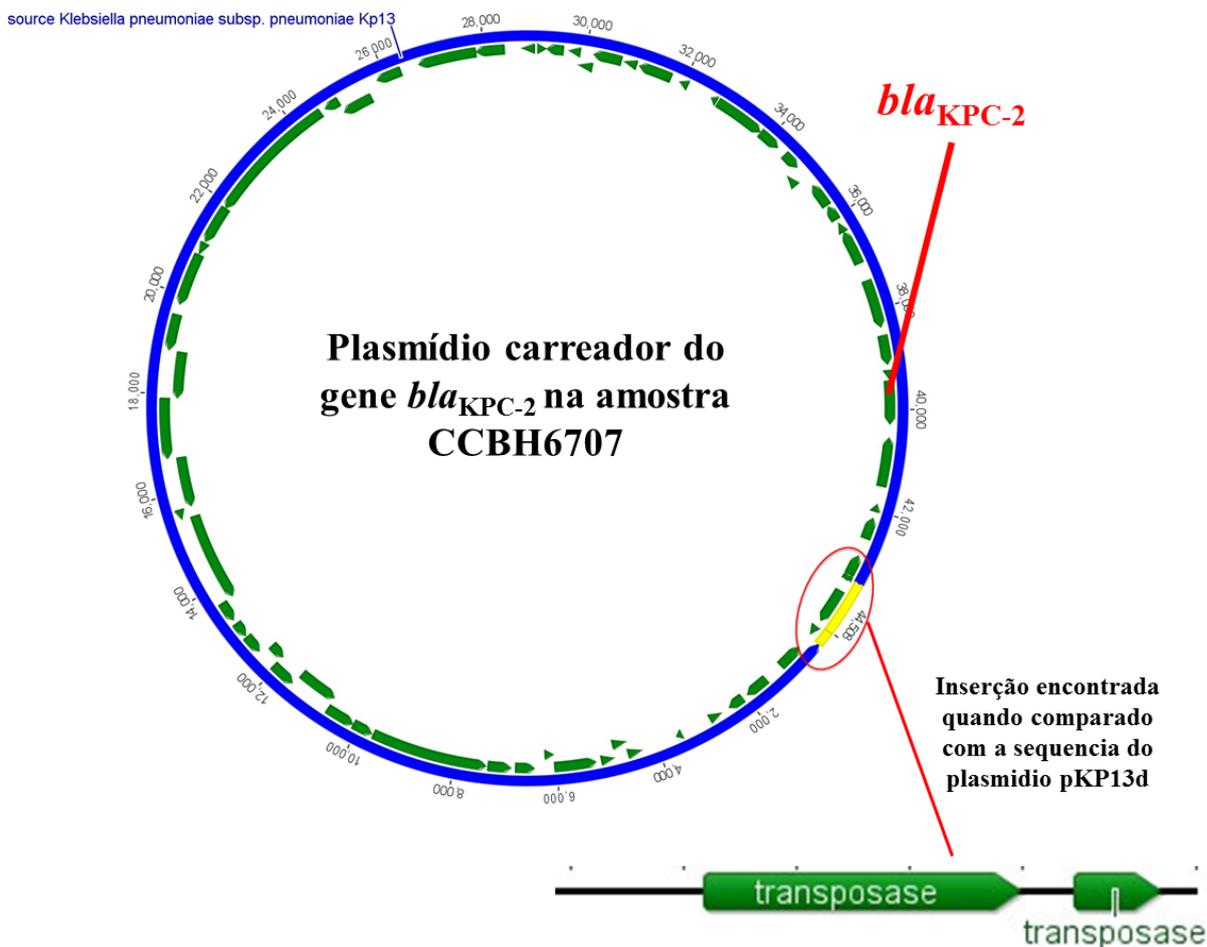
pKPC\_FCF3/SP. Entretanto, observamos algumas diferenças na estrutura: três deleções (uma de 74 nucleotídeos *upstream* do gene *resP*, uma deleção de 370 nucleotídeos *downstream* do gene *repA* e uma deleção de 3993 nucleotídeos contemplando diferentes genes). Assim como no plasmídio da amostra CCBH5745, observamos uma inserção de uma adenina provocando alteração no quadro de leitura do gene *secA* de função desconhecida. A imagem representativa do plasmídio pode ser observada abaixo (Figura 4.4).



**Figura 4.4:** Figura representativa do plasmídio carreador do gene *bla*<sub>KPC-2</sub> na amostra CCBH6306. Assinalado em uma elipse vermelha está a região do transposon Tn4401 e em destaque na parte superior da imagem, encontra-se a região com deleção em comparação com o plasmídio pKPC\_FCF3/SP.

O gene *bla*<sub>KPC-2</sub> foi encontrado na amostra CCBH6707 (ST25) num *contig* de 46759 pb, tamanho similar ao encontrado experimentalmente (aproximadamente 33kb). Realizando uma busca com o BLAST, observamos 99% de identidade com o plasmídio pKP13d, isolado de uma *K. pneumoniae* do ST442 (cepa Kp13) e obtida de hemocultura em Londrina, Paraná

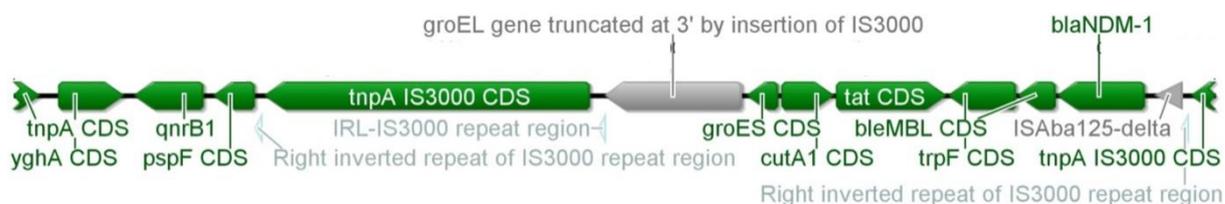
em 2009. Em comparação com este plasmídio, a amostra CCBH6707 apresentou uma inserção de 1.364 nucleotídeos, codificando duas transposases (Figura 4.5).



**Figura 4.5:** Figura representativa do plasmídio carreador do gene *bla*<sub>KPC-2</sub> na amostra CCBH6707. Assinalado em uma elipse vermelha está a região de inserção em comparação com o plasmídio pKP13d.

Nesta amostra, o gene *bla*<sub>KPC-2</sub> está associado upstream a *ISKpn6*, e por uma resolução do transposon Tn3-like (KP0599). Abaixo, podemos observar a figura representativa do ambiente do gene codificador de KPC-2 nesta amostra (Figura 4.6).





**Figura 4.8:** Figura representativa do *contig* carreador do gene  $bla_{NDM-1}$  e *qnrB1* na amostra CCBH16302.

Já nas amostras positivas para  $bla_{OXA-370}$  (CCBH13796, CCBH14119 e CCBH14393), o gene  $bla_{OXA-370}$  foi encontrado em *contigs* de 4.899 pb, 3.531 pb e 5.502 pb, respectivamente. Realizando comparações no BLAST, observamos que estes *contigs* apresentaram similaridade com uma região do plasmídeo p87F-2, isolado de um *Enterobacter hormaechei* no Rio Grande do Sul, primeira amostra a ser reportada a presença desse gene (Número de acesso GenBank: KJ488943.1). Nestas amostras, o gene  $bla_{OXA-370}$  estava flanqueado *upstream* por uma transposase da família Tn3 truncada pela sequência de inserção IS5075-like e *downstream* por uma transposase da família Tn4 truncada por uma IS15-like. A estrutura deste elemento genético está sinalizada abaixo (Figura 4.9).



**Figura 4.9:** Figura representativa do ambiente genético do gene  $bla_{OXA-370}$  encontrado nas amostras CCBH13796, CCBH14119 e CCBH14393.

Além da análise do ambiente genético do gene codificador da OXA-370, realizamos comparações entre as 10 sequências distintas de genes da família  $bla_{OXA-48-like}$  disponíveis no GenBank. Realizamos esta análise pelo fato desta enzima ter sido descrita recentemente e seu perfil de hidrólise frente aos beta-lactâmicos não estar muito bem estabelecido na literatura. Para avaliar se as diferenças a nível proteico encontradas seriam consideradas deletérias ou neutras, ou seja, se provavelmente afetariam ou não a função da enzima quando comparada a sequência da OXA-48, utilizamos a plataforma on-line Provean (<http://provean.jcvi.org/index.php>). Esta ferramenta tem a função de prever se uma substituição de aminoácido, inserções ou deleções terão impacto sobre a função biológica da proteína.

Observamos que em algumas amostras as mutações encontradas foram preditas como possivelmente deletérias pelo *software* Provean: a deleção na enzima OXA-163 (211,YSTRIEP,YDT); as trocas de valina por alanina na posição 45 e troca de um ácido aspártico por uma glicina na posição 154 na enzima OXA-199 (V45A, D154G); mudança de um ácido glutâmico para tirosina na posição 125 da enzima OXA-245 (E125Y), bem como a deleção na enzima OXA-247(211,YSTRIEP,SNT), na mesma região da deleção encontrada na enzima OXA-163. De acordo com a literatura, as enzimas que possuem um perfil de hidrólise menor frente aos carbapenemas quando comparadas a enzima OXA-48 são as enzimas OXA-163 e OXA-247, que apresentaram deleções nas mesmas regiões da enzima classificadas como possivelmente deletérias pelo *software* Provean. As mutações encontradas, bem como a predição do *software* Provean estão na Tabela 4.15.

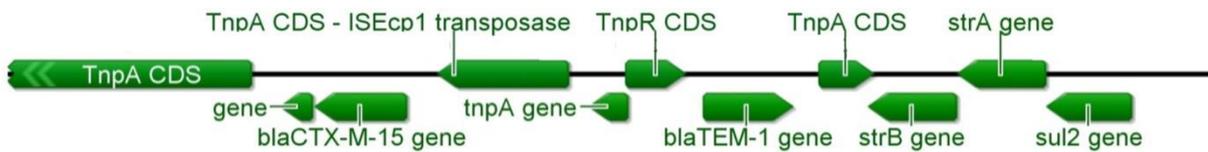
**Tabela 4.15:** Diferenças a nível proteico encontradas nas enzimas da família OXA-48-like

Enzima	Mutação comparada com a OXA-48	Perfil hidrólise frente aos beta-lactâmicos de acordo com a literatura
OXA-162	T213A	Semelhante a OXA-48
OXA-163	<b>211,YSTRIEP,YDT*</b>	Pouca atividade efetiva contra carbapenemas; perfil de hidrólise similar a enzimas ESBL
OXA-181	T104A, N110D, E168Q , S117A	Semelhante a OXA-48
OXA-199	H38Y, <b>V45A*</b> , <b>D154G*</b>	Semelhante a OXA-48
OXA-204	98,QT,HR	Semelhante a OXA-48
OXA-232	T104A, N110D, E168Q , S117A, R214S	Semelhante a OXA-48
OXA-244	R214G	Semelhante a OXA-48
OXA-245	<b>E125Y*</b>	Semelhante a OXA-48
OXA-247	<b>211,YSTRIEP,SNT*</b>	Pouca atividade efetiva contra carbapenemas
OXA-370	S212E	Não estabelecido

Legenda= \*: mutação predita como deletéria pelo *software* Provean.

#### 4.11.1.1.2 Ambiente genético dos genes *bla*<sub>CTX-M</sub>

O gene *bla*<sub>CTX-M-15</sub> foi encontrado em seis amostras: duas positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub> (CCBH5623 e CCBH5745), duas positivas para *bla*<sub>NDM-1</sub> (CCBH15949 e CCBH16302) e duas amostras positivas para *bla*<sub>OXA-370</sub> (CCBH14119 e CCBH14393). Nas duas amostras positivas para *bla*<sub>NDM-1</sub> e na amostra CCBH5745 (positiva para *bla*<sub>KPC-2</sub>), esse gene foi encontrado associado a *ISEcp1* em um *contig* de aproximadamente 11kb, albergando também os genes *bla*<sub>TEM-1</sub> (codificador de beta-lactamase), *strA* e *strB* (codificadores de resistência a aminoglicosídeos) e *sul2* (resistência a sulfonamidas). Nas demais amostras, observamos somente parte da estrutura (transposase *tnpA downstream* da *ISEcp1* e *bla*<sub>CTX-M-15</sub>). A imagem representativa do ambiente genético do *bla*<sub>CTX-M-15</sub> dessas amostras está abaixo (Figura 4.10).



**Figura 4.10:** Figura representativa do ambiente genético dos genes *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>TEM-1</sub>, *strA*, *strB* e *sul 2* encontrado nas amostras CCBH15949, CCBH16302 e CCBH5745.

Na amostra CCBH13327, o gene *bla*<sub>CTX-M-2</sub> foi encontrado em um *contig* de 4.805 pb, associado a uma transposase putativa e *qacE* (Figura 4.11). Já o gene *bla*<sub>CTX-M-8</sub> foi encontrado na amostra CCBH6707 num *contig* de 2.722 pb associado aos elementos genéticos IS26 e IS10 (Figura 4.12).



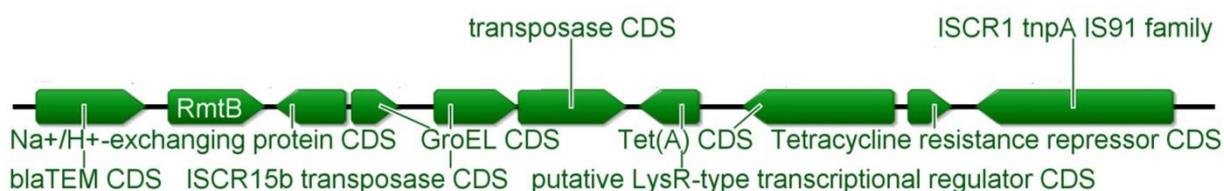
**Figura 4.11:** Figura representativa do ambiente genético do gene *bla*<sub>CTX-M-2</sub> na amostra CCBH13327.



**Figura 4.12:** Figura representativa do ambiente genético do gene *bla*<sub>CTX-M-8</sub> na amostra CCBH6707.

#### 4.11.1.1 Ambiente genético do gene *rmtB*

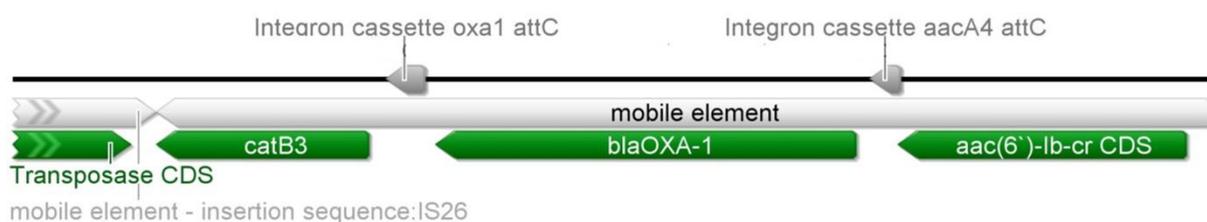
A única metilase encontrada no nosso trabalho foi a *rmtB*, descrita na amostra positiva para *bla*<sub>OXA-370</sub> CCBH14393. Esse gene foi descrito em um *contig* de 9.312 pb associado ao gene *bla*<sub>TEM-1</sub>, *tet(A)* e a transposases dos elementos *ISCR15b* e *ISCR1*. A estrutura do ambiente genético deste gene está descrita abaixo (Figura 4.13).



**Figura 4.13:** Figura representativa do ambiente genético do gene *rmtB* na amostra CCBH14393.

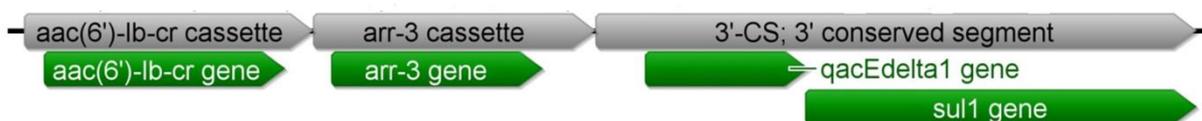
#### 4.11.1.1.1 Ambiente genético do gene *aac(6')-Ib-cr*

O gene *aac(6)-Ib-cr*, que confere resistência concomitantemente a aminoglicosídeos e quinolonas, foi encontrado também em cinco amostras: uma positiva para *bla*<sub>KPC-2</sub> (CCBH5623), duas positivas para *bla*<sub>NDM-1</sub> (CCBH15949 e CCBH16302) e duas amostras positivas para *bla*<sub>OXA-370</sub> (CCBH14119 e CCBH14393). Nessas as amostras, esse gene foi encontrado na mesma estrutura genética que apresenta similaridade com o plasmídeo pHg da amostra *K. pneumoniae* ATCC BAA-2146, produtora de NDM-1 pertencente ao ST11 e isolada nos Estados Unidos em 2010 (Número de acesso GenBank: CP006662.2). Neste plasmídeo, observamos a sequência de inserção IS26 associada a cassetes gênicos codificadores de outros genes de resistência: *bla*<sub>OXA-1</sub> (beta-lactamase) e *catB3* (resistência a fenicóis). A imagem representativa dessa região está na Figura 4.14.



**Figura 4.14:** Figura representativa do ambiente genético dos genes *aac(6')-Ib-cr*; *bla*<sub>OXA-1</sub> e *catB3* nas amostras CCBH5623, CCBH15949, CCBH16302, CCBH14119 e CCBH14393.

A amostra CCBH14393 apresentou o gene *aac(6')-Ib-cr* em dois *contigs*: na estrutura supracitada e também numa região similar a uma região de integron. Nesta região, encontramos os cassetes gênicos codificadores dos genes *aac(6')-Ib-cr* e *arr-3* associados com a região 3'CS conservada do integron completa (que alberga os genes *qacEdelta1* e *sul1*) entretanto, não observamos o gene da integrase nessa estrutura (Figura 4.15).



**Figura 4.15:** Figura representativa do ambiente genético dos genes *aac(6')-Ib-cr*; *arr-3*; *qacEdelta1* e *sul1* na amostra CCBH14393.

#### 4.11.1.1.2 Ambiente genético dos genes *qnr*

O gene *qnrB1* foi encontrado nas amostras CCBH5623, CCBH15949 e CCBH16302, e o gene *qnrA1*, na amostra CCBH13327. Na amostra CCBH16302, o gene *qnrB1* foi encontrado na mesma estrutura genética do gene *bla<sub>NDM-1</sub>* (Figura 4.8). Na amostra CCBH5623, o gene *qnrB1* estava associado ao *operon Psp* (ativador transcricional) (Figura 4.16) e na amostra CCBH15949, também ao gene *Psp* e a transposases (Figura 4.17). Já o gene *qnrA1* estava associado aos genes *ampR* e *qacEdelta1* (Figura 4.18).



**Figura 4.16:** Figura representativa do ambiente genético do gene *qnrB1* na amostra CCBH5623.



**Figura 4.17:** Figura representativa do ambiente genético do gene *qnrB1* na amostra CCBH15949.



**Figura 4.18:** Figura representativa do ambiente genético do gene *qnrA1* na amostra CCBH13327.

#### 4.11.1.1.3 Ambiente genético dos genes *oqxA* e *oqxB*

Os genes *oqxA* e *oqxB* foram encontrados em todas as amostras sequenciadas incluídas no trabalho, bem como o gene codificador de seu regulador *oqxR* e de seu ativador *rara*. Os genes *oqxA* e *oqxB* codificam a bomba de efluxo OqxAB envolvida na resistência a quinolonas mas também descrita associada a resistência a beta-lactâmicos, tigeciclina e cloranfenicol. Além de ter sido detectada em todas as amostras, esta bomba foi localizada no

mesmo ambiente genético. A análise do BLAST na região de 11kb próxima a bomba apontou para 99% de identidade com regiões de cromossomo de outras *K. pneumoniae* do banco de dados, incluindo amostras produtoras de KPC-2 e NDM-1 (Números de acesso GenBank: CP011989.1 e CP006659.2). O ambiente desta bomba está descrito na imagem abaixo (Figura 4.19).



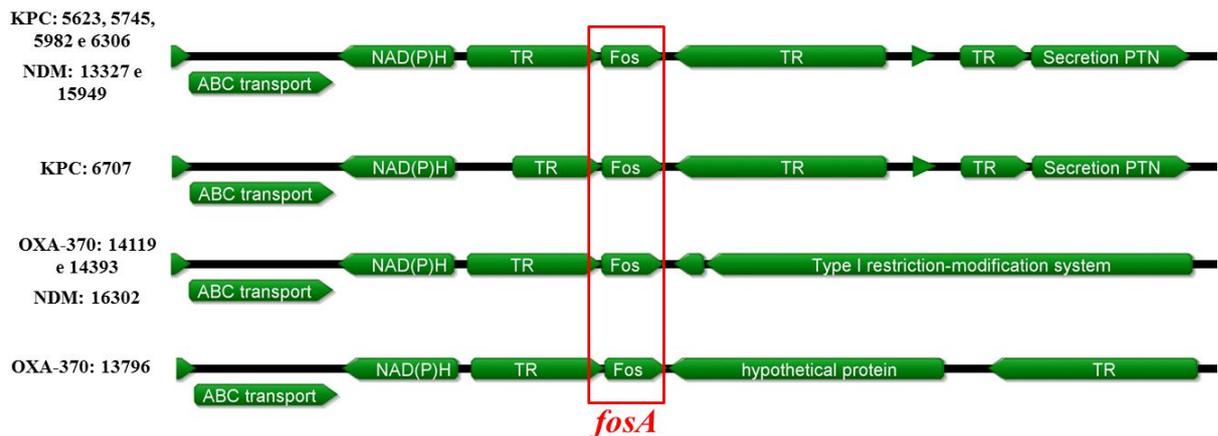
**Figura 4.19:** Figura representativa do ambiente genético dos genes *oqxA* e *oqxB* em todas as amostras incluídas no estudo.

#### 4.11.1.1.4 Ambiente genético dos genes *fosA*

O gene *fosA*, que tem sido associado à resistência a fosfomicina, também foi encontrado em todas as amostras sequenciadas incluídas no estudo. Nas amostras positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub> (CCBH5623, CCBH5745, CCBH5982 e CCBH6306) e nas amostras positivas para *bla*<sub>NDM-1</sub> (CCBH13327 e CCBH15949) este gene foi encontrado na mesma região do genoma que apresentou identidade de 99% com o cromossomo da *K. pneumoniae* ATCC BAA-2146 multirresistente produtora de NDM-1 pertencente ao ST11 coletada em 2010 nos Estados Unidos (Accession number: CP006659.2). A amostra positiva para *bla*<sub>KPC-2</sub> CCBH6707 apresentou estrutura semelhante, mas devido a uma deleção, o gene *upstream*, codificador de regulador de transcrição, está truncado.

Nas amostras positivas para *bla*<sub>OXA-370</sub> (CCBH14119 e CCBH14393) e na amostra positiva para *bla*<sub>NDM-1</sub> (CCBH16302) este gene foi flanqueado *downstream* por uma enzima codificadora de sistema Tipo 1 de restrição. Já na amostra CCBH14796, positiva para *bla*<sub>NDM-1</sub>, na região *downstream* ao gene observamos uma proteína hipotética. A imagem representativa das regiões onde o *fosA* foi encontrado esta abaixo (Figura 4.20).

### Amostras:



**Figura 4.20:** Figura representativa do ambiente genético do gene *fosA* nas amostras. Na área do retângulo vermelho, está sinalizado o gene *fosA* observado nas amostras. Legenda: TR: *transcriptional regulator*; ABC transport: *ABC transporter*; NAD(P)H: *NAD(P)H oxidoreductase*; Secretion PTN: *putative secretion protein*.

#### 4.11.2 Análise de mutações em genes relacionados à resistência a antimicrobianos

Realizamos pesquisa de mutações observadas nas proteínas relacionadas à resistência a quinolonas, tigeiclina, fosfomicina, regulador da bomba OqxAB (gene *oqxR*); e genes codificadores das porinas.

##### 4.11.2.1 Mutações relacionadas à resistência a quinolonas

Realizamos pesquisa de mutações na região determinante de resistência às quinolonas (*quinolone resistance determining region* - QRDR) nas proteínas codificadas pelos genes *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*. Encontramos mutações relacionadas à resistência a esta classe em GyrA, ParC e ParE. As amostras CCBH5623, CCBH5745 e CCBH 5982, que são positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub> pertencentes ao Complexo Clonal 11, apresentaram as mesmas mutações em GyrA (S83I) e em ParC (S81I) assim como as amostras CCBH14119 e CCBH14393 do ST16 positivas para *bla*<sub>OXA-370</sub> (GyrA - S83F e D87N; ParC – E84K; ParE – S459T). A amostra CCBH13796 apresentou duas mutações em GyrA: S83I; D87N.

Nas amostras CCBH6306 e CCBH6707 (positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub>); CCBH13327, CCBH15949 e CCBH16302 (positivas para *bla*<sub>NDM-1</sub>) não observamos nenhuma mutação. As mutações encontradas estão exemplificadas na Tabela 4.16.

**Tabela 4.16:** Mutações encontradas nas proteínas codificadas pelos genes alvo das quinolonas (*gyrA*, *parC* e *parE*).

Perfil de resistência	Amostra	ST	Mutações nas proteínas alvo das quinolonas		
			GyrA	ParC	ParE
Amostras positivas para <i>bla<sub>KPC-2</sub></i>	CCBH5623	437	S83I	S80I	WT
	CCBH5745	340	S83I	S80I	WT
	CCBH5982	11	S83I	S80I	WT
	CCBH6306	839	WT	WT	WT
	CCBH6707	25	WT	WT	WT
Amostras positivas para <i>bla<sub>NDM-1</sub></i>	CCBH13327	323	WT	WT	WT
	CCBH15949	37	WT	WT	WT
	CCBH16302	138	WT	WT	WT
Amostras positivas para <i>bla<sub>OXA-370</sub></i>	CCBH13796	1041	S83I; D87N	WT	WT
	CCBH14119	16	S83F; D87N	E84K	S459T
	CCBH14393	16	S83F; D87N	E84K	S459T

Legenda= WT: nenhuma mutação encontrada.

#### 4.11.2.2 Mutações relacionadas à resistência a tigeciclina

Realizamos pesquisa de mutações observadas nas proteínas geradas pelos genes codificadores da bomba de efluxo AcrAB-TolC (*acrA*, *acrB* e *tolC*) e reguladores dessa bomba de efluxo (*acrR*, *marA*, *marR*, *ramA*, *ramR*, *rob*, *rpsJ*, *soxR* e *soxS*), visto que esta bomba tem sido relacionada à resistência a tigeciclina e também a outros antimicrobianos. Comparamos as sequências das amostras com a sequência da amostra de *K. pneumoniae* MGH78578, sensível a esse antimicrobiano, depositada no GenBank (Número de acesso GenBank: CP000647.1). Avaliamos também a presença do gene *tetX*, que tem sido associado com resistência a tigeciclina.

Para avaliar se as mutações encontradas seriam deletérias ou neutras, utilizamos a plataforma on-line Provean (<http://provean.jcvi.org/index.php>) que é uma ferramenta que prevê se uma substituição de aminoácido, inserções ou deleções terão impacto sobre a função biológica da proteína.

O gene *tetX* não foi detectado nas amostras e não encontramos mutações no gene *rpsJ*. Na amostra CCBH5623, positiva para *bla<sub>KPC-2</sub>* e resistente à tigeciclina (CIM=4.0 µg/ml) encontramos mutações possivelmente deletérias de acordo com o Provean em RamA (ácido

aspártico para glicina na posição 27 - D27G) e RamR (troca de um triptofano por stop códon na posição 95 - W95stop).

Na amostra CCBH16302, resistente à tigeciclina (CIM=8.0 µg/ml) e positiva para *bla*<sub>NDM-1</sub> observamos três mutações consideradas possivelmente deletérias: uma inserção de sete aminoácidos em AcrB (LTISWLA), mutação com troca de uma serina para tirosina na posição 81 do TolC (S81Y) e uma troca de treonina para asparagina na posição 132 do Rob (T132A).

A amostra CCBH13796 apresentou duas mutações possivelmente deletérias: uma deleção de uma guanina na posição 69 a nível nucleotídico no gene *acrR* gerou alteração do quadro de leitura da proteína e um stop códon prematuro na posição 93. Essa amostra foi resistente à tigeciclina (CIM=4.0 µg/ml) e positiva para *bla*<sub>OXA-370</sub>.

Nas demais amostras, as mutações observadas não foram consideradas deletérias pelo *software* Provean. As mutações observadas e as predições do *software* estão demonstradas nas tabelas a seguir (Tabela 4.17 e Tabela 4.18).

**Tabela 4.17:** Mutações nas proteínas da bomba de efluxo AcrAB-TolC associada à resistência a tigeciclina e outros antimicrobianos comparando-se com a amostra de referência MGH78578.

Perfil de resistência	Amostra	ST	CIM TIG	Susc. TIG	Mutações nas proteínas da bomba de efluxo AcrAB-TolC comparando-se com a amostra de referência MGH78578		
					AcrA	AcrB	TolC
Amostras positivas para <i>bla<sub>KPC-2</sub></i>	CCBH5623	437	4.0	R	A188T	WT	N75T; I84V; E205G; N253G; S273N; S278T; I280V; S284R; S286N; H291_N292del; N293T; Q295L; Q296A; Q298N; N300S; A302N
	CCBH5745	340	1.5	I	A188T	WT	N75T; I84V; E205G; N253G; S273N; S278T; I280V; S284R; S286N; H291_N292del; N293T; Q295L; Q296A; Q298N; N300S; A302N
	CCBH5982	11	0.75	S	A188T	WT	N75T; I84V; E205G; N253G; S273N; S278T; I280V; S284R; S286N; H291_N292del; N293T; Q295L; Q296A; Q298N; N300S; A302N
	CCBH6306	839	0.5	S	WT	WT	WT
	CCBH6707	25	1.5	I	WT	WT	T482N
Amostras positivas para <i>bla<sub>NDM-1</sub></i>	CCBH13327	323	1,5	I	WT	WT	WT
	CCBH15949	37	2.0	I	A188T	WT	N75T; I84V; E205G; N253G; S273N; S278T; I280V; S284R; S286N; H291_N292del; N293T; Q295L; Q296A; Q298N; N300S; A302N
	CCBH16302	138	8.0	R	S257A; I301V	I235V; F281Y; A648G; E682Q; I728V; L824M; A841S; F917L; S1036T; D1038S; I1039M; E1040V; H1041T; S1042P; H1043V; Q1044F; V1045A; E1046T; H1047P; H1048I; <b>H1048_H1048delinsLTISWLA*</b>	N75T; N76S; Y78F; <b>S81Y*</b> ; N82K; G83D; I84Q; T114A; N223D; N228S; S273D; S275N; I280V; T283N; S284R; T290S; H291T; N292S; N293_Y297del; N300A; A302I; Q306K; N310S; A320M; T322N; V436I; V474M; T482_Q483insT; Q483M
Amostras positivas para <i>bla<sub>OXA-370</sub></i>	CCBH13796	1041	4.0	R	WT	WT	N75T; I84V; E205G; N253G; S273N; S278T; I280V; S284R; S286N; DEL291; N293T; Q295L; Q296A; Q298N; N300S; A302N
	CCBH14119	16	1.0	S	WT	WT	WT
	CCBH14393	16	2.0	I	WT	WT	WT

Legenda= WT: nenhuma mutação encontrada; CIM TIG: concentração inibitória mínima frente à tigeciclina em µg/ml; S: sensível; I: intermediária; R: resistente; \*: mutação predita como deletéria pelo *software* Provean.

**Tabela 4.18:** Mutações nas proteínas reguladoras da bomba de efluxo AcrAB-TolC associada à resistência a tigeciclina e outros antimicrobianos comparando-se com a amostra de referência MGH78578.

Perfil de resistência	Amostra	ST	CIM TIG	Susc. TIG	Mutações nas proteínas reguladoras da bomba de efluxo AcrAB-TolC associada à resistência a tigeciclina e outros antimicrobianos comparando-se com a amostra de referência MGH78578							
					AcrR	MarA	MarR	RamA	RamR	Rob	SoxR	SoxS
Amostras positivas para <i>bla<sub>KPC-2</sub></i>	CCBH5623	437	4	R	WT	WT	E85K	<b>D27G*</b>	<b>W95stop*</b>	WT	WT	WT
	CCBH5745	340	1.5	I	WT	WT	E85K	WT	WT	WT	WT	WT
	CCBH5982	11	0.75	S	WT	WT	E85K	WT	WT	WT	WT	WT
	CCBH6306	839	0.5	S	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	CCBH6707	25	1.5	I	WT	WT	WT	WT	I141T	WT	WT	WT
Amostras positivas para <i>bla<sub>NDM-1</sub></i>	CCBH13327	323	1,5	I	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	CCBH15949	37	2	I	WT	WT	WT	WT	A19V	WT	WT	WT
	CCBH16302	138	8	R	Y114F; V165I e S215P	N125_N125 delinsNCC	WT	Q99L	H186N	I131V; <b>T132A*</b> ; P135T; H213N	D142E	I26V; R29K
Amostras positivas para <i>bla<sub>OXA-370</sub></i>	CCBH13796	1041	4	R	<b>Deleção nucleotídeo G139 = frameshift; L93stop*</b>	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT
	CCBH14119	16	1	S	WT	WT	WT	WT	I141T	WT	WT	WT
	CCBH14393	16	2	I	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT	WT

Legenda= WT: nenhuma mutação encontrada; CIM TIG: concentração inibitória mínima frente à tigeciclina em µg/ml; S: sensível; I: intermediária; R: resistente; \*: mutação predita como deletéria pelo *software* Provean.

#### 4.11.2.3 Mutações nos reguladores da bomba OqxAB

De forma geral, a bomba OqxAB tem sido descrita associada à resistência a fluoroquinolonas, cloranfenicol, beta-lactâmicos e a tigeciclina. Realizamos pesquisa de mutações na proteína originária do gene *oqxR*, que codifica o repressor da bomba de efluxo OqxAB e na proteína originária de *rara*, que tem sido descrito como ativador dessa bomba. A superexpressão e mutações em RarA tem sido associadas principalmente a resistência a tigeciclina. Todas as 11 amostras sequenciadas possuíram o genes *oqxA*, *oqxB*, seu repressor *oqxR* (*upstream* do gene *oqxB*) e seu ativador *rara* (*downstream* do gene *oqxA*) como é possível observar na Figura 4.19.

Observamos duas mutações preditas como possivelmente deletérias pelo *software* Provean em OqxR: mutação V130A (troca de uma valina por alanina) nas amostras do CC11 positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub> (CCBH5623, CCBH5745 e CCBH5982) e inserção de oito resíduos LGRNGSIH na amostra CCBH13327, positiva para *bla*<sub>NDM-1</sub>.

Em RarA, observamos mutações preditas como deletérias na amostra CCBH16302 positiva para *bla*<sub>NDM-1</sub> (stop códon na posição 119) e alteração de uma glutamina por uma arginina na posição 96 da amostra CCBH13796 positiva para *bla*<sub>OXA-370</sub>. As mutações observadas e as predições de acordo com o *software* Provean estão descritas na (Tabela 4.19).

**Tabela 4.19:** Mutações nas proteínas codificadas pelos gene *oqxR* e *rara* comparando-se com a amostra de referência MGH78578

Perfil de resistência	Amostra	ST	OqxR	RarA
Amostras positivas para <i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	CCBH5623	437	<b>V130A*</b> ; H159_H159delinsALIIIFW	WT
	CCBH5745	340	<b>V130A*</b>	WT
	CCBH5982	11	<b>V130A*</b>	WT
	CCBH6306	839	WT	WT
	CCBH6707	25	WT	WT
Amostras positivas para <i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	CCBH13327	323	<b>T58_T58delinsTLGRNGSIH*</b>	WT
	CCBH15949	37	WT	WT
	CCBH16302	138	D95E; V137L	Q49H; K58Q; I64V; V112; <b>R119stop*</b>
Amostras positivas para <i>bla</i> <sub>OXA-370</sub>	CCBH13796	1041	WT	<b>Q96R*</b>
	CCBH14119	16	WT	V112A
	CCBH14393	16	WT	V112A

Legenda= WT: nenhuma mutação encontrada; \*: mutação predita como deletéria pelo *software* Provean.

#### 4.11.2.4 Mutações relacionadas à resistência a fosfomicina

Realizamos pesquisa de mutações observadas nas proteínas codificadas pelos genes relacionados à resistência a fosfomicina (*murA*, *glpT*, *uhpT*), comparando as sequências das amostras produtoras de carbapenemases com a amostra de referência *K. pneumoniae* MGH78578 (Número de acesso GenBank: CP000647.1) que é sensível a esse antimicrobiano. Comparamos as mutações encontradas com a amostra MGH78578, suscetível a esse antimicrobiano e utilizamos a plataforma on-line Provean (<http://provean.jcvi.org/index.php>) para avaliar se as mutações descritas seriam deletérias ou neutras.

Não observamos mutações consideradas possivelmente deletérias em nenhuma das amostras. As mutações encontradas estão na Tabela 4.20.

**Tabela 4.20:** Mutações nas proteínas codificadas pelos genes relacionados à resistência a polimixina comparando-se com a amostra de referência MGH78578

Perfil de resistência	Amostra	Susc. FOT	Mutações nas proteínas codificadas pelos genes relacionados à resistência a fosfomicina comparando-se com a amostra de referência MGH78578		
			GlpT	MurA	UhpT
Amostras positivas para <i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	CCBH5623	NS	WT	WT	A462T
	CCBH5745	S	WT	WT	A462T
	CCBH5982	S	WT	WT	A462T
	CCBH6306	NS	WT	WT	A462T
	CCBH6707	S	WT	WT	A462T
Amostras positivas para <i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	CCBH13327	S	WT	WT	A462T
	CCBH15949	S	WT	WT	A462T
	CCBH16302	S	G196A; K234E; E237Q; I260V; I429V	S148N; T206S; S210T	V434I, A462T
Amostras positivas para <i>bla</i> <sub>OXA-370</sub>	CCBH13796	S	WT	WT	A462T
	CCBH14119	S	WT	WT	A462T
	CCBH14393	S	WT	WT	A462T

Legenda= WT: nenhuma mutação encontrada; Susc. FOT: susceptibilidade a fosfomicina; NS: não suscetível; S: suscetível.

#### 4.11.2.5 Mutações nos genes codificadores de porinas

Pesquisamos mutações nas porinas OmpK35 e OmpK36 comparando as sequências das amostras produtoras de carbapenemases com as sequências definidas como porinas selvagens (sem mutações) em artigos da literatura (Número de acesso GenBank: AJ011501 - OmpK35; Z33506 - OmpK36) (206, 207). Também avaliamos se as mutações são classificadas como possivelmente deletérias de acordo com o *software* Provean comparando-as com as sequências selvagens das proteínas. As sequências encontradas em nossas amostras e as diferenças quando comparadas com essas sequências de referência estão na (Tabela 4.21).

Encontramos mutações preditas como possivelmente deletérias através do *software* Provean em todas as amostras sequenciadas. Nas amostras positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub> do CC11 (CCBH5623, CCBH5745 e CCBH5982) e na amostra CCBH15949, positiva para *bla*<sub>NDM-1</sub>, observamos a OmpK35 selvagem. A OmpK36 dessas amostras possui duas mutações consideradas possivelmente deletérias quando comparadas a porina selvagem: uma inserção de três resíduos na posição 184 (183,A,ALSP) e troca dos resíduos treonina e ácido aspártico por leucina e glicina na posição 222 (222,TD,LG).

A amostra CCBH6306 apresentou mutações possivelmente deletérias na OmpK36: uma inserção de três resíduos na posição 184 (183,A,ALSP), troca dos resíduos treonina e ácido aspártico por leucina e glicina na posição 222 (222,TD,LG), troca de uma asparagina por um ácido aspártico na posição 272 (N272D), a mudança de um ácido aspártico por uma asparagina na posição 302 (D302N) e uma troca de um asparagina e glicina por oito resíduos na posição 304 (QNNFTGVN).

Na amostra CCBH6707 observamos que a inserção de uma citosina na posição 1609 do gene que codifica a porina OmpK36 gerou alteração do frame de leitura, causando um stop códon prematuro na posição 22 (A22stop).

Na amostra CCBH13327, positiva para *bla*<sub>NDM-1</sub>, observamos diferenças nos 33 primeiros resíduos da OmpK36. A primeira metionina, que é o códon de iniciação de leitura, foi encontrada 33 nucleotídeos após a metionina que dá início à transcrição na sequência da porina selvagem, gerando provavelmente uma proteína deficiente em 33 aminoácidos. Esta mutação, diferentemente das demais encontradas nessa amostra, foi predita como possivelmente deletéria pelo *software* Provean.

Na amostra CCBH16302, positiva para *bla*<sub>NDM-1</sub>, observamos na OmpK35 a inserção de uma lisina e uma glutamina no lugar de um ácido glutâmico na posição 257 (E257delinsKQ) bem como a inserção de uma alanina na posição 338 no lugar de um ácido aspártico (D338A). Ambas as mutações foram preditas como possivelmente deletérias.

Na amostra CCBH13796 observamos as seguintes mutações possivelmente deletérias na OmpK36: uma inserção de três resíduos na posição 184 (183,A,ALSP), a troca dos resíduos treonina e ácido aspártico por leucina e glicina na posição 222 (222,TD,LG) e um stop códon na posição 279 (E279stop).

Nas amostras CCBH14119 e CCBH14393, observamos as mesmas mutações. Na OmpK35, foi detectado um stop códon prematuro na posição 172 (Q172stop) e na OmpK36 três mutações possivelmente deletérias foram previstas: uma inserção de um ácido aspártico na posição 135 (D135delinsDD), uma troca de uma alanina e leucina por um triptofano e serina na posição 190, além da troca de uma asparagina por ácido glutâmico e arginina na posição 304.

**Tabela 4.21:** Mutações encontradas nas porinas OmpK35 e OmpK36.

Perfil de resistência	Amostra	ST	Mutações na OmpK35 em comparação com Porina WT (AJ011501)	Mutações na OmpK36 em comparação com Porina WT (Z33506)
Amostras positivas para <i>bla<sub>KPC-2</sub></i>	CCBH5623	437	WT	D49S; L59V, <b>183,A,ALSP*</b> ; G189T; F198Y; V202L; F207Y; A217S, <b>222,TD,LG*</b> ; 227Q,SK; L229A; E232R; H235N; A280V; N304E; 345,RS,HN
	CCBH5745	340	WT	D49S; L59V, <b>183,A,ALSP*</b> ; G189T; F198Y; V202L; F207Y; A217S, <b>222,TD,LG*</b> ; 227Q,SK; L229A; E232R; H235N; A280V; N304E; 345,RS,HN
	CCBH5982	11	WT	D49S; L59V, <b>183,A,ALSP*</b> ; G189T; F198Y; V202L; F207Y; A217S, <b>222,TD,LG*</b> ; 227Q,SK; L229A; E232R; H235N; A280V; N304E; 345,RS,HN
	CCBH6306	839	E132K	D49S; L59V; V178P; <b>183,A,ALSP*</b> ; G189T; F198Y; V202L; F207Y; A217S; <b>222,TD,LG*</b> ; 226,NQ,NSK; L229A; E232R; H235N; <b>N272D*</b> ; A280V; <b>D302N*</b> ; <b>304,NG,QNNFTGVN*</b> ; D340E; S342D; S346K
	CCBH6707	25	WT	<b>Inserção de nucleotídeo C1609 = frameshift; A22stop*</b>
Amostras positivas para <i>bla<sub>NDM-1</sub></i>	CCBH13327	323	WT	<b>M1_D33del*</b> ; L34M; A183T; L184del; T192G; Y201F; N221H; L225N; 230,SKLAL,RLDK; L307I; I315L; D344E; 269,AGSL,FSGNGESDSIS; 346D; H349R; N350R
	CCBH15949	37	WT	D49S; L59V, <b>183,A,ALSP*</b> ; G189T; F198Y; V202L; F207Y; A217S, <b>222,TD,LG*</b> ; 227Q,SK; L229A; E232R; H235N; A280V; N304E; 345,RS,HN
	CCBH16302	138	I74T; T93P; A182S; R184H; S211G; I241V; <b>E257delinsKQ*</b> ; D258G; H250Y; S296A; A298G; I311V; <b>D338A*</b> ; K341R; A342E	D49S; L59V; L191Q; 217,AN,SH; Q227N; L229V; E232N; H235N; A280V N304E; S346N
Amostras positivas para <i>bla<sub>OXA-370</sub></i>	CCBH13796	1041	WT	D49S; L59V, <b>183,A,ALSP*</b> ; G189T; F198Y; V202L; F207Y; A217S, <b>222,TD,LG*</b> ; 227Q,SK; L229A; E232R; H235N; <b>E279stop*</b> A280V; N304E; 345,RS,HN
	CCBH14119	16	<b>Q172stop*</b>	D49S; L59V; <b>135,D,DD*</b> ; <b>190,AL,WS*</b> ; V202L; F207W; 217,AN,SH; D224E; 227,QLLL,SVPA; E232R; H235N; T254S; A280V; <b>304,N,ER*</b> ; D340E; S342D; S346K
	CCBH14393	16	<b>Q172stop*</b>	D49S; L59V; <b>135,D,DD*</b> ; <b>190,AL,WS*</b> ; V202L; F207W; 217,AN,SH; D224E; 227,QLLL,SVPA; E232R; H235N; T254S; A280V; <b>304,N,ER*</b> ; D340E; S342D; S346K

Legenda= WT: nenhuma mutação encontrada; \*: mutação prevista como deletéria pelo *software* Provean.

Na Tabela 4.22 é possível observar todas as mutações previstas como deletérias pelo *software* Provean encontradas nas 11 amostras produtoras de carbapenemases sequenciadas.

**Tabela 4.22:** Mutações encontradas nas proteínas codificadas pelos genes alvo das quinolonas, bomba de efluxo, reguladores de bomba de efluxo e porinas preditas como deletérias de acordo com o *software* Provean.

Amostra	ST	Susc. aos ATB	Mat. clínico	Amb. carbapenem.		Proteínas alvo das quinolonas			Codificadores da Bomba de Efluxo AcrAB-TolC		Reguladores de bombas de efluxo					Porinas			
				Transp	Plas	GyrA	ParC	ParE	AcrB	TolC	AcrR	RamA	RamR	Rob	RarA	OqxR	OmpK35	OmpK36	
<i>bla<sub>KPC-2</sub></i>	5623	437	AK, PB	Sangue	Tn4401b	40kb	S83I	S80I	-	-	-	-	D27G	W95 stop	-	-	V130A	-	183,A,ALSP; 222,TD,LG
	5745	340	AK, FOT, PB	Urina	Tn4401b	40kb	S83I	S80I	-	-	-	-	-	-	-	-	V130A	-	183,A,ALSP; 222,TD,LG
	5982	11	AK, FOT, TIG, PB	Sangue	Tn4401b	40kb	S83I	S80I	-	-	-	-	-	-	-	-	V130A	-	183,A,ALSP; 222,TD,LG
	6306	839	FEP, CAZ, GN,AK, SXT,TIG, PB	Sangue	Tn4401b	40kb	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	183,A,ALSP; 222,TD,LG; N272D; D302N; 304,NG,QNNF TGVN;
	6707	25	FOT, PB	Urina	<i>ISKpn6 e tnpA</i>	33kb	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A22stop
<i>bla<sub>NDM-1</sub></i>	13327	323	FOT, PB	Swab retal	<i>ISAbal25</i>	190 kb	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T58_T58 delinsTLG RNSIH	-	M1_D33del
	15949	37	FOT, PB	Sangue	<i>ISAbal25</i>	ND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	183,A,ALSP; 222,TD,LG
	16302	138	AK, FOT, PB	Swab retal	<i>ISAbal25</i>	ND	-	-	-	H1048delins LTISWLA	S81Y	-	-	-	T132A	R119 stop	-	E257delins KQ; D338A	-
<i>bla<sub>OXA-370</sub></i>	13796	1041	AK, FOT, PB	Asp. traqueal	ND	50kb	S83I; D87N	-	-	-	-	-	L93 stop	-	-	-	Q96R	-	183,A,ALSP; 222,TD,LG; E279stop
	14119	16	GN, FOT, TIG, PB	Swab retal	ND	ND	S83F; D87N	E84K	S459T	-	-	-	-	-	-	-	-	Q172stop	135,D,DD; 190,AL,WS; 304,N,ER;
	14393	16	FOT, PB	Swab retal	ND	25kb	S83F; D87N	E84K	S459T	-	-	-	-	-	-	-	-	Q172stop	135,D,DD; 190,AL,WS; 304,N,ER;

Legenda: Susc. aos ATB: susceptibilidade aos antimicrobianos; Mat. Clínico: material clínico; Transp: transposon; Plasm: plasmídeo; Asp.: aspirado

### 4.11.3 Genes relacionados à virulência

Pesquisamos genes de virulência através de comparação com o banco de dados do Instituto Pasteur BIGSdb-Kp e busca individual dos genes detectados através de PCR que não estão incluídos no banco. Os genes encontrados estão descritos na Tabela 4.23.

**Tabela 4.23:** Genes de virulência encontrados nas amostras produtoras de carbapenemases.

Perfil de resistência	Amostra	Material Clínico	Susc. aos ATB	ST	Genes de virulência encontrados no sequenciamento genômico
Amostras positivas para <i>bla<sub>KPC-2</sub></i>	CCBH5623	Sangue	AK, PB	437	<i>entB, fimH, ycfM, mrk cluster</i>
	CCBH5745	Urina	AK, FOT, PB	340	<i>entB, fimH, ycfM, mrk cluster, ybtS</i>
	CCBH5982	Sangue	AK, FOT, TIG, PB	11	<i>entB, fimH, ycfM, mrk cluster</i>
	CCBH6306	Sangue	FEP, CAZ, GN, AK, SXT, TIG, PB	839	<i>entB, fimH, ycfM, mrk cluster, allS, ybtS</i>
	CCBH6707	Urina	FOT, PB	25	<i>entB, fimH, ycfM, mrk cluster</i>
Amostras positivas para <i>bla<sub>NDM-1</sub></i>	CCBH13327	Swab retal	FOT, PB	323	<i>entB, fimH, ycfM, mrk cluster</i>
	CCBH15949	Sangue	FOT, PB	37	<i>entB, fimH, ycfM, mrk cluster, kfuABC</i>
	CCBH16302	Swab retal	AK, FOT, PB	138	<i>entB, fimH, ycfM, mrk cluster, allS</i>
Amostras positivas para <i>bla<sub>OXA-370</sub></i>	CCBH13796	Aspirado traqueal	AK, FOT, PB	1041	<i>entB, fimH, ycfM, mrk cluster</i>
	CCBH14119	Swab retal	GN, FOT, TIG, PB	16	<i>entB, fimH, ycfM, mrk cluster</i>
	CCBH14393	Swab retal	FOT, PB	16	<i>entB, fimH, ycfM, mrk cluster</i>

### 4.11.4 Análise da relação filogenética entre as amostras produtoras de carbapenemases

A análise filogenética foi realizada utilizando o *software* disponível na rede CSI Phylogeny 1.1 (<https://cge.cbs.dtu.dk//services/CSIPhylogeny/>). Realizamos a análise com as 11 amostras incluídas no sequenciamento genômico, incluindo com grupo externo a cepa CAV1099 da espécie *Klebsiella oxytoca* (Número de acesso GenBank: NZ\_CP011597.1).

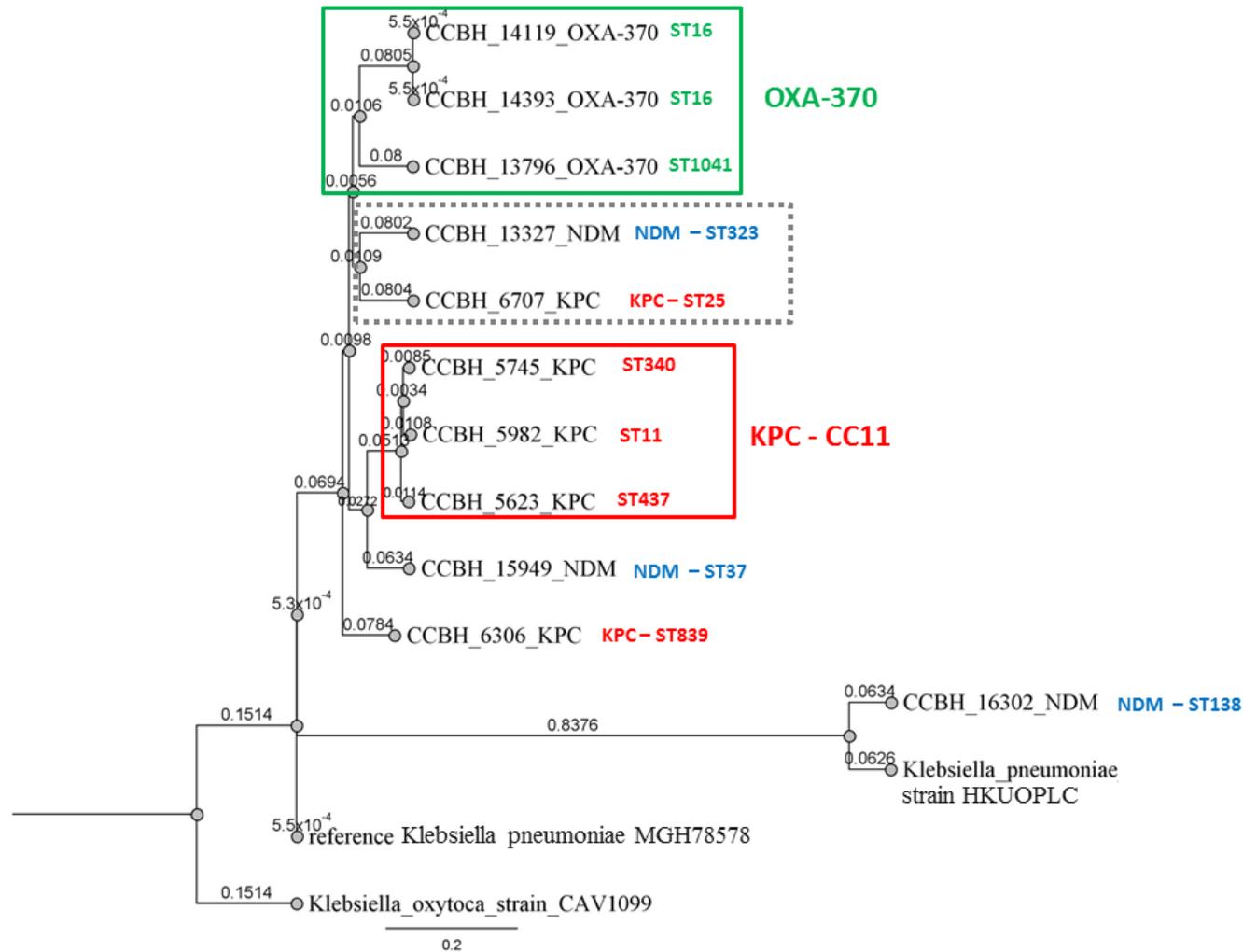
A filogenia é inferida por esta metodologia a partir da comparação das amostras com os SNP de uma cepa de referência. Utilizamos como amostra de referência o cromossomo da cepa de *K. pneumoniae* MGH78578 (Número de acesso GenBank: CP000647.1). Decidimos manter a amostra possivelmente contaminada (CCBH13796) nesta análise visto que o *software* avalia somente regiões presentes no genoma de referência, comparando os SNP e inferindo a distância entre elas.

Nas análises de mutações em genes associados à resistência, observamos que a amostra CCBH16302 apresentou várias mutações quando comparada a amostra MGH78578. Através de análises de BLAST com as sequências de DNA codificadoras das proteínas estudadas, observamos que esta amostra apresentava identidade em torno de 95% a 100% com diferentes genes de uma amostra do banco de dados: *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* cepa HKUOPLC (Número de acesso GenBank: CP012300.1). Este genoma foi depositado no banco de dados em 2015 e a amostra de *K. pneumoniae* foi proveniente de fezes de panda gigante, isolada em Hong Kong. Dessa forma, decidimos também incluir essa amostra em nossa análise filogenética para compará-las.

As amostras pertencentes ao CC11 positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub> sequenciadas (CCBH5623, CCBH5745 e CCBH5982) ficaram agrupadas na árvore, assim como as amostras CCBH14393 e CCBH14119, positivas para *bla*<sub>OXA-370</sub> pertencentes ao ST16, corroborando os resultados do MLST.

As amostras CCBH6707 (positiva para *bla*<sub>KPC-2</sub>) e a amostra CCBH13327 (positiva para *bla*<sub>NDM-1</sub>) também ficaram agrupadas na árvore. Elas foram designadas como ST25 e ST323 respectivamente através do MLST e compartilham quatro dos sete genes do esquema (*gapA*, *infB*, *mdh* e *pgi*).

A amostra CCBH16302 ficou agrupada com a amostra HKUOPLC, proveniente de fezes de panda de Hong Kong. Elas foram consideradas próximas entre si, mas distantes das demais amostras. A árvore filogenética obtida pode ser observada a seguir (Figura 4.21).



**Figura 4.21:** Árvore filogenética das amostras produtoras de carbapenemase em comparação com outras amostras produzida através do *software* CSI Phylogeny. Sinalizadas e agrupadas em verde encontram-se as amostras positivas para  $bla_{OXA-370}$ . Sinalizadas e agrupadas em vermelho, encontram-se as amostras positivas para  $bla_{KPC-2}$ . Sinalizadas em azul estão as amostras positivas para  $bla_{NDM-1}$ . Agrupadas com um retângulo pontilhado estão as amostras que compartilham quatro dos sete genes do esquema de MLST.

## 5. DISCUSSÃO

O fenômeno da resistência bacteriana, principalmente em infecções hospitalares, é atualmente um grande problema de saúde pública. Neste cenário, bactérias Gram-negativas multirresistentes tem apresentado destaque. Amostras de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases multirresistentes tem sido cada dia mais isoladas em todo mundo, apresentando grande importância epidemiológica (208). As carbapenemases mais frequentemente associadas a *K. pneumoniae* na atualidade tem sido as do tipo KPC, NDM e OXA-48-like (46).

Assim, para este estudo, foram selecionadas 66 amostras (32 amostras positivas para  $bla_{KPC-2}$ , 12 amostras positivas para  $bla_{NDM-1}$  e 22 amostras positivas para  $bla_{OXA-48-like}$ ). O critério para a seleção das amostras positivas para  $bla_{KPC-2}$  foi a inclusão de cepas da Coleção de Culturas de Bactérias de Origem Hospitalar (CCBH) representantes dos principais clones (definidos por MLST) presentes no período onde observamos a grande disseminação de KPC em nosso país (2010), a partir dos resultados obtidos durante a dissertação de mestrado. Já para as amostras positivas para  $bla_{NDM-1}$  e  $bla_{OXA-48-like}$ , o critério foi a inclusão de cepas provenientes do período onde observamos o início da disseminação dessas carbapenemases em nosso país, entre 2013 e julho de 2014, isoladas no estado do Rio de Janeiro. Desejamos com essa seleção observar e comparar as principais diferenças e semelhanças entre cepas de *K. pneumoniae* carregando as carbapenemases de maior importância clínica na atualidade.

Nas amostras de nosso trabalho, encontramos as variantes alélicas  $bla_{KPC-2}$ ,  $bla_{NDM-1}$  e  $bla_{OXA-370}$ . No Brasil, até o momento, somente essas variantes desses genes foram descritas, sendo dois relatos publicados da variante  $bla_{OXA-370}$ : um no Rio Grande do Sul, em *E. hormaechei* (115) e outro do nosso trabalho com amostras do Rio de Janeiro (*K. pneumoniae*, *E. cloacae* e *E. aerogenes*) (116), entretanto diferentes relatos de KPC-2 (67, 75) e NDM-1 tem sido descritos (90-93).

*K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases têm sido associadas a diferentes tipos de infecções, mas também a colonização. Entre as amostras selecionadas para nosso estudo, 36% das amostras (90% das amostras positivas para  $bla_{OXA-370}$  e 33,3% das amostras positivas para  $bla_{NDM-1}$ ) foram isoladas a partir de swabs retais. O Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar (LAPIH), que recebe usualmente amostras bacterianas resistentes para identificação dos mecanismos de resistência, recebeu entre 2010 e junho de 2014, período de nosso estudo, 5.211 amostras de *K. pneumoniae*. Dentre elas, 28% das 3.968 amostras

positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub> foram originárias de swab retal e 30% das 20 das amostras positivas para *bla*<sub>NDM-1</sub> foram deste mesmo material clínico. Se tratando das amostras positivas para *bla*<sub>OXA-48-like</sub>, observamos um percentual mais expressivo, sendo isoladas de swab retal 71% das 32 amostras.

A maior detecção de genes *bla*<sub>OXA-48-like</sub> em *K. pneumoniae* provenientes de swab retal condiz com o estudo realizado por Potron e colaboradores (2013). Neste trabalho eles avaliaram enterobactérias produtoras de OXA-48-like isoladas num período de 2001 a 2011 de diversos países do norte da África, Mediterrâneo e Europa. Foi observado que 62,6% das amostras produtoras de OXA-48 pertenciam a espécie *K. pneumoniae*, sendo 30,8% isoladas de swab retal (104). Vale ressaltar que as amostras positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub> foram selecionadas a partir da dissertação de mestrado, onde não foram incluídas amostras oriundas deste material clínico.

As amostras positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub> (n=32) foram isoladas de onze estados de todas as cinco regiões geográficas do nosso país (Alagoas, Amazonas, Ceará, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Pernambuco, Rio de Janeiro e Santa Catarina). Já as amostras positivas para *bla*<sub>NDM-1</sub> e *bla*<sub>OXA-370</sub> foram isoladas do Rio de Janeiro. Dessa forma, os dois estados com o maior número de amostras foram Rio de Janeiro - RJ (56%, 37 amostras - NDM-1=12; OXA-370=22 e KPC-2=4) e Distrito Federal - DF (14,9%; KPC-2=10).

Acreditamos que o número expressivo de amostras recebidas do Rio de Janeiro seja devido à localização do LAPIH na cidade do Rio de Janeiro. Em relação ao Distrito Federal, o grande número de amostras positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub> recebidas foi devido a surtos ocorridos em hospitais dessa localidade no período do estudo. A Secretaria de Saúde do DF registrou 18 óbitos e 108 casos de infecções em 2010 (209). Dessa forma, foi expedido um documento com orientações sobre o manejo de surtos de bactérias multirresistentes produtoras de carbapenemases que incluíam cuidados com o paciente e reforço nas medidas de controle de infecção (210). A ANVISA expediu uma nota técnica (NT 01/2010) (211) visando medidas para identificação e detecção desse mecanismo de resistência e confeccionou nova resolução restritiva ao uso de antimicrobianos (RDC 20/ 2011) com o objetivo de regulamentar a dispensação de antimicrobianos evitando, assim, o mau uso e o uso excessivo com o objetivo de diminuir a seleção de bactérias multirresistentes (212). Acredita-se que a adoção dessas medidas pelo governo, juntamente com a utilização das mesmas pelos profissionais de saúde, possam auxiliar a reduzir a ocorrência de surtos de patógenos multirresistentes dessa natureza.

A produção de carbapenemases promove em geral a resistência aos beta-lactâmicos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenemas, monobactâmicos e às associações de beta-lactâmicos com inibidores (45). Esta produção tem sido regularmente encontrada em bastonetes Gram-negativos da família *Enterobacteriaceae* multirresistentes, principalmente em amostras de *K. pneumoniae* (41). Entretanto, beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) também tem sido descritas associadas a cepas produtoras de carbapenemases contribuindo assim para o fenótipo de resistência frente aos beta-lactâmicos (208).

Entre as amostras estudadas, observamos alta resistência aos beta-lactâmicos testados: cefotaxima (98,4%), cefepime (96,9%), ceftazidima (95,4%), piperacilina/tazobactam (100%), para meropenem (98,5%) e imipenem (96,9%). Além das carbapenemases encontradas, em nosso estudo encontramos alta positividade dos genes codificadores de beta-lactamases: *bla*<sub>CTX-M</sub> (n= 51; 77,2%), *bla*<sub>SHV</sub> (n=63; 95,4%) e *bla*<sub>TEM</sub> (n= 59; 89,5%). A associação de todas as beta-lactamases pesquisadas foi o perfil de detecção de genes mais observado, correspondendo a 66,6% das amostras.

Apesar de as carbapenemases oferecerem resistência aos beta-lactâmicos, em algumas amostras produtoras de carbapenemases é possível observar sensibilidade *in vitro* a algum dos representantes desses antimicrobianos. Bratu e colaboradores (2005) observaram 2% de sensibilidade a ceftazidima e 40% de sensibilidade ao cefepime em amostras produtoras de KPC-2 (213). Castanheira e colaboradores em 2008 encontraram 40% de sensibilidade ao cefepime também em amostras produtoras de KPC-2 (214).

Em nosso trabalho, observamos 3,1% de sensibilidade a cefotaxima, 6,2% ao cefepime e 9,4% a ceftazidima nas amostras positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub> enquanto todas as amostras positivas para *bla*<sub>NDM-1</sub> e *bla*<sub>OXA-370</sub> foram resistentes a estes antimicrobianos. Dentre as amostras positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub>, 68,7% apresentaram positividade para o gene *bla*<sub>CTX-M</sub>, enquanto que nas amostras positivas para *bla*<sub>NDM-1</sub> e *bla*<sub>OXA-370</sub>, essa ESBL foi mais observada (75% e 90,9%, respectivamente). Assim, acreditamos que a maior associação dos genes *bla*<sub>NDM-1</sub> e *bla*<sub>OXA-370</sub> com o *bla*<sub>CTX-M</sub> pode ter contribuído para o fenótipo de plena resistência aos beta-lactâmicos nos testes de sensibilidade.

Por outro lado, apesar da sensibilidade *in vitro* apresentada frente a alguns antimicrobianos nas amostras produtoras de KPC-2, acredita-se que a presença do gene codificador de carbapenemase confira resistência *in vivo* a essa classe de antimicrobianos. Outro fator relevante é que existe também a possibilidade de seleção *in vivo* de amostras mais

resistentes que possuam outros mecanismos de resistência aos beta-lactâmicos associados tais como a diminuição da expressão de porinas (208).

Em relação à comparação da variação das CIM, observamos que as amostras positivas para *bla*<sub>OXA-370</sub> apresentaram menores concentrações inibitórias mínimas frente à meropenem e imipenem quando comparadas às amostras positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub> e *bla*<sub>NDM-1</sub> com valor de p significativo.

Devido ao perfil de hidrólise diferenciado das enzimas da família OXA-48-like, as bactérias produtoras de enzimas dessa família apresentam diferentes padrões de resistência aos beta-lactâmicos, com algumas amostras suscetíveis a cefalosporinas de amplo espectro e carbapenemas e outras suscetíveis às cefalosporinas de amplo espectro e resistentes aos carbapenemas sendo algumas resistentes às cefalosporinas de amplo espectro e carbapenemas (99). A enzima OXA-48 hidrolisa penicilinas em um alto nível, entretanto apresenta baixo perfil de hidrólise frente aos carbapenemas e atividade muito fraca contra cefalosporinas de amplo espectro. Já a enzima OXA-163 tem fraca atividade contra carbapenemas e alta hidrólise frente às cefalosporinas de amplo espectro, tendo perfil semelhante às ESBL (99). Apesar do perfil de hidrólise da enzima OXA-370 ainda não ter sido estabelecido, Sampaio e colaboradores observaram baixa concentração inibitória mínima frente aos carbapenemas nas *E. coli* transformantes portadoras do gene *bla*<sub>OXA-370</sub> (115).

Realizamos comparações entre as 10 sequências de genes da família *bla*<sub>OXA-48-like</sub> disponíveis no GenBank com intuito de avaliar se as diferenças em nível proteico encontradas seriam consideradas deletérias ou neutras pelo *software* Provean, ou seja, se provavelmente afetariam ou não a função da enzima quando comparada a sequência da OXA-48. Observamos que a única mutação descrita na OXA-370 (substituição de uma serina por um ácido glutâmico na posição 212 - S212E) em comparação com a sequência da OXA-48 não foi predita como possivelmente deletéria pelo *software*.

Através da avaliação da estrutura tridimensional da OXA-48 por cristalografia, Docquier e colaboradores (215) identificaram a região do sítio ativo (que contempla os resíduos Arg-214, Gln-124, Ile-102 e Ser-244), os resíduos conservados essenciais para a conformação tridimensional (Ser-70, Lys-73 e Arg-250), além dos três motivos comuns das enzimas da família OXA (motivo I: Ser-70, Thr-71, Phe-72 e Lys-73; motivo II: Ser-118, Val-119, and Val-120; motivo III: Lys-208, Thr-209, and Gly-210) sendo que a posição 212 não foi classificada em nenhuma das categorias.

Assim, acreditamos que a concentração inibitória mínima menor das amostras positivas para *bla*<sub>OXA-370</sub> para imipenem e meropenem quando comparadas às amostras positivas para *bla*<sub>NDM-1</sub> e *bla*<sub>KPC-2</sub> possa ser em parte explicada pela maior capacidade hidrolítica das enzimas NDM e KPC frente aos carbapenemas quando comparadas a enzimas da família OXA-48-like que sabidamente tem menor hidrólise frente aos carbapenemas (99). Acreditamos também que a presença de beta-lactamases de espectro estendido, como o gene *bla*<sub>CTX-M</sub>, em amostras produtoras dessa família de enzimas, pode também contribuir para a resistência aos beta-lactâmicos.

As ESBL do tipo CTX-M são as mais importantes descritas na atualidade em amostras clínicas. Em nosso trabalho observamos esse gene em 77,2% das amostras produtoras de carbapenemases. Na China, observou-se que 59,6 % das amostras produtoras de KPC-2 apresentavam as beta-lactamases CTX-M-14 ou CTX-M-15 (216). Em estudo com 16 amostras produtoras de KPC-2 oriundas dos EUA, Suécia, Colômbia, Israel, Brasil e Grécia foi observada a presença de CTX-M-2 (31.3%), CTX-M-12 (12.5%), CTX-M-15 (18.7%) (217). Resultados semelhantes também foram encontrados no estudo de Potron e colaboradores (2013) com amostras produtoras de OXA-48, em que foi evidenciada a presença de ESBL em 75% das amostras (80 das 107 amostras), sendo o gene *bla*<sub>CTX-M</sub> o mais encontrado (104). Em um estudo recentemente publicado com 11 amostras resistentes aos carbapenemas isoladas do Marrocos e produtoras de OXA-48 e NDM-1, observou-se *bla*<sub>CTX-M-15</sub> em nove amostras e *bla*<sub>CTX-M-28</sub> em um (218).

No Brasil, em uma Tese de Doutorado publicada em 2015 onde amostras de *K. pneumoniae* produtoras de KPC-2 foram estudadas, o gene *bla*<sub>CTX-M</sub> foi encontrado em 58% das amostras isoladas em hospitais de São Paulo e em 76% das amostras de São José do Rio Preto (219). Seki e colaboradores também encontraram alta porcentagem de amostras produtoras de CTX-M em amostras de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL no Rio de Janeiro. Neste trabalho, *bla*<sub>CTX-M</sub> foi encontrado em 49% das 121 *K. pneumoniae* estudadas sendo que destas 64% apresentavam a variante CTX-M-15 (44).

O gene *bla*<sub>SHV</sub> foi o mais encontrado nas amostras estudadas, sendo observado em mais de 91% das amostras produtoras de carbapenemases. Acreditamos que o alto percentual de amostras que possuíram essa beta-lactamase esteja relacionado à presença deste gene no cromossomo de amostras dessa espécie visto que existem três famílias de genes codificadores de beta-lactamases constitutivas em *K. pneumoniae*: *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>OKP</sub> e *bla*<sub>LEN</sub> (36).

O gene *bla*<sub>TEM</sub> foi encontrado em todas as amostras positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub> e *bla*<sub>NDM-1</sub> enquanto foi observado em 68,1% (n=15) das amostras positivas para *bla*<sub>OXA-370</sub>, sendo estatisticamente significativa a menor detecção desse gene entre amostras positivas para *bla*<sub>OXA-370</sub> quando comparado com as demais. Em um estudo recentemente publicado com 11 amostras resistentes aos carbapenemas isoladas do Marrocos, nove foram produtoras de OXA-48 e duas de NDM-1. Neste estudo, os genes *bla*<sub>TEM</sub> e *bla*<sub>SHV</sub> foram encontrados em nove e oito amostras respectivamente (218). Tavares e colaboradores também observaram a presença de genes codificadores de beta-lactamases em amostras produtoras de carbapenemases pertencentes a nove espécies da família *Enterobacteriaceae* em nosso país. Neste estudo, foi observada associação de *bla*<sub>KPC-2</sub> com outras beta-lactamases em 53% das amostras, sendo o gene *bla*<sub>TEM</sub> encontrado em 45,8% e *bla*<sub>SHV</sub> em 6% (75). Poirel e colaboradores (2004) observaram em *K. pneumoniae* produtoras de OXA-48 a co-expressão de outras beta-lactamases, incluindo as ESBL (SHV-2, TEM-1, OXA-47) (100).

Vale ressaltar que não foi possível confirmar se as variantes alélicas dos genes *bla*<sub>SHV</sub> e *bla*<sub>TEM</sub> eram classificadas como ESBL visto que não foi possível realizar o sequenciamento dos produtos amplificados já que algumas das enzimas dessas duas classes de enzimas não apresentam fenótipo ESBL.

Além da resistência aos beta-lactâmicos, amostras produtoras de carbapenemases têm mostrado resistência às variadas classes de antimicrobianos, se tornando multirresistentes aos antimicrobianos utilizados normalmente na clínica. Dessa forma, as infecções por *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases se tornaram de difícil tratamento devido à existência de limitadas escolhas terapêuticas para combater amostras resistentes.

Observamos entre as amostras produtoras de carbapenemases do nosso trabalho 68,1% de resistência a amicacina e 63,6% de resistência a gentamicina. Através da análise estatística, observamos que as amostras positivas para *bla*<sub>OXA-370</sub> foram significativamente mais resistentes a amicacina. Em relação à gentamicina, não observamos diferenças estatisticamente significativas: 65,2% de resistência nas amostras positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub>; 75% nas amostras positivas para *bla*<sub>NDM-1</sub> e 54,5% nas positivas para *bla*<sub>OXA-370</sub>.

Na literatura, diferentes percentuais de resistência a amicacina têm sido descritos em amostras produtoras de carbapenemases. Bratu e colaboradores (109) realizaram um trabalho no Brooklyn, EUA, no qual as amostras de *K. pneumoniae* produtoras de KPC apresentaram 88% de resistência a amicacina (213). Na Grécia amostras produtoras de KPC-2 apresentaram

13% de resistência a esse antimicrobiano (220). Em um trabalho com enterobactérias (n=134) e *Acinetobacter* spp. (n=1) produtores de NDM-1, incluindo 62 *K. pneumoniae* isoladas da Índia, Vietnã, Sérvia, Filipinas, Arábia Saudita, Egito, Geórgia, Guatemala e Estados Unidos, observou-se 83,4% de resistência a amicacina (221). Em um relato de surto envolvendo 17 amostras produtoras de OXA-48 na França em 2010, todas as amostras foram sensíveis a este antimicrobiano (222). No estudo de Potron e colaboradores (2013), com 107 amostras produtoras de OXA-48 isoladas do Norte da África e Europa sendo 67 delas *K. pneumoniae*, foi observado 56,3% de resistência a amicacina (104).

Em relação à gentamicina, Castanheira e colaboradores, num estudo que contemplou amostras da família *Enterobacteriaceae* da Europa e América do Norte produtoras de KPC-2 e metalo-carbapenemases (VIM-1, IMP-1, SME-2 e NMC-A) originárias do programa de vigilância SENTRY, observaram dentre as amostras de *K. pneumoniae* 31,23% de resistência a gentamicina (214). Dados mais recentes deste mesmo programa de vigilância com amostras da América Latina demonstraram 34,6% de resistência a esse antimicrobiano entre as 405 amostras de *K. pneumoniae* isoladas no Brasil (17). Em amostras de OXA-48 isoladas da África e Europa, Potron e colaboradores (2013) observaram 21,9% de resistência a gentamicina (104).

Dentre os mecanismos de resistência a aminoglicosídeos, podemos destacar como os mais epidemiologicamente importantes a inativação da molécula do antimicrobiano por ação de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos e a metilação da subunidade 16S do RNA ribossomal através de RNA metilases (117).

Em relação aos genes codificadores de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, os percentuais de detecção desses genes entre todas as amostras produtoras de carbapenemases foram: 93,9% para *aac(6')-Ib*, 54,5% para *aac(3')-IIa* e 42,4% para *aadA*. A presença do gene *aadA* foi estatisticamente maior nas amostras positivas para *bla<sub>NDM-1</sub>* (83,3%) quando comparadas às demais (KPC=43,7% e OXA-370=18,1%), bem como a presença de *aac(3')-IIa* foi significativamente menor nas amostras positivas para *bla<sub>OXA-370</sub>* (13,6%) em relação às demais (KPC=68,7% e NDM-91,6%). A associação de todos os genes foi o perfil de detecção mais observado (30,3% das amostras).

Nas amostras positivas para *bla<sub>OXA-370</sub>* observamos maior resistência a amicacina (95,5% de resistência, uma amostra sensível) quando comparamos às demais amostras. Este resultado foi condizente com o achado de 100% das amostras positivas para *aac(6')-Ib* nessas

amostras, que preferencialmente promove resistência a este antimicrobiano. Entretanto, se tratando das amostras positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub> e *bla*<sub>NDM-1</sub> não observamos plena concordância entre genótipo e fenótipo, visto que 93,7% e 83,3% foram positivas, respectivamente, para *aac(6')-Ib* e apenas 65,2% e 25% apresentaram resistência a amicacina.

Entre as amostras estudadas, oito (cinco positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub> e três positivas para *bla*<sub>NDM-1</sub>) foram sensíveis aos dois aminoglicosídeos testados (amicacina e gentamicina). Dentre as amostras positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub> sensíveis, observamos a presença dos genes *aac(3')-IIa* (promove resistência principalmente a gentamicina) e *aac(6')-Ib* (resistência principalmente a amicacina) em todas as amostras, enquanto nas amostras positivas para *bla*<sub>NDM-1</sub> sensíveis, o gene *aadA* (resistência a estreptomicina) foi encontrado em todas e os genes *aac(3')-IIa* e *aac(6')-Ib* em duas amostras.

Na literatura, já foram observados casos de amostras sensíveis a aminoglicosídeos apresentando enzimas modificadoras. Em um estudo com amostras de *E. cloacae* positivas para *aac(6')-Ib*, 84.5% e 55.2% das amostras foram consideradas suscetíveis a amicacina de acordo com os critérios de resistência do CLSI e EUCAST, respectivamente (223). A justificativa para a sensibilidade em amostras positivas para AAC(6')-IB no trabalho supracitado foi devido possivelmente à produção de níveis mais baixos da enzima. Os pesquisadores acreditam que esta enzima possa conferir resistência *in vivo* apesar da susceptibilidade *in vitro*, através da modificação eficaz das pequenas quantidades da molécula do antimicrobiano que efetivamente entram na célula bacteriana (223). Entretanto, Caulin e colaboradores (1996) não reportaram diferenças notáveis relativas à eficácia da amicacina em amostras produtoras de altos ou baixos níveis da enzima em modelo experimental (224).

Na tese de Doutorado de Tolentino publicada em 2015, conduzida com 100 amostras de *K. pneumoniae* produtoras de KPC-2 isoladas em São Paulo, o gene *aac(6')-Ib* foi detectado em 65% do total de amostras estudadas, sendo que somente 88% das amostras apresentaram concordância entre a presença do gene e o fenótipo de resistência (219). Desta forma, acreditamos que nas amostras que apresentaram susceptibilidade apesar da presença dos genes codificadores de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, as enzimas possam estar sendo pouco expressas, não fornecendo resistência plena a esses antimicrobianos.

O gene *aadB*, também conhecido como *ant(2')-Ia*, não foi observado nas amostras estudadas. No trabalho de Tolentino (2015), este gene também não foi encontrado (219).

Os genes da família *aac(6')-Ib* foram os mais observados em nosso trabalho e são os mais descritos na literatura, estando presentes tanto em Gram-positivos quanto em Gram-negativos, associados a cromossomos, plasmídios e elementos genéticos móveis. Num estudo realizado com amostras produtoras de KPC-2 isoladas em Israel, observou-se 13% de produção de *aac(6')-Ib-cr* (225). Em um artigo com 35 amostras de *E. cloacae* não susceptíveis a carbapenemas realizado na China, o gene *aac(6')-Ib* foi o mais frequentemente encontrado (60,0%) (226). Dentre as onze amostras produtoras de NDM-1 e OXA-48 estudadas em um trabalho no Marrocos, seis possuíam também *aac(6')-Ib-cr* e dois *aac(3)-II* (218). No trabalho de Tolentino, com amostras de *K. pneumoniae* produtoras de KPC-2, o gene *aac(6')-Ib* foi encontrado em 78% das amostras isoladas em hospitais de São Paulo e em 52% das amostras de São José do Rio Preto. Em relação ao gene *aac(3')-IIa*, este foi observado em 54% das amostras de São Paulo e 34% das isoladas em São José do Rio Preto (219).

Em nosso estudo, dentre os genes codificadores de metilases, encontramos somente o gene *rmtB* na amostra CCBH14393, positiva para *bla<sub>OXA-370</sub>*. O gene *rmtB* foi inicialmente descrito em 2005, originário de uma *Serratia marcescens* isolada no Japão, mas já existem diversos relatos de sua presença em outras espécies da família *Enterobacteriaceae*, principalmente na Europa e na Ásia. Em um estudo com *K. pneumoniae* produtoras de ESBL em Taiwan, observou-se a presença de *rmtB* em 37 das 92 amostras produtoras de *bla<sub>CTX-M</sub>* e outras beta-lactamases (227). Num artigo com amostras isoladas na China, observou-se um surto de amostras do ST11 produtoras de KPC-2, coproduzindo *rmtB* (228). Na Bulgária, existe o relato de surto em várias alas de um hospital em 2012, onde foram isoladas doze *E. coli* multirresistentes do clone ST101 coproduzindo NDM-1, CTX-M-15 e *rmtB* (229).

RNA metilases já foram descritas no Brasil em *K. pneumoniae*. O gene *rmtB* foi encontrado em duas amostras de *K. pneumoniae* produtoras de KPC isoladas em São Paulo (219). Num estudo com oito amostras apresentando alto grau de resistência a aminoglicosídeos isoladas também em São Paulo, foi possível observar a produção de *rmtD* em três amostras e *RmtG* em cinco (124).

Assim, por termos ainda poucos relatos na literatura da presença dessas metilases em *K. pneumoniae* no nosso país e termos encontrado somente em uma amostra de nosso estudo, acreditamos que este mecanismo de resistência a aminoglicosídeos não seja o mais comum entre as amostras Brasileiras. Vale ressaltar que em nosso trabalho não foi possível investigar todas as RNA metilases conhecidas até o momento e não avaliamos a concentração inibitória

mínima frente a esses antimicrobianos, que seria uma evidência maior da produção dessas enzimas. Entretanto, é importante salientar que a emergência dessa resistência em nosso país demanda atenção, visto que as RNA metilases conferem altos níveis de resistência aos aminoglicosídeos e esta é uma classe de antimicrobianos muito utilizada, principalmente em terapia combinada, para o tratamento de enterobactérias produtoras de carbapenemases.

Entre as amostras do nosso trabalho, encontramos 93,9% de resistência a ciprofloxacina, representante da classe das quinolonas. Dados do SENTRY com amostras da América Latina resistentes aos carbapenemas observaram 55.6% de resistência a ciprofloxacina entre as amostras de *K. pneumoniae* isoladas no Brasil (17). No trabalho de Potron e colaboradores, que contemplou amostras produtoras de OXA-48 da África e da Europa, observou-se 59.8% de resistência a esse antimicrobiano (104). Já Bratu e colaboradores, num estudo com amostras de *K. pneumoniae* produtoras de KPC dos EUA, observaram, assim como em nosso estudo, alto percentual de resistência a esse antimicrobiano (100%) (213).

A resistência a quinolonas em enterobactérias pode ser mediada por diferentes fatores, como a presença de genes *qnr* que codificam pentapeptídeos com função de proteger a DNA girase da degradação (136). Em nosso trabalho, observamos nas amostras produtoras de carbapenemases os genes *qnrA* (17,9%), *qnrB* (56%) e *qnrS* (53%). Através do teste estatístico, observamos que a presença do gene *qnrB* foi significativamente maior nas amostras positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub> (93,7%) quando comparadas com as amostras positivas para *bla*<sub>NDM-1</sub> (38,4%) e *bla*<sub>OXA-370</sub> (9%), enquanto que o gene *qnrS* foi significativamente menos encontrado nas amostras positivas para *bla*<sub>OXA-370</sub> (9%) que as demais (KPC em 78,1% e NDM em 66,6%). A associação entre os genes *qnrB* e *qnrS* foi a mais encontrada (36,3% das amostras), entretanto em 37,3% não foi detectado nenhum dos genes *qnr* pesquisados.

A presença do gene *qnrB* em maior percentual nas amostras de *K. pneumoniae* positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub> alertam para a possibilidade de que estes genes possam estar localizados em um mesmo elemento genético. Na literatura, em um estudo conduzido com 42 amostras americanas de *K. pneumoniae* produtoras de KPC, observou-se uma amostra carreando *bla*<sub>KPC-3</sub> e *qnrB19* num mesmo plasmídeo conjugativo (230). Em nosso trabalho, o ambiente genético do gene *bla*<sub>KPC-2</sub> de cinco amostras selecionadas foi avaliado, entretanto o gene *qnrB* não foi encontrado na mesma estrutura. Por outro lado, na amostra CCBH16302 positiva para *bla*<sub>NDM-1</sub> e *qnrB1*, estes elementos foram encontrados no mesmo contig.

Apesar de termos observado 100% de resistência à ciprofloxacina nas amostras positivas para *bla*<sub>OXA-370</sub>, observamos baixa produção de todos os genes *qnr* pesquisados. Assim, acreditamos que nestas amostras a resistência a quinolonas pode estar sendo mediada por outros mecanismos, tais como mutações no sítio de ação do antimicrobiano ou alteração de permeabilidade e aumento da expressão de bombas de efluxo. A análise das mutações no sítio de ação do antimicrobiano e avaliação das mutações nas porinas foi realizada em três amostras positivas para *bla*<sub>OXA-370</sub> selecionadas e será discutido adiante.

As amostras positivas para *bla*<sub>NDM-1</sub> foram as que apresentaram o menor percentual de resistência a quinolonas, entretanto, isto não se refletiu no genótipo onde os genes *qnr* foram encontrados em diferentes amostras. Entre todas as amostras estudadas, quatro apresentaram sensibilidade a ciprofloxacina através do teste de difusão em ágar: uma amostra positiva para *bla*<sub>KPC-2</sub> e três amostras positivas para *bla*<sub>NDM-1</sub>. Dessas, todas foram positivas para *qnrS*, uma para *qnrB* e duas para *qnrA*. Na literatura, os genes *qnr* são conhecidos por fornecerem discreta diminuição da sensibilidade à quinolonas (231). Estudos demonstraram resistência ao ácido nalidíxico em amostras produtoras de *qnr*, mas apenas uma ligeira redução da sensibilidade às fluoroquinolonas (como é o caso da ciprofloxacina), através de um aumento em torno de 16 a 32 vezes da CIM (232, 233). Dessa forma, acredita-se que apesar de estes genes conferirem diminuição da sensibilidade a esses antimicrobianos, eles podem proporcionar um contexto favorável no qual a seleção de mutações cromossômicas possam ocorrer com mais facilidade, aumentando desta forma a resistência a esses antimicrobianos (231).

Na literatura, assim como em nosso trabalho, o gene *qnrB* tem sido um dos mais descritos entre os genes *qnr*. Foi reportado em uma unidade de tratamento intensivo na França a co-produção de *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *qnrB1* e *aac(6')-Ib-cr* em 14 amostras de *K. pneumoniae* multirresistentes (234). Em um estudo realizado com enterobactérias resistentes à ciprofloxacina e produtoras de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) isoladas na Itália, os genes *qnrA* e *qnrB* foram encontrados em 2,1% e 66% das *K. pneumoniae* respectivamente (235). Num estudo brasileiro com 101 *E. coli* envolvidas com infecções urinárias resistentes a quinolonas, observou-se em oito amostras genes *qnr* (três com *qnrS1*, um com *qnrB19*) (236). Em um estudo de metagenômica com amostras do Peru e Bolívia, foi observada a presença de *qnrB* (54%) e *qnrS* (14%) em enterobactérias comensais isoladas de crianças saudáveis (237). Em um estudo envolvendo enterobactérias isoladas de sangue de seis centros de saúde da Turquia, o gene *qnrA* foi o único descrito, encontrado em 6.4% das amostras não suscetíveis a quinolonas (238). No Marrocos, dentre as onze amostras

produtoras de NDM-1 e OXA-48 estudadas, três amostras possuíam *qnrS1* e dois *qnrB1* (218).

No Brasil, já foram descritos genes da família *qnr*. A primeira descrição de genes dessa família ocorreu em 2007, com o isolamento a partir de uma cultura de urina de uma *E. coli* produtora de *qnrA1* de uma paciente internada em Porto Alegre, apresentando resistência a maioria dos beta-lactâmicos (com exceção de cefepime e carbapenemas), bem como resistência a todas as quinolonas testadas, estreptomicina e cloranfenicol, entretanto apresentando susceptibilidade a gentamicina e amicacina (239).

Recentemente, Carvalho-Assef e colaboradores descreveram a presença do gene *qnrB4* e *bla<sub>CTX-M-15</sub>* em amostras de *E. hormaechei* produtoras de *bla<sub>NDM-1</sub>*, em uma unidade de terapia intensiva no Rio Grande do Sul (43). Em um trabalho de Tese de Doutorado publicado em 2015 com amostras produtoras de KPC-2 observou-se a presença do gene *qnrB* em 42% das amostras originárias de São José do Rio Preto e 14% das amostras isoladas na cidade de São Paulo (219). Andrade e colaboradores também observaram a presença do gene *qnrS1* em *K. pneumoniae* produtoras de KPC-2 e CTX-M-2, pertencentes ao ST11 em São Paulo (240).

Dessa forma, tem sido cada dia mais observada a presença de genes *qnr* em amostras clínicas apresentando diferentes perfis de resistência aos antimicrobianos. Assim, acreditamos que apesar de não conferirem resistência plena às quinolonas, esses pentapeptídeos estão relacionados ao aumento das concentrações inibitórias mínimas frente à quinolonas, antimicrobianos bastante utilizados atualmente principalmente para tratamento de infecções causadas por enterobactérias em pacientes da comunidade.

Em relação à sulfametoxazole/trimetoprima, observamos 87,8% de resistência entre as amostras produtoras de carbapenemases, sendo 84,4% de resistência nas amostras positivas para *bla<sub>KPC-2</sub>*; 75% nas positivas para *bla<sub>NDM-1</sub>* e 100% nas amostras positivas para *bla<sub>OXA-370</sub>*, sendo estatisticamente significativa a diferença entre as amostras positivas para *bla<sub>NDM-1</sub>* e *bla<sub>OXA-370</sub>*. Outros trabalhos também têm observado altos percentuais frente a este antimicrobiano: 97,6% de resistência entre as amostras de *K. pneumoniae* produtoras de KPC dos estados do Leste dos EUA (241), 81,5% de resistência em estudo com *K. pneumoniae* KPC isoladas em seis países (EUA, Colômbia, Brasil, Israel, Grécia e Suécia) (217) e 78,5% de resistência em amostras produtoras de OXA-48 na Europa e África (104).

Devido à resistência a muitas classes de antimicrobianos, existem atualmente poucas opções para o tratamento de infecções causadas por bactérias produtoras de carbapenemases. Os antimicrobianos principalmente utilizados hoje são: polimixinas, tigeciclina e fosfomicina. Estes fármacos têm demonstrado bom potencial terapêutico contra representantes da família *Enterobacteriaceae* produtores de carbapenemases e possuem amplo espectro de atividade, entretanto, apresentam algumas limitações para sua utilização (242). As polimixinas apresentam potencial tóxico e não possuem critérios de interpretação do teste de sensibilidade aos antimicrobianos no documento do CLSI, a tigeciclina também não possui critérios interpretativos no documento e não é recomendada para o tratamento de infecções de corrente sanguínea e a fosfomicina deve ser administrada associada a outros antimicrobianos, visto que quando utilizada isoladamente amostras resistentes são mais facilmente selecionadas, além do fato de ser utilizada principalmente para o tratamento de infecções urinárias (243).

Mesmo com as limitações de uso, estes antimicrobianos têm sido cada vez mais utilizados para o tratamento de infecções causadas por amostras produtoras de carbapenemases, embora relatos de amostras resistentes a estas classes têm sido cada vez mais frequentes na literatura (214). Um estudo publicado por Livermore e colaboradores em 2011 investigou a eficácia desses antimicrobianos frente à enterobactérias resistentes aos carbapenemas isoladas no Reino Unido e revelou que 92.6% das amostras eram suscetíveis a colistina, 60.5% suscetíveis a fosfomicina e 46.9% suscetíveis a tigeciclina (244).

Em nosso trabalho, observamos de forma geral baixa resistência a fosfomicina (22,7%), sendo que as amostras positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub> apresentaram 21,9% de resistência, as amostras positivas para *bla*<sub>NDM-1</sub> apresentaram 8,3% e as amostras positivas para *bla*<sub>OXA-370</sub> 31,8%. Em um estudo com 43 *K. pneumoniae* produtoras de NDM-1, observou-se 21% de resistência a fosfomicina (245). Em amostras produtoras de KPC-2, observou-se 46% de resistência na Grécia (246), 7% resistência nos EUA (247) e 55% na China (216).

Em relação à tigeciclina, observamos 68,1% de resistência em relação a todas as amostras produtoras de carbapenemases. As amostras positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub> apresentaram 62,5% de resistência, as amostras positivas para *bla*<sub>NDM-1</sub> 33,3% e as amostras positivas para *bla*<sub>OXA-370</sub> 95,4%, havendo um maior percentual de amostras resistentes a tigeciclina entre as amostras positivas para *bla*<sub>OXA-370</sub> quando comparadas com as demais. Kelesidis e colaboradores (2008) realizaram uma revisão sistemática baseada nos dados de 36 trabalhos da literatura realizados no período de 1999 a 2008 com amostras de enterobactérias multirresistentes, incluindo amostras produtoras de ESBL, AmpC e carbapenemases e

observaram 11,5% de resistência a tigeciclina (248). Já na China, Chen e colaboradores encontraram 33,9% de resistência em amostras produtoras de KPC-2 (216). Nos dados do SENTRY publicados em 2008 com amostras produtoras de carbapenemases isoladas dos EUA, observamos 100% de susceptibilidade a este antimicrobiano (214).

Frente à polimixina B, observamos 6% de resistência global, sendo 3,1% de resistência nas amostras positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub> (n=1), 8,3% de resistência nas amostras positivas para *bla*<sub>NDM-1</sub> (n=1) e 9% de resistência nas amostras positivas para *bla*<sub>OXA-370</sub> (n=2). Alguns estudos apresentam percentuais variáveis de resistência a essa classe: 6,8% de resistência em amostras de *K. pneumoniae* oriundas de bacteremias na Coreia do Sul (249), 6,7% em amostras de Enterobactérias produtoras de serino e metalo carbapenemases do programa de vigilância SENTRY dos Estados Unidos (214) e 16,6% nas amostras de *K. pneumoniae* isoladas de diferentes sítios de infecções do SENTRY realizado no Brasil (17); bem como 27% em amostras de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases isoladas em Nova York (213).

Os percentuais elevados em relação a tigeciclina encontrados nas amostras positivas para *bla*<sub>OXA-370</sub> do nosso trabalho podem refletir o aumento da utilização desse antimicrobiano de última escolha para o tratamento de infecções graves geradas por amostras produtoras de carbapenemases em nosso país. Além disso, observamos que a maioria das amostras positivas para *bla*<sub>OXA-370</sub> é pertencente a um mesmo clone definido por PFGE e MLST (OXA-370\_A/ST16), assim, este percentual de resistência elevado pode refletir uma característica deste clone prevalente no Rio de Janeiro. Dessa forma, acreditamos que medidas de restrição ao uso de antimicrobianos, tais como a RDC 20/2011 da ANVISA, além da adoção de políticas de controle de infecções hospitalares podem auxiliar na redução da disseminação de bactérias resistentes no ambiente hospitalar e na comunidade.

Em nosso trabalho foi observado que todas as 66 amostras produtoras de carbapenemases apresentaram fenótipo de multirresistência, caracterizado como resistência a pelo menos três das nove classes de antimicrobianos testadas, de acordo com Magiorakos e colaboradores (185). Observamos ao todo 14 perfis distintos de multirresistência, sendo o mais encontrado a resistência a todas as classes, com exceção de polimixina B e fosfomicina (43,9% das amostras). Dois perfis apresentaram resistência a oito das nove classes testadas: nove amostras foram sensíveis somente a polimixina B (sete positivas para *bla*<sub>OXA-370</sub> e duas positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub>) e três amostras foram sensíveis somente a fosfomicina (uma positiva para *bla*<sub>KPC-2</sub> e duas positivas para *bla*<sub>OXA-370</sub>), ou seja, grande parte das amostras com perfil

de resistência mais elevado foram positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub> e *bla*<sub>OXA-370</sub>. A observação desses fenômenos de multirresistência em todas as amostras estudadas, principalmente em cepas positivas para *bla*<sub>OXA-370</sub>, que é um mecanismo de resistência aos carbapenemas mais recente circulante em nosso país, é de extrema importância já que as amostras que apresentam resistência a variadas classes de antimicrobianos são de tratamento difícil e custoso, restringindo as opções de tratamento que podem ser utilizadas. Esse fenômeno é considerado um problema de saúde pública, onde soluções e controle dependem de políticas de restrição do uso de antimicrobianos e contenção da disseminação (243).

Além dos fenômenos de multirresistência aos antimicrobianos, outro fator que pode estar associado à facilidade de infecção e persistência de um microrganismo são os fatores de virulência associados. Dessa forma, acredita-se que o alto poder de dispersão dos clones epidêmicos mundiais, como aqueles de *K. pneumoniae* pertencentes ao Complexo Clonal 11, em parte pode ser explicado pela grande resistência aos antimicrobianos. Entretanto, outros clones também multirresistentes já foram descritos na literatura, mas aparecendo de forma esporádica. Assim, acredita-se que o arsenal de virulência apresentado por determinadas amostras podem estar associados à prevalência de um determinado clone ou grupo clonal.

Os genes responsáveis pela codificação de fímbrias e adesinas tem se mostrado como importantes fatores associados com a colonização e infecção dos pacientes. Em nosso estudo, o gene *fimH* (associado a produção de fímbria tipo 1) foi encontrado em todas as amostras produtoras de carbapenemases estudadas. Na literatura esse gene parece ser comumente encontrado em amostras de *K. pneumoniae* de diferentes origens. No trabalho de Brisse e colaboradores, publicado em 2009, foram incluídas amostras de diferentes origens clínicas (isoladas de abscessos no fígado, sangue, urina, líquido, trato respiratório), animais (cães, gatos, cavalos, pássaros) e ambientais. Nesse trabalho, todas as amostras apresentaram positividade através de PCR para esse gene com exceção das pertencentes ao CC82 e CC65, onde 7,7% e 11,1% das amostras respectivamente foram negativas (158). Em outro estudo que incluiu 65 *K. pneumoniae* isoladas entre 1990 e 2006, oriundas de infecções no fígado, trato urinário, sangue, escarro e ambiente (água e plantas), o gene *fimH* pode ser observado em 57 de 65 amostras (87,5%) (250).

O gene *mrkD* codifica outro fator associado à interação com células hospedeiras, uma fímbria do tipo 3. Em nosso estudo, o gene *mrkD* foi encontrado em 96,9% das amostras (100% das amostras positivas para *bla*<sub>NDM-1</sub> e *bla*<sub>OXA-370</sub>, e 93,7% das positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub>). Acreditamos que esse gene seja altamente frequente em *K. pneumoniae*, visto que também foi

observado na grande maioria das amostras isoladas de diferentes origens incluídas no trabalho de Brisse e colaboradores, publicado em 2009 (somente não foi descrito em cepas do CC82) (158). Em um estudo com seis amostras produtoras de OXA-48 e multirresistentes do Líbano, o gene *mrkD* foi observado em todas as amostras (251). Andrade e colaboradores observaram a presença dos genes *mrkD* e *fimH* em todas as sete amostras de *K. pneumoniae* produtoras de KPC-2 pertencentes ao ST11 em São Paulo descritas no trabalho (240).

O gene *ycfM*, que codifica uma lipoproteína de membrana, foi encontrado também em todas as amostras incluídas em nosso estudo. Num trabalho publicado em 2013, com cinco amostras de KPC-2 pertencentes a diferentes ST foi observada a presença dos genes associados a produção de fímbrias e adesinas (*ycfM*, *fimH* e *mrkD*) em todas as amostras, evidenciando a grande frequência desses genes em *K. pneumoniae* (252).

O gene *cf29a*, que codifica a adesina CS31A, não foi encontrado entre as amostras estudadas. Em um estudo com seis amostras produtoras de OXA-48 multirresistentes isoladas no Líbano, este gene também não foi encontrado (251). No trabalho de Brisse et al, 2009, esse gene somente foi observado em amostras pertencentes ao CC23 isoladas de diferentes fontes (sangue, abscessos de fígado, animais) (158). Dentro deste complexo estão inseridos os *sequence types* ST3, ST23, ST13, ST57, ST66, ST92. Dentre as amostras incluídas em nosso estudo, observamos duas pertencentes ao ST13 (que faz parte do CC23), positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub> isoladas de urina e sangue. Entretanto, essas amostras não apresentaram positividade para esse gene. Na literatura, esse gene tem sido descrito também em *E. coli* envolvidas em diarreias (160).

A produção de sideróforos, moléculas responsáveis pelo resgate de ferro, essencial para o desenvolvimento bacteriano, tem sido bastante descrita em *K. pneumoniae* envolvidas com diferentes infecções. Entre as enterobactérias, três sistemas de sideróforos são mais frequentes: enterobactina, aerobactina e yersiniabactina. Entre amostras clínicas de *K. pneumoniae*, a grande maioria produz enterobactina enquanto uma porcentagem muito menor produz tanto aerobactina ou yersiniabactina (167). Em nosso trabalho, foram pesquisados os genes *kfu*, *IroN*, *ybtS* (yersiniabactina) e *entB* (enterobactina).

O gene *entB* foi encontrado em todas as amostras pesquisadas, corroborando com os dados da literatura. Acredita-se que este gene seja bastante frequente em *K. pneumoniae*, visto que foi observado em todas as amostras de *K. pneumoniae* produtoras de KPC-2 incluída no estudo de Lavigne et al, 2013 (252) e também em um trabalho que englobou 129 amostras

clínicas de *K. pneumoniae* provenientes de diferentes sítios (respiratório, urina, sangue e fezes) (198).

O gene *ybtS*, codificador do sideróforo yersiniabactina, foi encontrado em 30,3% das amostras, sendo observado em 53,2% das amostras positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub>, 16,6% das positivas para *bla*<sub>NDM-1</sub> e 4,5% das positivas para *bla*<sub>OXA-370</sub>, sendo estatisticamente significativa a diferença entre as amostras positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub> e *bla*<sub>OXA-370</sub>.

Yersiniabactina foi descrita inicialmente em amostras de *Yersinia*, mas atualmente acredita-se que possa ser adquirida principalmente através de transferência horizontal por outras espécies de enterobactérias (167). Estudos que avaliaram a função desse sideróforo, observaram que amostras de *Y. pestis* deficientes na produção de yersiniabactina causavam doença sistêmica quando inoculadas por via intravenosa, mas não conseguiam se disseminar após a inoculação subcutânea. No estudo que avaliou o papel dos sideróforos em *K. pneumoniae*, observou-se que, *in vitro*, a enterobactina parece ser mais importante do que yersiniabactina sob condições limitadas de ferro enquanto que, *in vivo*, a yersiniabactina é dominante. Este estudo demonstrou a primeira observação de uma relação diferencial entre esses dois sistemas de aquisição de ferro, além de ter demonstrado o papel importante da yersiniabactina para amostras de *K. pneumoniae* manterem a infecção em um hospedeiro mamífero e a contribuição deste sideróforo para um fenótipo mais virulento nas amostras de *K. pneumoniae* (167).

Dados da literatura mostram a variabilidade na produção desse sideróforo em *K. pneumoniae*. Em um artigo publicado em 2011, a produção de sideróforos foi avaliada em 129 amostras clínicas provenientes de diferentes sítios (respiratório, urina, sangue e fezes) sendo o gene *ybtS* observado em 17% das amostras (198). No trabalho de Lavigne et al, 2013, com amostras produtoras de KPC-2, esse gene só foi observado na amostra de referência (ATCC10031/CIP53153) (252).

Dessa forma, por termos observado uma maior produção deste sideróforo em amostras positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub> em nosso trabalho quando comparadas às amostras positivas para *bla*<sub>OXA-370</sub>, com valor de p significativo, é possível que este achado esteja relacionado à maior vantagem em relação à virulência no hospedeiro. Entretanto, experimentos que avaliem diretamente o nível de produção desses sideróforos e virulência em modelos animais com as diferentes amostras de nosso estudo se tornam necessários.

O gene *IroN* não foi detectado em nenhuma das amostras incluídas em nosso estudo. Acredita-se que o gene *iroN* possa estar associado com amostras apresentando características mais invasivas, pois foi encontrado em 98% das *K. pneumoniae* hipervirulentas envolvidas em abscessos do fígado (197).

O gene *kfu* foi observado em 19,3% das amostras, sendo observado em 12,5% das amostras positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub>, 66,6% das amostras positivas para *bla*<sub>NDM-1</sub> e 4,5% das amostras positivas para *bla*<sub>OXA-370</sub>. A maior detecção desse gene nas amostras positivas para *bla*<sub>NDM-1</sub> quando comparadas às demais foi estatisticamente significativa. Das oito amostras positivas para *bla*<sub>NDM-1</sub> e também positivas para *kfu*, quatro pertencem ao ST37 (que englobou cinco amostras e foi o ST mais descrito).

A aquisição de ferro é frequentemente uma etapa crítica para a sobrevivência bacteriana dentro do hospedeiro. No trabalho de Russo e colaboradores, publicado em 2011, o aumento da produção de sideróforos foi observado em uma variante clínica hipervirulenta de *K. pneumoniae* (hvKP) (253). No trabalho que descreveu este gene, a região *kfu* foi encontrada numa região cromossomal de 20 kb que incluía além desse sistema de captação de ferro (*kfu*), um sistema de transporte de açúcar via fosfotransferase e fosfoenolpiruvato (PTS), e seis ORF desconhecidas. Neste trabalho, essa região foi mais observada entre as cepas associadas à invasão tecidual quando comparado a cepas não invasivas, com valor de p significativo. Neste mesmo trabalho, avaliaram o papel desse gene na virulência. Em cepas mutantes para este gene ( $\Delta kfu$ ), a virulência em ratos foi diminuída em comparação com cepas selvagens (196). Entretanto, no trabalho de Wand e colaboradores, onde se avaliou a virulência com o modelo invertebrado *Galleria mellonella*, apesar de 40% das cepas possuírem os genes codificadores de aerobactina ou *kfu*, ambos sideróforos, a produção de sideróforos não estava aumentada nas amostras (254).

Na literatura, a ocorrência de *kfu* tem sido descrita em percentuais variáveis, sendo detectado principalmente em amostras consideradas hipervirulentas associadas à abscessos de fígado. Yu e colaboradores (2008) observaram esse gene em 66% das amostras envolvidas em abscessos do fígado (197), enquanto que no trabalho de Brisse (2009), esse gene foi encontrado em todas as amostras pertencentes aos complexos clonais CC23 (que inclui amostras do ST13, também positivas em nosso estudo), CC82 e CC14, oriundas de diferentes fontes (158). Em um estudo com seis amostras multirresistentes produtoras de OXA-48 isoladas no Líbano, o gene *kfu* foi observado em quatro amostras (57%) (251).

Assim, com base nos trabalhos científicos, foi observado que as amostras portadoras desse gene possuem um fator que, experimentalmente, promoveu maior virulência em modelo murino, entretanto não foi associado diretamente ao aumento de virulência em *Galleria mellonella*. Assim, por termos encontrado que as amostras positivas para *bla*<sub>NDM-1</sub> do nosso trabalho (em quatro amostras do clone prevalente ST37) possuem este gene em maior proporção comparando-se com as demais amostras, com valor de p significativo, acreditamos que estas possam ter maior vantagem em relação à virulência no hospedeiro. Entretanto, assim como nas amostras produtoras de *ybtS*, experimentos que avaliem a virulência em modelos animais com as diferentes amostras de nosso estudo seriam necessários para elucidação da questão.

O gene *allS*, envolvido no metabolismo da alantoína e na absorção do nitrogênio foi encontrado em apenas três amostras (4,4%) do nosso trabalho, uma amostra positiva para *bla*<sub>NDM-1</sub> (ST138) e duas positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub> (ST138 e ST839). Na literatura, esse gene foi encontrado em amostras de *K. pneumoniae* pertencentes ao CC23, isoladas de diferentes fontes (sangue, abscessos de fígado, animais) (158) e em 52% das amostras envolvidas em abscessos (197). Esse Complexo Clonal, principalmente o *sequence type* ST23, tem sido associado a um fenótipo hipervirulento de *K. pneumoniae*. Estas amostras estão associadas a uma síndrome invasiva caracterizada por bacteremia, abscessos hepáticos e infecções metastáticas e são geralmente caracterizadas como pertencentes ao sorotipo K1 (255). Em um estudo com seis amostras multirresistentes produtoras de OXA-48 isoladas no Líbano, o gene *allS* foi observado em apenas uma amostra (251). Em um estudo com cinco amostras do Complexo Clonal 11 produtoras de KPC isoladas de Taiwan e Estados Unidos, o gene *allS* foi encontrado em três amostras do ST258 e em uma das duas amostras do ST11 (256).

O gene *magA*, associado a expressão de proteínas associadas à síntese da cápsula e fenótipo hiper mucoso, não foi encontrado entre as amostras pesquisadas. Este gene foi renomeado recentemente como *wz<sub>y</sub>K<sub>p</sub>K1* e é considerado restrito ao sorotipo capsular K1, considerado o sorotipo mais virulento dentre *K. pneumoniae* (164). No trabalho publicado em 2013 com *K. pneumoniae* produtoras de KPC-2 esse gene também não foi observado (252). Na literatura, há relatos da presença desse gene em amostras pertencentes ao CC23 e ao CC82, isoladas de diferentes fontes (158). Em 2013, foi isolada em Buenos Aires, Argentina, a primeira amostra do ST23 do sorotipo K1 das Américas em uma amostra produtora de KPC-2 produzindo concomitantemente os genes *magA* e *rmpA* que são associados ao fenótipo hiper mucoso (255).

Alguns estudos tem se dedicado a avaliar se fatores como a virulência bacteriana e o *fitness* das amostras são afetados pela resistência aos antimicrobianos bem como a relação entre esses dois mecanismos importantes para colonização e sobrevivência das bactérias em ambientes hostis. Em relação às bactérias expressando beta-lactamases, não está claro se estas enzimas afetam a virulência e o *fitness* bacteriano pois diferentes Gram-negativos têm apresentado respostas diferentes para a mesma questão. Em um estudo com *E. coli*, observou-se alterações quantitativas na composição do peptidoglicano em amostras expressando OXA-24 e OXA-10-like. Estas alterações foram associadas com um alto custo para manutenção celular, mostrando o alto custo biológico proveniente da interação de beta-lactamases e o metabolismo do peptidoglicano (257). Entretanto, no estudo de Sahly e colaboradores publicado em 2008, amostras de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL possuíram experimentalmente maior potencial patogênico quando comparados a amostras não produtoras por apresentarem maior capacidade de expressão de fímbrias do tipo 1 e tipo 3 (258).

Dados sugerem também que deficiência nas porinas pode estar relacionada ao aumento da resistência a antimicrobianos diminuindo simultaneamente a virulência. Em *K. pneumoniae* mutantes deficientes nas porinas OmpK35 e OmpK36 foi observado um aumento na susceptibilidade à fagocitose e amostras mutantes em OmpK36 exibiram menor potencial de virulência em modelo de peritonite em ratos (257).

Em relação às bombas de efluxo, Padilla e colaboradores (2010) mostraram que uma amostra de *K. pneumoniae* deficiente em AcrAB exibiu uma menor capacidade de virulência para causar pneumonia num modelo murino do que a amostra selvagem (32). Bialek e colaboradores observaram que a superexpressão dessa mesma bomba em cepas de *K. pneumoniae* está ligada a um aumento do potencial de virulência no modelo de *Caenorhabditis elegans* (259), demonstrando, assim, que a expressão dos sistemas de efluxo tem papel importante para a virulência em *K. pneumoniae* (257).

Através da análise dos dados de sequenciamento genômico das amostras representativas dos três grupos de amostras produtoras de carbapenemases usando a plataforma BIGSdb-Kp não foi possível identificar outros genes associados à virulência diferentes daqueles pesquisados por PCR. Assim, observamos entre as amostras produtoras de carbapenemases brasileiras estudadas principalmente genes associados à produção de fímbrias e adesinas (*mrkD* = 96,9%; *fimH*=100%; *ycfm* = 100%) e transporte de sideróforos (*entB*=100%), sendo o gene *kfu* bastante descrito em amostras positivas para *bla*<sub>NDM-1</sub> (66,6%) e o gene *ybtS* bem descrito em amostras positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub> (53,2%). Dessa forma,

observamos que as amostras estudadas produtoras de carbapenemases do nosso país não possuem os principais fatores de virulência associados às amostras hipervirulentas, como *magA* (*wzY<sub>KPK1</sub>*), *rmpA* e *rmpA2* mas apresentaram, em geral, fatores associados a adesão e produção de sideróforos nas células hospedeiras. Assim, acreditamos que estudos com modelos animais avaliando o potencial de virulência das amostras estudadas poderiam ser realizados para melhor entendimento do papel desses genes encontrados na virulência.

A produção de carbapenemase em amostras clínicas é atualmente um grande problema de saúde pública, tanto no Brasil como em outros países, visto que este mecanismo de resistência se encontra disseminado. Assim, estudos que identifiquem grupos clonais que estejam disseminados e o grau de similaridade entre as amostras de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases através de métodos referenciados de tipagem molecular, como PFGE e MLST, podem ser de grande auxílio na compreensão da disseminação deste tipo de resistência (172).

Em nosso trabalho, através do PFGE, observamos 30 grupos clonais entre as 66 amostras produtoras de carbapenemases incluídas em nosso trabalho, sendo 21 grupos clonais entre as amostras positivas para *bla<sub>KPC-2</sub>* (n=32), sete grupos clonais nas amostras positivas para *bla<sub>NDM-1</sub>* (n=12) e dois grupos clonais nas amostras positivas para *bla<sub>OXA-370</sub>* (n=22).

Das 22 amostras positivas para *bla<sub>OXA-370</sub>* incluídas em nosso trabalho, 21 foram classificadas como pertencentes ao mesmo grupo clonal OXA-370\_A (95,4%). Entre as amostras positivas para *bla<sub>NDM-1</sub>*, observamos com maior frequência o NDM\_A, encontrado em cinco das 12 amostras incluídas (41,6%).

Entre as amostras positivas para *bla<sub>KPC-2</sub>* não houve um clone prevalente pois estas amostras foram selecionadas a partir do total de amostras analisadas no Mestrado, onde foram estudadas 165 amostras de *K. pneumoniae* positivas para *bla<sub>KPC-2</sub>*. Neste estudo, foi observada uma maior prevalência dos grupos clonais KPC\_A (40,6%), KPC\_C (23%) e KPC\_Q (9,7%).

O PFGE, apesar de ter sido extensivamente utilizado ao longo dos anos para a tipagem de bactérias, apresenta dificuldade para comparação de dados obtidos em diferentes laboratórios visto que é uma técnica de *fingerprint* baseada em padrões de bandas de DNA em gel. Para minimizar a dificuldade de comparação interlaboratorial, a metodologia de *Multilocus sequence typing* (MLST) tem sido cada dia mais utilizada. Esta técnica se baseia

na análise de sequências de genes conservados do DNA utilizando banco de dados de livre acesso possibilitando a comparação de cepas de diferentes localizações do mundo (19, 172).

Em nosso trabalho, encontramos 27 *sequence types* a partir da metodologia do MLST e 30 grupos clonais por PFGE. Esta diferença ocorreu porque diferentes grupos clonais foram designados com um mesmo ST: os grupos clonais KPC\_F e NDM\_B foram classificados como ST138, KPC\_G e NDM\_C foram classificados como ST323 e KPC\_Q e NDM\_D foram classificados como ST340.

Trabalhos da literatura já observaram perfis de fragmentação diferentes em amostras provenientes dos mesmos *sequence types*. Vimont e colaboradores (2008) estudando 63 amostras de *K. pneumoniae*, observaram 56 perfis de PFGE e 39 *sequence types*, onde todas as amostras pertencentes ao mesmo perfil de PFGE pertenceram ao mesmo ST, mas alguns ST foram subdivididos entre diferentes grupos PFGE (172).

No trabalho de Han e colaboradores, publicado em 2013, o PFGE distinguiu 32 amostras de origens variadas em 13 padrões de bandas enquanto o MLST as dividiu em 11. Todas as amostras pertencentes ao mesmo ST obtiveram o mesmo padrão de fragmentação do DNA, com exceção das amostras do ST23, que foram divididas em cinco diferentes perfis de PFGE. Em outra avaliação deste mesmo estudo, com amostras KPC-2 positivas isoladas de uma mesma ala hospitalar no mesmo período, 12 amostras foram classificadas como pertencentes ao ST11, entretanto, foram divididas em quatro perfis de fragmentação distintos (260).

Acredita-se que esta diferença ocorra porque o PFGE possui maior poder discriminatório em comparação ao MLST sendo mais aplicado em casos de surto e o MLST para avaliações da proximidade filogenética de amostras isoladas em períodos mais longos (172).

O poder discriminatório mais baixo do MLST em relação ao PFGE representa uma vantagem na identificação de complexos clonais internacionais. A partir da análise filogenética através do *software* Eburst, observamos três complexos clonais entre os 27 *sequence types* encontrados: CC11, CC16-17 e CC758-840-1041. Dentre as amostras testadas, 16 pertenciam ao CC11, sendo 15 positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub>, pertencentes aos *sequence types* ST11, ST340, ST437, ST757, ST855 e uma positiva para *bla*<sub>NDM-1</sub> do ST340. O CC16-17 contemplou uma amostra positiva para *bla*<sub>KPC-2</sub> (ST17) e três amostras positivas para

*bla*<sub>OXA-370</sub> (ST16). Já o CC758-840-1041 foi formado por duas amostras positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub> (ST758 e ST840) e uma positiva para *bla*<sub>OXA-370</sub> (ST1041).

No Complexo Clonal CC16-17 encontramos uma amostra positiva para *bla*<sub>KPC-2</sub> (ST17) e 95,4% das amostras positivas para *bla*<sub>OXA-370</sub> do nosso trabalho (ST16). O ST16 foi descrito em amostras do Canadá possuindo a enzima NDM-1 (261). Amostras deste clone também foram observadas em Taiwan (262) e em Copenhague portando CTX-M-15 (263), mas também foi descrito em amostras positivas para OXA-48 causando surtos em dois hospitais de diferentes regiões da Espanha (112). Já o ST17 foi encontrado na Espanha produzindo uma beta-lactamase do tipo AmpC (DHA-1) (264), na Grécia produzindo KPC-2 (220) e na Noruega em amostra positiva para CTX-M-15 envolvida em surto numa unidade de terapia intensiva neonatal (265). Esse Complexo Clonal, que foi denominado CG17 no artigo de Baraniak e colaboradores publicado em 2013 (contemplando neste artigo os *sequence types* ST16, ST17, ST20, ST630, ST676 e ST845), foi o segundo mais observado (25%) em amostras isoladas de swab retais portadoras de ESBL (266).

O CC11 tem apresentado grande importância mundial e tem sido extensivamente reportado na literatura, com destaque para o ST258. Esse *sequence type* é considerado um clone epidêmico mundial relacionado ao gene KPC, inicialmente descrito nos Estados Unidos mas já encontrado na Europa, Ásia e América Latina associado às variantes alélicas KPC-2 e KPC-3 (42, 208). Entretanto, este ST não foi descrito em nosso trabalho.

Dentro do CC11, encontramos os *sequence types* ST11 (n=8), ST340 (n=2), ST437 (n=2), ST757 (n=1) e ST855 (n=1) em amostras positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub> e uma positiva para *bla*<sub>NDM-1</sub> do ST340. Os *sequence types* ST11, ST340 e ST437 já foram reportados em outros trabalhos da literatura predominantemente em amostras produtoras de KPC, entretanto, já foram encontrados também associados a diferentes beta-lactamases.

O ST11 já foi observado em alguns países como Hungria (267), Coreia do sul, Hong Kong, Indonésia e Singapura (262) mas também na Espanha (268) em amostras produtoras de CTX-M-15. Na China (269), Coreia do sul (270), Brasil (67) e Hungria (271) representantes desse clone têm sido associados à dispersão da carbapenemase do tipo KPC. Este clone já foi descrito também em amostras produtoras de NDM-1 na Grécia (272) Índia, Reino Unido e Suécia (273), Tailândia (274) e Estados Unidos (275) e em amostras produtoras de OXA-48 na Grécia (276) e Taiwan (277).

O ST 340, que foi encontrado em nosso trabalho em amostras positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub> e *bla*<sub>NDM-1</sub>, também já foi descrito carreando diferentes beta-lactamases na literatura. Amostras carreando KPC-2 desse clone foram descritas na Índia, Filipinas e Tailândia (262) mas também na Grécia (220) e em Israel (278). Este clone também foi descrito carreando NDM-1 no Sultanato de Omam (279) e Coreia do Sul (280), mas também OXA-48 nos Emirados Árabes (281).

O ST437 descrito em amostras positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub> em nosso trabalho já foi encontrado em amostras produtoras de KPC-2 na Índia, Filipinas e Tailândia (262) e em outros relatos de nosso país, incluindo isolamento em ambientes aquáticos (240, 282). Também foi encontrado na Espanha em amostras produtoras de NDM-7 (283) e OXA-245, que pertence à família OXA-48-like (112).

Na literatura, temos observado a dispersão do gene *bla*<sub>NDM-1</sub> associado a diferentes espécies da família *Enterobacteriaceae* e em bastonetes Gram-negativos não fermentadores, sendo este gene não relacionado a nenhum clone específico, tendo importância também o ambiente genético e o plasmídeo nos quais estes genes estão inseridos. Estudos tem avaliado a possibilidade de manutenção e aquisição de determinados plasmídios por diferentes espécies, mostrando que alguns plasmídios são mais promíscuos e adaptados a diferentes espécies do que outros (284). Nas amostras positivas para *bla*<sub>NDM-1</sub> do nosso trabalho, observamos variabilidade genética entre as amostras estudadas. Entretanto o ST37 se destacou sendo encontrado em 41,64% das amostras estudadas. Esse ST já foi descrito em amostras produtoras da AmpC *bla*<sub>DHA-1</sub> na França (285) e Espanha (264), em amostras produtoras de KPC-2 na China (286) e na Itália (287) mas também carreando NDM-1 em amostras causando surtos em neonatos na China (288).

Apesar de observamos a prevalência de clones nas amostras produtoras de carbapenemases, acreditamos que a transferência horizontal desses genes de resistência seja um importante mecanismo de disseminação de carbapenemases visto que estes genes têm sido frequentemente associados a elementos genéticos móveis e plasmídios. Dessa forma, avaliamos o ambiente genético dos genes codificadores de carbapenemases através de PCR, o plasmídeo carreador através de extração plasmidial e hibridação, além de buscar o ambiente genético desses genes através do sequenciamento genômico nas amostras selecionadas.

Se tratando do gene *bla*<sub>KPC-2</sub>, o elemento genético que tem apresentado maior importância no cenário global é o Tn4401. Esse transposon da família Tn3, com

aproximadamente 10 kb, é composto por uma transposase (*tnpA*), resolvase (*tnpR*), o gene *bla<sub>KPC</sub>*, duas sequencias de inserção, *ISKpn7* e *ISKpn6*, além das sequencia invertidas repetidas de 39 pb flanqueando a estrutura (54). Nas amostras positivas para *bla<sub>KPC-2</sub>* de nosso estudo, foi possível amplificar em todas as sequencias *tnpA* e *ISKpn6*, o que caracteriza a estrutura parcial do transposon Tn4401. Entretanto, somente 84,3% das amostras apresentou a estrutura completa do mesmo, caracterizada pela presença também da sequencia de inserção *ISKpn7*. Nessas amostras, amplificamos um fragmento correspondente a 703 pb que caracteriza a isoforma b deste transposon. Esta isoforma já foi descrita na Colômbia e no Brasil (67, 217).

Observamos o gene *bla<sub>KPC-2</sub>* associado a plasmídios entre 58 e 2kb em 31 amostras (96,8%), sendo que 41,9% deles tiveram o tamanho aproximado de 40kb. Cuzon e colaboradores (2010), observaram plasmídios que continham o gene *bla<sub>KPC-2</sub>* dos grupos plasmidiais IncN (35, 70, 75 e 80 kb) e IncL/M (12, 35 e 75kb), além do grupo IncFII (80kb) em amostras dos EUA, Colômbia, Brasil, Israel, Grécia e Suécia (217). Andrade e colaboradores (2011) observaram o gene *bla<sub>KPC-2</sub>* associado aos plasmídios: IncN(40kb), IncL/M (50 a 60kb) e IncFII (130kb), além da presença desse gene em dois plasmídios não tipáveis de 20 e 50kb (67).

Através do sequenciamento genômico foi possível estabelecer a sequencia dos plasmídios carreadores de *bla<sub>KPC-2</sub>* das cinco amostras selecionadas: CCBH5623 – ST437 (CC11); CCBH5745 – ST340 (CC11); CCBH5982 – ST11 (CC11); CCBH6306 – ST839; CCBH6707 – ST25. Nas amostras CCBH5623 (ST437) e CCBH5982 (ST11), o gene *bla<sub>KPC-2</sub>* foi encontrado em *contigs* apresentando 99% de identidade com o plasmídio pKPC\_FCF3/SP, entretanto apresentando deleção na região que codifica o gene *secA* (cuja função é desconhecida) e uma proteína hipotética. Neste plasmídio o gene *bla<sub>KPC-2</sub>* encontra-se associado a isoforma b do Tn4401. Este plasmídio foi descrito por Perez-Chaparro e colaboradores (2014), num artigo onde foram sequenciados dois plasmídios isolados de duas amostras provenientes do ST442 de aproximadamente 50kb pertencente ao grupo IncN em São Paulo (289).

Na amostra CCBH5745 (ST340), o gene *bla<sub>KPC-2</sub>* foi encontrado num *contig* apresentando similaridade com o mesmo plasmídio apresentando, entretanto, mutações pontuais silenciosas (que não modificaram a estrutura primária das proteínas codificadas) em genes codificadores de transposases, mas observamos também uma inserção de uma adenina provocando alteração no quadro de leitura do gene de função desconhecida *secA*, que poderia

gerar uma proteína deficiente. O *contig* carreador do *bla*<sub>KPC-2</sub> na amostra CCBH6306 (ST839) também apresentou similaridade com o plasmídeo citado anteriormente, entretanto, observamos três deleções: 74 nucleotídeos *upstream* do gene *resP*, 370 nucleotídeos *downstream* do gene *repA* e uma deleção maior de 3.993 nucleotídeos. Assim como no plasmídeo da amostra CCBH5745, observamos uma inserção de uma adenina provocando alteração no quadro de leitura do gene *secA*.

O plasmídeo pKPC\_FCF3/SP isolado de uma amostra de São Paulo possui um arcabouço altamente conservado descrito em plasmídios do grupo de incompatibilidade plasmidial IncN. De acordo com as análises do artigo que o descreveu pela primeira vez (289), este elemento genético possui somente duas regiões adquiridas: a região do transposon Tn4401 isoforma b, que contém o único gene de resistência deste plasmídeo (*bla*<sub>KPC-2</sub>) e uma segunda região contendo uma pequena sequência de inserção (IS903B). As diferenças encontradas entre o plasmídeo pKPC\_FCF3/SP e os plasmídios encontrados em nosso trabalho foram localizadas em regiões não codificantes de proteínas ou em regiões codificadoras de genes pertencentes ao arcabouço do IncN. Assim, acreditamos que estudos funcionais de conjugação se tornam necessários para completa elucidação do papel desses genes na mobilização e na manutenção destes plasmídios nas diferentes espécies bacterianas.

O gene *bla*<sub>KPC-2</sub> foi encontrado na amostra CCBH6707 (ST25) num *contig* apresentando similaridade com o plasmídeo pKP13d, isolado de uma *K. pneumoniae* do ST442. Em comparação com este plasmídeo, a amostra CCBH6707 apresentou uma inserção de 1.364 nucleotídeos, codificando duas transposases. No estudo que descreveu este plasmídeo, Ramos e colaboradores (2014) descreveram o genoma da cepa Kp13, obtida de hemocultura em Londrina, Paraná em 2009, que foi associada a surtos na região (205).

Dessa forma, observamos que as amostras do CC11 e uma amostra de outro ST carreavam o gene *bla*<sub>KPC-2</sub> associado ao Tn4401 isoforma b e a plasmídios apresentando alta similaridade entre si, indicando que este elemento genético possa estar envolvido na disseminação de KPC-2 em nosso país. Vale ressaltar que nas três amostras do Complexo Clonal 11 onde observamos estes plasmídios, a sua estrutura se apresentou mais conservada, apresentando menos diferenças entre as amostras e com o plasmídeo inicialmente descrito.

Já em relação ao *bla*<sub>NDM-1</sub>, os trabalhos têm apontado para a presença de uma estrutura bastante conservada: IS*Aba125* na extremidade 5' do gene e o gene *ble*<sub>MBL</sub> na extremidade 3' (48). Nas amostras positivas para *bla*<sub>NDM-1</sub> incluídas em nosso trabalho, observamos em todas

a associação do gene *bla*<sub>NDM-1</sub> com *ISAbal25* e *ble*<sub>MBL</sub>. Em amostras brasileiras de outras espécies, como *E. coli* e *E. hormaechei*, também já foram associadas a este ambiente genético (43, 290). Entretanto, através de extração plasmidial e hibridação esse gene só pode ser detectado em uma amostra (CCBH13327), num plasmídio de aproximadamente 190kb.

Através do sequenciamento genômico, foi possível estabelecer o ambiente genético de três amostras positivas para *bla*<sub>NDM-1</sub> selecionadas. Nas amostras CCBH13327 (ST323) e CCBH15949 (representante do clone mais prevalente entre amostras positivas para *bla*<sub>NDM-1</sub>, ST37) os *contigs* apresentaram 99% de identidade com a região do Tn3000 do plasmídio pEc2A, isolado de uma *E. coli* produtora de NDM-1 recuperada de swab retal no Rio de Janeiro em 2013 (290). Já na amostra CCBH16302 (ST138), além da estrutura do Tn3000 o *contig* continha também o gene *qnrB1*, associado a resistência a quinolonas. Estes dados sugerem que o Tn3000 possa ser responsável pela disseminação dessa carbapenemase em nosso estado.

Através de PCR, o ambiente genético das amostras positivas para *bla*<sub>OXA-370</sub> não pode ser avaliado pela falta de iniciadores disponíveis na literatura. Observamos a presença do gene *bla*<sub>OXA-370</sub> em plasmídios nas quatro amostras positivas para este gene avaliadas: na amostra CCBH13796 (ST1041) encontramos um plasmídio de 50 kb, na amostra CCBH13791 (ST16) encontramos marcação num plasmídio de 117kb enquanto que nas duas outras amostras do mesmo ST (CCBH14393 e CCBH14420) observamos marcação num plasmídio de 25kb. Sampaio e colaboradores (115) descreveram o gene *bla*<sub>OXA-370</sub> associado à um plasmídio de aproximadamente 40kb num *E. hormaechei* no Rio Grande do Sul, tamanho diferente dos plasmídios observados em nosso trabalho.

Através do sequenciamento genômico, foi possível estabelecer o ambiente genético de três amostras positivas para *bla*<sub>OXA-370</sub> selecionadas (CCBH14396 – ST1041, CCBH14119 – ST16 e CCBH14393 – ST16). Entretanto, não foi possível estabelecer o ambiente genético das demais amostras positivas para *bla*<sub>OXA-370</sub> pela falta de iniciadores disponíveis para detecção desse ambiente na literatura e por não termos desenhado iniciadores com esse objetivo. O *contig* carreador do gene *bla*<sub>OXA-370</sub> dessas amostras apresentou similaridade com uma região do plasmídio p87F-2, isolado do *E. hormaechei* do Rio Grande do Sul (115). Nesse ambiente, o gene *bla*<sub>OXA-370</sub> estava flanqueado *upstream* por uma transposase da família Tn3 truncada pela sequência de inserção IS5075-like e *downstream* por uma transposase da família Tn4 truncada por uma IS15-like. Assim, acreditamos que esta estrutura flanqueadora do gene *bla*<sub>OXA-370</sub> encontrada primeiramente na amostra de *E. hormaechei* isolada no Rio

Grande do Sul e nas amostras de nosso trabalho de *K. pneumoniae* isoladas no Rio de Janeiro possa ser o responsável pela mobilização dessa carbapenemase associada a diferentes plasmídios.

Através do sequenciamento genômico também foi possível identificar nas amostras selecionadas, através das Plataformas ResFinder e BIGSdb-Kp, genes de resistência adquirida que não foram pesquisados por PCR, que fornecem resistência a beta-lactâmicos (*bla*<sub>OKP-B</sub>; *bla*<sub>OXA-1</sub>; *bla*<sub>OXA-2</sub>, *bla*<sub>OXA-9</sub>, *bla*<sub>CARB-2</sub>), aminoglicosídeos [*aac*(6')*Ib-cr*; *strA*; *strB*; *aacC2*; *aph*(3')-*Ia*; *ant*(3)-*Ia*; *aph*(6)-*Id*; *aacA4*], quinolonas (*oqxA*; *oqxB*), fosfomicina (*fosA*), sulfonamidas (*sul1*; *sul2*), macrolídeos (*mphA*), fenicóis (*catA1*, *catB3*; *cmlA1*), tetraciclinas [*tet*(D); *tet*(R), *tet*(A) e *tet*(G)] rifampicinas (*arr-3*; *arr-5*) e trimetoprima (*dfrA8*, *dfrA12*; *dfrA14*; *dfrA15*; *dfrA16*; *dfrA30*), demonstrando a capacidade de aquisição de variados mecanismos de resistência a diferentes antimicrobianos em amostras produtoras de carbapenemases.

A amostra CCBH6306 positiva para *bla*<sub>KPC-2</sub> do ST839 apresentou susceptibilidade a diferentes antimicrobianos (cefepime, ceftazidima, gentamicina, amicacina, sulfametoxazole/trimetoprima, tigeciclina e polimixina B) e foi a que apresentou menos genes de resistência adquirida. Em contrapartida, a amostra CCBH14393, positiva para *bla*<sub>OXA-370</sub> pertencente ao ST16, foi suscetível somente a fosfomicina/trometamol e polimixina B e apresentou o maior número de genes de resistência adquiridos, contemplando genes de resistência a todas as classes de antimicrobianos.

Além da presença, o ambiente genético dos principais genes de resistência adquiridos encontrados também foi investigado. O gene *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, variante alélica mundialmente importante dessa família de ESBL, foi encontrado em seis amostras: duas positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub>, duas positivas para *bla*<sub>NDM-1</sub> e duas amostras positivas para *bla*<sub>OXA-370</sub>. Nas duas amostras positivas para *bla*<sub>NDM-1</sub> e na amostra CCBH5745 (positiva para *bla*<sub>KPC-2</sub>), esse gene foi encontrado associado a *ISEcp1* em um *contig* albergando também os genes *bla*<sub>TEM-1</sub>, *strA*, *strB*, e *sul2*. Nas demais amostras, observamos somente parte da estrutura (transposase *tnpA* da *ISEcp1* *downstream* e *bla*<sub>CTX-M-15</sub>).

A associação do gene *bla*<sub>CTX-M-15</sub> com sequências de inserção e com genes causadores de resistência a aminoglicosídeos e sulfonamidas é um fato epidemiologicamente importante, pela capacidade de disseminação desses mecanismos de resistência. Na literatura, existem outros relatos da associação dessa ESBL com *ISEcp1* em *E. coli* e *K. pneumoniae* em

Camarões (291), mas também em *E. coli* no Reino Unido (292). No Brasil, este elemento já foi descrito associado a CTX-M-15 em amostras de *E. hormaechei* produtoras de NDM-1 do Rio Grande do Sul (43) e em amostras de *E. coli* isoladas de suínos para comercialização (293).

Na amostra CCBH13327 positiva para *bla*<sub>NDM-1</sub>, o gene *bla*<sub>CTX-M-2</sub> foi encontrado associado a uma transposase putativa e *qacE*. Já o gene *bla*<sub>CTX-M-8</sub> foi encontrado na amostra CCBH6707 (positiva para *bla*<sub>KPC-2</sub>) associado aos elementos genéticos IS26 e IS10. Em um estudo com enterobactérias isoladas de sistemas de tratamento de esgoto em São Paulo, os genes *bla*<sub>CTX-M-8</sub> e *bla*<sub>CTX-M-15</sub> foram encontrados associados a IS26 (294).

A única metilase encontrada no nosso trabalho foi a *rmtB*, descrita na amostra CCBH14393 positiva para *bla*<sub>OXA-370</sub>. Esse gene foi encontrado associado ao gene *bla*<sub>TEM-1</sub>, *tet(A)* e a transposases dos elementos ISCR15b e ISCR1. Doi e colaboradores, no artigo que descreveu esta metilase, também observaram a associação dessa enzima com o gene *bla*<sub>TEM-1</sub> (120). Este gene também foi observado associado a esta beta-lactamase em amostras de *E. coli* isoladas da China (295).

O gene *aac(6)-Ib-cr*, que causa resistência concomitantemente a aminoglicosídeos e quinolonas, foi encontrado em cinco amostras: CCBH5623 positiva para *bla*<sub>KPC-2</sub>, CCBH15949 e CCBH16302 positivas para *bla*<sub>NDM-1</sub> e CCBH14119 e CCBH14393 positivas para *bla*<sub>OXA-370</sub>. Nessas amostras, esse gene foi observado na mesma estrutura genética: associado a sequência de inserção IS26 e cassetes gênicos de *bla*<sub>OXA-1</sub> e *catB3*. Esta região foi similar a descrita no plasmídeo pHg da amostra *K. pneumoniae* ATCC BAA-2146. Neste artigo, Hudson e colaboradores (2014) descreveram o genoma da primeira amostra positiva para *bla*<sub>NDM-1</sub> isolada nos Estados Unidos em 2010, pertencente ao ST11 (275). Este ambiente também foi similar ao encontrado em amostras de *Citrobacter freundii* isolados de estações de tratamento de água e esgoto no Canadá (296).

A amostra CCBH14393, além de apresentar o gene *aac(6')-Ib-cr* associado ao ambiente genético citado acima, apresentou outra cópia desse gene relacionado a um cassete gênico codificador de *arr-3* e a região 3'CS conservada de um integron (genes *qacEdelta1* e *sull*). Esta estrutura foi similar à encontrada em uma *K. pneumoniae* isolada de fezes de cachorro na China (297).

Em relação à resistência a quinolonas, na amostra CCBH5623 positiva para *bla*<sub>KPC-2</sub>, o gene *qnrB1* estava associado ao *operon Psp* (ativador transcricional) e na amostra CCBH15949 (positiva para *bla*<sub>NDM-1</sub>) ao mesmo *operon* mas também a transposases. Jacoby e colaboradores (2006), no artigo que descreveram os genes *qnrB* pela primeira vez, observaram que este estava associado a uma *open reading frame* (orf) similar ao gene *Psp*, que codifica uma proteína de ativação transcricional (135). Já o gene *qnrA1* foi encontrado associado aos genes *ampR* e *qacEdeltaI* na amostra CCBH13327 positiva para *bla*<sub>NDM-1</sub>. Esse ambiente já foi descrito em outras amostras: em *E. cloacae* causando surtos na Holanda (298) e em enterobactérias resistentes a quinolonas isoladas de swab retal de pacientes de UTI no Uruguai (299).

Os genes *oqxA* e *oqxB* foram encontrados em todas as amostras sequenciadas incluídas no trabalho, além do seu regulador *oqxR* e seu repressor *rarA*. *oqxA* e *oqxB* codificam a bomba de efluxo OqxAB, envolvida na resistência a quinolonas mas também descrita associada a resistência a beta-lactâmicos, tigeciclina e cloranfenicol, que foi descrita pela primeira vez em plasmídeo de *E. coli* (139). Dados de um estudo na China observaram a presença desses genes em 20.2% das amostras de *E. coli* estudadas (300).

Na literatura, se tratando de *K. pneumoniae*, estudos epidemiológicos apontaram para a presença dos genes *oqxA* e *oqxB* em amostras isoladas na Coreia do Sul, China, e Espanha (140, 301, 302). No estudo conduzido na China, estes genes foram encontrados em todas as 154 amostras de *K. pneumoniae* estudadas, inclusive em 23 amostras apresentando concentração inibitória mínima menor que 0.03 mg/ml para ciprofloxacina sugerindo que, apesar da presença do gene, este gene possa não estar sendo expresso em algumas amostras dessa espécie (140).

Outro relato demonstrou a prevalência dessa bomba em 100% e 87.5% das amostras clínicas de *K. pneumoniae* produtoras de KPC e ESBL respectivamente (303). Em uma Tese de Doutorado publicada em 2015 (219), esses genes foram observados em 56% das *K. pneumoniae* produtoras de KPC-2 isoladas em São Paulo e 2% das amostras isoladas em São José do Rio Preto.

Além de ter sido detectada em todas as amostras sequenciadas de nosso estudo, esta bomba foi localizada no mesmo ambiente genético nas amostras estudadas, uma região apresentando 99% de identidade com regiões de cromossomo de outras *K. pneumoniae* do banco de dados, incluindo amostras produtoras de KPC-2 e NDM-1, sem a presença de

elementos genéticos móveis. No trabalho de Wong e colaboradores publicado em 2015, a função, localização genética e disseminação destes genes entre enterobactérias foi avaliado. Esta bomba, cujos genes codificadores foram encontrados no cromossomo de todas as 85 amostras de *K. pneumoniae* estudadas, incluindo 15 amostras isoladas antes de 1984, foi associada à resistência a olaquinox, cloranfenicol e quinolonas através da sua superexpressão. Neste trabalho, observaram também que a transposição dos genes *oqxA* e *oqxB* do cromossomo para plasmídios resultou num aumento de 80 vezes no nível de expressão dessa bomba (304).

O fato de termos encontrado esse gene em todas as amostras sequenciadas e no mesmo ambiente genético alerta para o acúmulo de mecanismos de resistência nas amostras produtoras de carbapenemases. Acreditamos que esta bomba, que tem sido associada à resistência a diferentes antimicrobianos como quinolonas, beta-lactâmicos, tigeciclina e cloranfenicol, possa estar correlacionada com o fenótipo de multirresistência encontrado, fato preocupante devido às limitações das opções terapêuticas.

O gene *fosA*, que codifica uma glutatona transferase e tem sido associado a resistência a fosfomicina, também foi observado em todas as amostras sequenciadas de nosso estudo, entretanto, somente duas apresentam efetivamente resistência através dos testes de susceptibilidade a fosfomicina/trometamol. Este gene foi identificado pela primeira vez no transposon Tn2921 em plasmídios conjugativos de amostras clínicas da família *Enterobacteriaceae* (305). Nas nossas amostras este gene foi encontrado em região apresentando similaridade com o cromossomo da *K. pneumoniae* ATCC BAA-2146 multirresistente produtora de NDM-1 pertencente ao ST11 coletada em 2010 nos Estados Unidos (Número de acesso GenBank: CP006662.2). Este gene já foi encontrado no cromossomo de amostras clínicas resistentes a fosfomicina (275), mas também em *K. pneumoniae* sensíveis a este antimicrobiano (306). Dessa forma, alguns autores acreditam que este gene esteja presente em regiões cromossômicas de amostras dessa espécie e que poderia estar envolvido em funções não relacionadas à resistência antimicrobiana (305, 306).

Além da busca por genes de resistência adquiridos, avaliamos também a presença de mutações nas proteínas relacionadas à resistência a quinolonas, tigeciclina, fosfomicina e genes codificadores das porinas. Se tratando de mutações relacionadas à quinolonas, encontramos mutações nos genes codificadores de GyrA, ParC e ParE na região determinante de resistência às quinolonas (*quinolone resistance determining region* - QRDR). As amostras CCBH5623, CCBH5745 e CCBH 5982 (positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub> pertencentes ao Complexo

Clonal 11) apresentaram as mesmas mutações em GyrA (S83I) e em ParC (S81I). As amostras CCBH14119 e CCBH14393 do ST16 positivas para *bla*<sub>OXA-370</sub> apresentaram as mesmas mutações: GyrA - S83F e D87N; ParC – E84K; ParE – S459T. A amostra CCBH13796 apresentou mutação em GyrA: S83I; D87N. Nas demais amostras, não observamos nenhuma mutação nessas proteínas.

Segundo Ruiz e colaboradores, mutações nos resíduos 83 e 87 em GyrA e 80 e 84 em ParC são os mais observados em amostras clínicas de enterobactérias (307). Na literatura, mutações na região determinante de resistência a quinolonas encontradas em nosso trabalho têm sido bastante reportadas. Em estudo com 144 amostras da *E. coli* e *K. pneumoniae* da China com resistência a levofloxacina e ciprofloxacina, Fu e colaboradores (130) observaram 14 padrões de mutações na região QRDR de GyrA. Dentre elas, duas mutações individuais (S83Y e S83I) e três duplas mutações (S83L+D87N; S83L+D87Y; S83F+D87N) foram associadas à resistência a ambos os antimicrobianos e duas mutações individuais (S83F e S83L) foram associadas à resistência somente a ciprofloxacina. No trabalho de Stoesser e colaboradores, as mutações S83L e D87N em GyrA foram associadas à resistência a ciprofloxacina. (308).

No Brasil, estudos também tem se dedicado a avaliar mutações nestes genes. Minarini e colaboradores em 2012 estudaram 112 amostras da família *Enterobacteriaceae* isoladas de pacientes internados e da comunidade resistentes ao ácido nalidíxico, oriundas de Minas Gerais e São Paulo. Doze diferentes tipos de mutações foram observados, sendo a maioria associada aos resíduos 83 e 87 em GyrA (309).

As mutações encontradas nas amostras positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub> do CC11 do nosso trabalho (GyrA - S83I e ParC - S81I) também foram encontradas por Bowers e colaboradores (310) em amostras do CC 258 (ou CC11) isoladas de diferentes países, sugerindo que a manutenção dessas mutações nesse complexo podem contribuir para o fenótipo de resistência e facilitar sua disseminação.

Em relação aos genes relacionados à resistência a tigeciclina, o gene *tetX* não foi detectado nas amostras de nosso estudo e também não encontramos mutações no gene *rpsJ*. Na literatura, no estudo de Sheng e colaboradores, que avaliaram mecanismos de resistência a tigeciclina em 26 amostras de *K. pneumoniae*, esses dois mecanismos de resistência também não foram descritos (155).

Na literatura, os reguladores RamA, RamR e AcrR tem sido constantemente relacionados a resistência a tigeciclina. A bomba de efluxo AcrAB é regulada por seu repressor local AcrR e pelo ativador transcricional global RamA. Altos níveis de expressão dessa bomba podem ser gerados através de mutações em AcrR e aumento da expressão de RamA. O aumento da expressão de RamA pode ser causado através de mutações em seu repressor local, RamR (155). Um estudo avaliou a presença de mutações em RamR e AcrR em 26 amostras de *K. pneumoniae* apresentando resistência a tigeciclina na China. Mutações em AcrR foram observadas em 38,5% das amostras enquanto 23 apresentaram mutações em RamR (88,4%). Além das mutações, foram observados aumento na expressão dos genes *ramA*, *acrB*, *rarA*, e *oqxB* em amostras resistentes a tigeciclina. Entretanto, em oito amostras deste trabalho não foi possível identificar a causa dos fenômenos de resistência apresentados (155).

Um estudo avaliou o papel do repressor RamR na expressão de RamA. Foram observadas diferentes mutações em RamR que não resultaram em mudanças na expressão de RamA, tais como H186N, A187E e E41K. Além dessas, a mutação I141T foi encontrada em quatro das amostras desta publicação mas também foi descrita em amostra sensível de *K. pneumoniae* (311). As mutações H186N e I141T foram também descritas em nosso trabalho mas não foram preditas como possivelmente deletérias pelo *software* Provean.

Em nosso trabalho, encontramos mutações consideradas possivelmente deletérias em genes associados à resistência a tigeciclina em três amostras: CCBH5623 (positiva para *bla*<sub>KPC-2</sub> do ST437, CC11), CCBH16302 (positiva para *bla*<sub>NDM-1</sub>) e CCBH13796 (positiva para *bla*<sub>OXA-370</sub>). Estas foram as três amostras que apresentaram a concentração inibitória mínima classificada como resistente a tigeciclina de acordo com a nota técnica N°2013 da ANVISA (CIM  $\geq$ 4  $\mu$ g/ml) e com o EUCAST (CIM >2  $\mu$ g/ml).

Em nosso trabalho, mutações que geraram stop códons prematuros foram encontradas nestes dois reguladores nas amostras resistentes: CCBH5623 em RamR (W95stop) e CCBH13796 em AcrR (L93stop). Assim, acreditamos que as mutações gerando stop códons em RamR e AcrR, que funcionam direta ou indiretamente como repressores da bomba AcrAB e já foram associados à resistência a tigeciclina, estão relacionadas com o perfil de resistência encontrado.

Na amostra CCBH16302, encontramos o maior número de mutações nos reguladores da bomba AcrAB-TolC (sete dos oito reguladores) e nos codificadores da bomba (AcrA,

AcrB e TolC). Entretanto somente as mutações observadas em Rob (T132A), AcrB (H1048delinsLTISWLA) e TolC (S81Y) foram consideradas possivelmente deletérias pelo *software* Provean. As mutações dessa amostra em AcrR (Y114F e V165I), apesar de não terem sido preditas como possivelmente deletérias pelo *software* Provean, já foram descritas em amostras de *K. pneumoniae* resistentes a tigeciclina (155).

As proteínas AcrB e TolC fazem parte da bomba AcrAB-TolC, enquanto Rob é um ativador transcricional dessa bomba. Na literatura, tem sido observado que os reguladores dessa bomba desempenham um papel importante na promoção da resistência a tigeciclina através da superexpressão da bomba (312). Entretanto o papel de mutações em Rob e nos genes codificadores da bomba AcrB e TolC não está estabelecido. Assim, acreditamos que seriam necessários mais estudos funcionais do papel das mutações encontradas nestas proteínas, nos demais reguladores dessa amostra, assim como a análise dos padrões de expressão dessas proteínas para elucidar seu papel na resistência a tigeciclina.

Realizamos também pesquisa de mutações nas proteínas reguladoras (OqxR e RarA) da bomba OqxAB que tem sido muito associada a resistência a quinolonas, mas também descrita envolvida com resistência a cloranfenicol, beta-lactâmicos e tigeciclina. Observamos duas mutações preditas como possivelmente deletérias pelo *software* Provean em OqxR: mutação V130A (troca de uma valina por alanina) nas amostras do CC11 positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub> (CCBH5623, CCBH5745 e CCBH5982) e inserção de oito resíduos LGRNGSIH na amostra CCBH13327, positiva para *bla*<sub>NDM-1</sub>.

Na literatura, pesquisadores já puderam observar mutações em OqxR associadas ao aumento da expressão de OqxAB. Bialek e colaboradores observaram que a mutação V102G nesse regulador aumentou a expressão da bomba OqxAB, contribuindo para a resistência frente a fluoroquinolonas, cloranfenicol e beta-lactâmicos (313).

No estudo de Bowers e colaboradores, publicado em 2015, observaram nas amostras do CC258 (ou CC11) produtoras de KPC as mesmas mutações encontradas em nosso trabalho nas amostras deste complexo (310). Valeba e colaboradores também observaram essas mutações mas não foi possível associar experimentalmente essas mudanças a um aumento ou diminuição da expressão desse repressor (141).

Se tratando de RarA, este ativador tem sido associado ao aumento da expressão da bomba OqxAB gerando um ligeiro aumento da resistência a tigeciclina (155). Quando superexpresso, RarA confere um fenótipo de multirresistência que inclui variadas classes de

antimicrobianos (cloranfenicol, ciprofloxacina, norfloxacina, olaquinox, tetraciclina, e também a tigeciclina). Funcionalmente, foi observado que este fenotipo de multiresistência é independente de outros reguladores como MarA, RamA, SoxS e Rob, entretanto requer a presença da bomba AcrAB funcional (314). Valeba e colaboradores observaram diversas mutações neste gene em amostras resistentes e sensíveis a tigeciclina, incluindo a presença de stop códons prematuros, mas não foi possível associá-los diretamente a aumento ou diminuição a expressão desse regulador (141).

Nas amostras do nosso trabalho, observamos mutações preditas como deletórias na amostra CCBH16302 positiva para *bla*<sub>NDM-1</sub> (stop códon na posição 119) e alteração de uma glutamina por uma arginina na posição 96 da amostra CCBH13796 positiva para *bla*<sub>OXA-370</sub>. Essas amostras foram consideradas resistentes a tigeciclina de acordo com a Nota Técnica N°01/2013 da ANVISA, bem como apresentaram resistência também a todos os antimicrobianos testados, com exceção de amicacina, fosfomicina/trometamol e polimixina B. Acreditamos que desta forma, a presença de mutações deletórias possam estar envolvidas no fenótipo de multiresistência destas amostras, entretanto estudos funcionais caracterizando o papel das mutações apresentadas nos reguladores, bem como a análise da expressão desses e das respectivas bombas de efluxo se fazem necessários.

Em relação às mutações em proteínas associadas à resistência a fosfomicina (MurA, GlpT e UhpT) não encontramos nenhuma mutação considerada possivelmente deletória. Peixe e colaboradores estudaram um grupo de amostras de *E. coli* e *K. pneumoniae* isoladas em Portugal resistentes a cefalosporinas de terceira geração e fosfomicina e não observaram mutações nesses genes em amostras de *K. pneumoniae* resistentes a esse antimicrobiano nem tampouco genes da família *fos* (*fosA*, *fosA3*, *fosB*, *fosC2*) (315). Desta forma, acreditamos que mais estudos sejam necessários para elucidar os mecanismos de resistência a fosfomicina nestas amostras.

Em *K. pneumoniae* tem sido descrita a participação de perdas ou diminuição da expressão de porinas na resistência a alguns antimicrobianos, tais como beta-lactâmicos, incluindo os carbapenemas, mas também a fluoroquinolonas, cloranfenicol e tetraciclina. As porinas mais importantes em *K. pneumoniae* são OmpK35 e OmpK36, onde mutações pontuais, inserções e deleções têm sido associadas aos fenômenos de resistência (29). Dessa forma, pesquisamos mutações nas porinas OmpK35 e OmpK36 comparando as sequências das amostras produtoras de carbapenemases com as sequências definidas como porinas

selvagens (sem mutações) em artigos da literatura e realizamos a predição através do *software* Provean.

Mutações preditas como possivelmente deletérias foram encontradas em todas as porinas OmpK36 das amostras do estudo, com exceção da amostra CCB16302, positiva para *bla<sub>NDM-1</sub>* do ST138. Das mutações, duas foram stop códons prematuros nas amostras CCBH6707 (positiva para *bla<sub>KPC-2</sub>*) e CCBH13796 (positiva para *bla<sub>OXA-370</sub>*). Já na OmpK35, mutações preditas como deletérias foram encontradas somente na amostra CCBH16302 e nas duas amostras do ST16 positivas para *bla<sub>OXA-370</sub>* (stop códons prematuros).

No estudo de Clancy e colaboradores com 23 amostras produtoras de KPC-2 do ST258, observou-se a OmpK35 com stop códon prematuro na posição 89 em todas as amostras. Em 18 amostras, foi possível observar mutações em OmpK36, sendo as mais frequentes: inserção de IS5 e inserção de uma glicina e ácido aspártico nas posições 134 e 135. O sítio entre os resíduos 134 e 135 ficam numa região do domínio transmembranar L3 (loop L3) que constitui o orifício da porina. Mutações nessas regiões foram implicadas na diminuição da entrada de carbapenemas na célula. Assim, neste estudo a inserção de IS5 e mutações nos resíduos 134 e 135 foram associadas a maiores CIM frente à doripenem quando comparadas a outras mutações ou a porina selvagem (316).

Em nosso trabalho, as amostras CCBH14393 e CCBH14119 positivas para *bla<sub>OXA-370</sub>* do ST16 apresentaram uma inserção de um ácido aspártico na região 134-135 da OmpK36 e outras mutações consideradas possivelmente deletérias pelo *software* Provean (190,AL,WS; 304,N,ER). Além dessa mutação, essas amostras apresentaram também stop códons prematuros na OmpK35, o que provavelmente acarreta a não expressão ou uma porina deficiente. Acreditamos que estes dados em conjunto podem estar relacionados ao aumento da resistência dessas amostras frente aos diferentes antimicrobianos.

As amostras do CC11 positivas para *bla<sub>KPC-2</sub>* e a amostra CCBH15949 positiva para *bla<sub>NDM-1</sub>* (ST37, prevalente entre as amostras de NDM-1) apresentaram as mesmas mutações preditas como deletérias (183,A,ALSP e 222,TD,LG) em OmpK36. Mutações similares já foram encontradas em amostras do ST11 isoladas da China (317). Essas mutações estão localizadas na região do loop 4 e na região de alfa hélice 2. Este estudo levanta a hipótese de que assim como as mutações encontradas no loop 3 na posição 134 e 135 foram relacionadas a diminuição do aporte de carbapenemas em estudos anteriores, mutações em estruturas

secundárias poderiam afetar também a resistência a beta-lactâmicos (317). Entretanto, estudos funcionais seriam necessários para elucidar completamente a hipótese.

Na amostra CCBH1337, positiva para *bla*<sub>NDM-1</sub>, observamos a porina OmpK35 selvagem, entretanto, a primeira metionina foi encontrada 33 nucleotídeos após a metionina que dá início à transcrição encontrada na sequência da porina selvagem. Acreditamos que esta mutação, que foi predita como possivelmente deletéria pelo *software* Provean, pode gerar uma proteína deficiente em 33 aminoácidos.

A análise da sequência das porinas também tem sido utilizadas para agrupar amostras. No estudo de Yan e colaboradores, 185 amostras de *K. pneumoniae* pertencentes a 59 *sequence types* foram agrupadas com base nas sequências da porina OmpK36. Os ST encontrados foram agrupados em quatro grupos de alelos OmpK36 (grupos A a D): clones epidêmicos encontrados em diferentes partes do mundo foram classificados como Grupo A (ST11, ST15, ST37 e ST147), enquanto seis *sequence types* (ST23, ST65, ST86, ST163, ST373 e ST375) que têm sido atribuídos a amostras causando abscessos hepáticos foram agrupadas no grupo C. Segundo os autores, a associação entre grupos clonais e sequência de OmpK36 podem ser resultado de uma evolução convergente impulsionada pela pressão seletiva do uso de antimicrobianos e fatores do hospedeiro (318).

Papagiannitsis e colaboradores (2013) também realizaram o agrupamento de amostras através das sequências de OmpK35 e OmpK36. Neste estudo, foram observadas duas sequências diferentes para OmpK35 (OmpK35\_v1 e OmpK35\_v2) e nove diferentes para o gene OmpK36 (OmpK36\_v1 a v9) em 32 amostras de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases multirresistentes da Grécia. As variantes OmpK36\_v1 e OmpK36\_v3 foram observadas nas amostras dos ST258 e ST147 respectivamente. OmpK35\_v1 apresentando stop códons prematuros nas posições 89 e 173 foram observadas entre os mesmos ST. Na amostra representante do ST11 deste artigo, observou-se a porina OmpK35\_v1 com stop códon na posição 230 e OmpK36\_v1 na posição 76 e na amostra do ST340 as mesmas variantes. Entretanto, a OmpK35 apresentou a inserção de uma ISI (319). Na amostra de nosso trabalho do ST11, bem como nas amostras dos ST340 e ST437 (todas do CC11 positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub>), observamos as mesmas variantes de porinas (OmpK36\_v1 e OmpK35\_v1) sem, contudo, apresentar os respectivos stop códons prematuros e sequências de inserção. Duas amostras desse artigo foram caracterizadas como ST323 e apresentaram as variantes OmpK35\_v1 e OmpK36\_v6. Na amostra de nosso trabalho pertencente a este ST

(CCBH13327), observamos as mesmas sequencias, entretanto com a deleção dos 33 resíduos iniciais da OmpK36\_v6.

No estudo de Bowers e colaboradores (2015), todas as amostras do ST258 apresentaram a mesma sequencia de OmpK35 com um stop códon prematuro, entretanto, em amostras de ST diferentes, outras cinco variantes desse gene foram observadas. A maior diversidade foi encontrada nas sequencias de OmpK36: 40 variantes diferentes, com mudanças principalmente em regiões de loops extracelulares que presumidamente diversificam as interações ambientais e podem potencialmente influenciar na resposta imune e aderência às células do hospedeiro. Neste estudo, 76% das amostras do CC258 (ou CC11) e 76% das amostras do ST258 apresentaram uma OmpK36 similar (310). Dessa forma, acreditamos que mais estudos sejam necessários para padronização de metodologias de tipagem e caracterização de amostras com base nas sequencias de porinas.

Com o intuito de avaliar a relação filogenética entre as diferentes amostras produtoras de carbapenemases e comparar com o agrupamento obtido através do *software* Eburst com os dados fornecidos pelo MLST, realizamos análise filogenética das amostras utilizando o *software* CSI Phylogeny 1.1. As amostras pertencentes ao CC11 positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub> sequenciadas (CCBH5623, CCBH5745 e CCBH5982) ficaram agrupadas na árvore filogenética gerada, assim como as amostras CCBH14393 e CCBH14119, positivas para *bla*<sub>OXA-370</sub> pertencente ao ST16, corroborando com os resultados do MLST.

As amostras CCBH6707 (positiva para *bla*<sub>KPC-2</sub>) e a amostra CCBH13327 (positiva para *bla*<sub>NDM-1</sub>) também ficaram agrupadas na árvore filogenética. Elas foram designadas como ST25 e ST323 respectivamente através do MLST e compartilham quatro dos sete genes do esquema (*gapA*, *infB*, *mdh* e *pgi*).

Conforme esperado, a amostra CCBH16302 positiva para *bla*<sub>NDM-1</sub>, que apresentou um grande número de mutações quando comparada a amostra MGH78578 nos genes relacionados à resistência avaliados ficou agrupada com a amostra HKUOPLC (Número de acesso GenBank: CP012300.1), proveniente de fezes de panda de Hong Kong. Elas foram consideradas próximas entre si, mas distantes das demais amostras. Dessa forma acreditamos que o MLST, utilizando sete genes conservados do genoma e a análise filogenética com dados do genoma completo utilizando a plataforma CSI Phylogeny apresentaram boa correlação no grupo de amostras estudadas.

Assim, realizando uma avaliação da presença de genes de resistência, mutações e a relação filogenética das amostras sequenciadas, observamos que as amostras do Complexo Clonal 11, mais importante em termos da dispersão de KPC em nosso país e no mundo, apresentaram um grande número de genes de resistência a várias classes de antimicrobianos e as mesmas mutações associadas à resistência (GyrA, ParC, OqxR) e na porina OmpK36, encontradas também por Bowers e colaboradores nas amostras desse complexo (310). Na amostra do ST437 desse Complexo Clonal, bastante reportado em nosso país e considerado o mais prevalente durante nosso estudo do mestrado, além dos genes supracitados encontramos mutações importantes nos reguladores RamA e RamR, associados principalmente a resistência a tigeciclina. Nas amostras sequenciadas positivas para *bla*<sub>OXA-370</sub> do ST16, que contemplou 95,5% das amostras positivas para *bla*<sub>OXA-370</sub> do nosso estudo, observamos as mesmas mutações em GyrA, ParC, ParE e nas OmpK35 e OmpK36 e um grande número de genes de resistência a variadas classes de antimicrobianos. Em contrapartida, não foram encontradas mutações relacionadas à GyrA, ParC e ParE, e poucas mutações nos demais genes avaliados nas amostras positivas para *bla*<sub>NDM-1</sub> dos diferentes ST, incluindo o clone prevalente ST37. Estes achados podem indicar que a ocorrência de várias mutações favoráveis e o acúmulo de genes de resistência podem contribuir para o fenótipo de resistência e consequentemente, auxiliar no sucesso de um determinado clone, por possuírem genes que contribuem para melhor adaptação a diferentes ambientes, contribuindo para sua disseminação.

## 6. CONCLUSÕES

★ Todas as amostras apresentaram fenótipo de multirresistência, sendo dez amostras resistentes a oito das nove classes de antimicrobianos testadas. Este fato é bastante preocupante devido à limitação das opções de tratamento de amostras produtoras de carbapenemases.

★ A detecção de genes adquiridos codificadores de beta-lactamases (*bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>), de resistência a aminoglicosídeos [*rmtB*; *aadA*; *aac(3')-I*; *aac(6')Ib*; *aac(6')Ib-cr*; *strA*; *strB*; *aacC2*; *aph(3')-Ia*; *ant(3)-Ia*; *aph(6)-Id*; *aacA4*], quinolonas (*qnrA*; *qnrB*; *qnrS*; *oqxA*; *oqxB*), fosfomicina (*fosA*), sulfonamidas (*sul1*; *sul2*), macrolídeos (*mphA*), fenicóis (*catA1*, *catB3*; *cmlA1*), tetraciclinas [*tet(D)*; *tet(R)*, *tet(A)* e *tet(G)*], rifampicinas (*arr-3*; *arr-5*) e trimetoprima (*dfrA8*, *dfrA12*; *dfrA14*; *dfrA15*; *dfrA16*; *dfrA30*) observados através de PCR e sequenciamento genômico, demonstram a grande capacidade de aquisição e disseminação de diferentes mecanismos de resistência a diferentes antimicrobianos entre as amostras de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases.

★ Além dos genes de resistência adquiridos, observamos mutações em genes relacionados à resistência a quinolonas (*gyrA*, *parC*, *parE*, *oqxR*) e tigeciclina (*ramR* e *acrR*) bem como mutações nos genes codificadores das porinas OmpK35 e OmpK36 através de análise do sequenciamento genômico, demonstrando o grande arsenal de resistência carregado por essas amostras.

★ Não observamos, entre as amostras produtoras de carbapenemases, os principais fatores de virulência associados às amostras hipervirulentas, como *magA* (*wzy*<sub>KPK1</sub>), *rmpA*, *rmpA2*. Detectamos na grande maioria das amostras genes associados à adesão e sobrevivência bacteriana, como produção de fimbrias e adesinas (*mrkD* = 96,9%; *fimH*=100%; *ycfm* = 100%) e transporte de sideróforos (*entB*=100%).

★ Nas amostras positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub> de nosso estudo encontramos a estrutura completa do Tn4401 isoforma b em 84,3% das amostras. Observamos o gene *bla*<sub>KPC-2</sub> associado a um plasmídeo de tamanho aproximado de 40kb em 41,9% das amostras. Em quatro das cinco amostras sequenciadas, observamos plasmídios com estrutura genética similar a um plasmídeo descrito em São Paulo, mostrando o possível papel deste plasmídeo na disseminação de *bla*<sub>KPC-2</sub> em nosso país.

★ Nas amostras positivas para *bla*<sub>NDM-1</sub> observamos a associação do gene *bla*<sub>NDM-1</sub> com *IS**Aba125* e *ble*<sub>MBL</sub> em todas as amostras, entretanto, somente em uma amostra foi possível identificar o plasmídeo carreador desse gene (plasmídeo de 190kb). Nas três amostras no qual foi possível realizar o sequenciamento genômico, o *bla*<sub>NDM-1</sub> foi encontrado no Tn3000, já descrito anteriormente em amostras carreadoras de NDM-1 do nosso estado.

★ O gene *bla*<sub>OXA-370</sub> foi encontrado em plasmídios de 25kb (duas amostras), 50 kb e 117kb. Através do sequenciamento em três representantes, este gene estava flanqueado *upstream* por uma Tn3 truncada por IS5075-like e *downstream* por uma Tn4 truncada por IS15-like, assim como foi anteriormente descrito na amostra portadora desse gene isolada no Rio Grande do Sul.

★ Observamos 30 perfis de fragmentação de DNA e 27 *sequence types* através de PFGE e MLST respectivamente. Entre as amostras positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub> observamos principalmente os grupos KPC\_A/ST437; KPC\_C/ST11 e KPC\_Q/ST340, que são pertencentes ao Complexo Clonal 11, importante mundialmente relacionado à disseminação dessa carbapenemase. Nas amostras positivas para *bla*<sub>NDM-1</sub> e *bla*<sub>OXA-370</sub>, o destaque foi para o grupo clonal NDM\_A/ST37 (41,6%) e OXA-370\_A/ST16 (95,4%) respectivamente. A análise filogenética utilizando os dados do genoma corroborou os agrupamentos realizados através de MLST, mostrando boa correlação.

★ Nas amostras do Complexo Clonal 11 positivas para *bla*<sub>KPC-2</sub> e nas amostras do ST16 positivas para *bla*<sub>OXA-370</sub> observamos o acúmulo de mutações associadas a genes de resistência e nas porinas. Acreditamos que estas mutações podem contribuir para o fenótipo de resistência e, conseqüentemente, auxiliar no sucesso desses clones prevalentes.

★ Concluimos que este estudo alerta para a presença de amostras multirresistentes produtoras de carbapenemas em nosso país carregando um grande arsenal de genes de resistência adquirida associados a elementos genéticos moveis, mas também apresentando mutações associadas à resistência e carregando alguns genes de virulência, fato preocupante devido às limitações das opções de tratamento dessas amostras.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fleming A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. 1929. Bulletin of the World Health Organization. 2001;79(8):780-90.
2. Domagk G. Twenty-five years of sulfonamide therapy. Annals of the New York Academy of Sciences. 1957;69(3):380-4.
3. Tenover FC. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. The American journal of medicine. 2006;119(6 Suppl 1):S3-10; discussion S62-70.
4. WHO. ANTIMICROBIAL RESISTANCE Global Report on Surveillance 2014.
5. Ventola CL. The antibiotic resistance crisis: part 2: management strategies and new agents. P & T : a peer-reviewed journal for formulary management. 2015;40(5):344-52.
6. O'NEILL J. SECURING NEW DRUGS FOR FUTURE GENERATIONS: THE PIPELINE OF ANTIBIOTICS - THE REVIEW ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE. Review on Antimicrobial Resistance. 2015.
7. Power E. Impact of antibiotic restrictions: the pharmaceutical perspective. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2006;12 Suppl 5:25-34.
8. Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA. Carbapenems: past, present, and future. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2011;55(11):4943-60.
9. WHO. Prevention of hospital-acquired infections A PRACTICAL GUIDE. 2 ed 2002 2002.
10. Landman D, Bratu S, Kochar S, Panwar M, Trehan M, Doymaz M, et al. Evolution of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, NY. The Journal of antimicrobial chemotherapy. 2007;60(1):78-82.
11. Dzidic S SJ, Kos B. . Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects. Food Technol Biotechnol. 2008;46(1):11-21.
12. Landers TF, Cohen B, Wittum TE, Larson EL. A review of antibiotic use in food animals: perspective, policy, and potential. Public health reports. 2012;127(1):4-22.
13. Fletcher S. Understanding the contribution of environmental factors in the spread of antimicrobial resistance. Environmental health and preventive medicine. 2015;20(4):243-52.
14. Allen HK, Trachsel J, Looft T, Casey TA. Finding alternatives to antibiotics. Annals of the New York Academy of Sciences. 2014;1323:91-100.
15. CDC. ANTIMICROBIAL RESISTANCE THREATS in the United States, 2013. US Department of Health. 2013.
16. ECDC. Annual epidemiological report 2014. Antimicrobial resistance and healthcare-associated infections. European Centre for Disease Prevention and Control. 2015.
17. Gales AC, Castanheira M, Jones RN, Sader HS. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). Diagnostic microbiology and infectious disease. 2012;73(4):354-60.
18. ANVISA. Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde - Rede RM: Resistência Microbiana em IPCSL relacionada a CVC em UTI (2013). Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). 2014.
19. Dworkin M FS, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E. The prokaryotes: Ecophysiology and biochemistry. 2006;3ed(New York):USA: Springer.
20. Abbott SL. Chapter 37 : *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Plesiomonas*, and Other Enterobacteriaceae. Manual of Clinical Microbiology, 10th Edition. 2011.
21. Rosenberg E. The Prokaryotes - Gammaproteobacteria Springer Heidelberg New York Dordrecht London. 2013;Volume 9.

22. Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical microbiology reviews*. 1998;11(4):589-603.
23. Koneman EW AS, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. . *Diagnóstico microbiológico*. 5ed. Rio de Janeiro: Medisi. 2001.
24. McClelland M, Florea L, Sanderson K, Clifton SW, Parkhill J, Churcher C, et al. Comparison of the *Escherichia coli* K-12 genome with sampled genomes of a *Klebsiella pneumoniae* and three *salmonella enterica* serovars, Typhimurium, Typhi and Paratyphi. *Nucleic acids research*. 2000;28(24):4974-86.
25. Podschun R, Pietsch S, Holler C, Ullmann U. Incidence of *Klebsiella* species in surface waters and their expression of virulence factors. *Applied and environmental microbiology*. 2001;67(7):3325-7.
26. Kuhn I, Ayling-Smith B, Tullus K, Burman LG. The use of colonization rate and epidemic index as tools to illustrate the epidemiology of faecal *Enterobacteriaceae* strains in Swedish neonatal wards. *The Journal of hospital infection*. 1993;23(4):287-97.
27. Williamson R, Collatz E, Gutmann L. [Mechanisms of action of beta-lactam antibiotics and mechanisms of non-enzymatic resistance]. *Presse medicale*. 1986;15(46):2282-9.
28. Drawz SM, Bonomo RA. Three decades of beta-lactamase inhibitors. *Clinical microbiology reviews*. 2010;23(1):160-201.
29. Jacoby GA, Mills DM, Chow N. Role of beta-lactamases and porins in resistance to ertapenem and other beta-lactams in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2004;48(8):3203-6.
30. Kobayashi N, Nishino K, Yamaguchi A. Novel macrolide-specific ABC-type efflux transporter in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*. 2001;183(19):5639-44.
31. Sun J, Deng Z, Yan A. Bacterial multidrug efflux pumps: mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochemical and biophysical research communications*. 2014;453(2):254-67.
32. Padilla E, Llobet E, Domenech-Sanchez A, Martinez-Martinez L, Bengoechea JA, Alberti S. *Klebsiella pneumoniae* AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010;54(1):177-83.
33. Abraham EP, Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940. *Reviews of infectious diseases*. 1988;10(4):677-8.
34. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010;54(3):969-76.
35. Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. *Clinical microbiology reviews*. 2009;22(1):161-82, Table of Contents.
36. Haeggman S, Lofdahl S, Paauw A, Verhoef J, Brisse S. Diversity and evolution of the class A chromosomal beta-lactamase gene in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2004;48(7):2400-8.
37. Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clinical microbiology reviews*. 2001;14(4):933-51, table of contents.
38. Paterson DL. Resistance in gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. *American journal of infection control*. 2006;34(5 Suppl 1):S20-8; discussion S64-73.
39. Heritage J, Hawkey PM, Todd N, Lewis IJ. Transposition of the gene encoding a TEM-12 extended-spectrum beta-lactamase. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1992;36(9):1981-6.
40. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clinical microbiology reviews*. 2005;18(4):657-86.
41. Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2004;48(1):1-14.

42. Mathers AJ, Peirano G, Pitout JD. The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Clinical microbiology reviews*. 2015;28(3):565-91.
43. Carvalho-Assef AP, Pereira PS, Albano RM, Beriao GC, Tavares CP, Chagas TP, et al. Detection of NDM-1-, CTX-M-15-, and qnrB4-producing *Enterobacter hormaechei* isolates in Brazil. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014;58(4):2475-6.
44. Seki LM, Pereira PS, de Souza Conceicao M, Souza MJ, Marques EA, Carballido JM, et al. Molecular epidemiology of CTX-M producing Enterobacteriaceae isolated from bloodstream infections in Rio de Janeiro, Brazil: emergence of CTX-M-15. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*. 2013;17(6):640-6.
45. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clinical microbiology reviews*. 2007;20(3):440-58, table of contents.
46. Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2014;20(9):821-30.
47. Nicoletti AG, Marcondes MF, Martins WM, Almeida LG, Nicolas MF, Vasconcelos AT, et al. Characterization of BKC-1 class A carbapenemase from *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in Brazil. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2015;59(9):5159-64.
48. Nordmann P, Poirel L, Walsh TR, Livermore DM. The emerging NDM carbapenemases. *Trends in microbiology*. 2011;19(12):588-95.
49. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2001;45(4):1151-61 (Erratum, 52:809, 2008.).
50. Smith Moland E, Hanson ND, Herrera VL, Black JA, Lockhart TJ, Hossain A, et al. Plasmid-mediated, carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2003;51(3):711-4.
51. Woodford N, Tierno PM, Jr., Young K, Tysall L, Palepou MF, Ward E, et al. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase, KPC-3, in a New York Medical Center. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2004;48(12):4793-9.
52. Bush K, Fisher JF. Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new beta-lactamases from gram-negative bacteria. *Annual review of microbiology*. 2011;65:455-78.
53. Walsh TR. Emerging carbapenemases: a global perspective. *International journal of antimicrobial agents*. 2010;36 Suppl 3:S8-14.
54. Naas T, Cuzon G, Villegas MV, Lartigue MF, Quinn JP, Nordmann P. Genetic structures at the origin of acquisition of the beta-lactamase blaKPC gene. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2008;52(4):1257-63.
55. Kitchel B, Rasheed JK, Patel JB, Srinivasan A, Navon-Venezia S, Carmeli Y, 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*. 2009;53(8):3365-70.
56. Naas T, Cuzon G, Truong HV, Nordmann P. Role of ISKpn7 and deletions in blaKPC gene expression. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012;56(9):4753-9.
57. Kitchel B, Rasheed JK, Endimiani A, Hujer AM, Anderson KF, Bonomo RA, et al. Genetic factors associated with elevated carbapenem resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010;54(10):4201-7.
58. Shen P, Wei Z, Jiang Y, Du X, Ji S, Yu Y, et al. Novel genetic environment of the carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2 among Enterobacteriaceae in China. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009;53(10):4333-8.

59. Wolter DJ, Kurpiel PM, Woodford N, Palepou MF, Goering RV, Hanson ND. Phenotypic and enzymatic comparative analysis of the novel KPC variant KPC-5 and its evolutionary variants, KPC-2 and KPC-4. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009;53(2):557-62.
60. Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA, Schwaber MJ, Daikos GL, Cormican M, et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *The Lancet Infectious diseases*. 2013;13(9):785-96.
61. Mavroidi A, Katsiari M, Likousi S, Palla E, Roussou Z, Nikolaou C, et al. Characterization of ST258 Colistin-Resistant, blaKPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* in a Greek Hospital. *Microbial drug resistance*. 2016.
62. Samuelsen O, Naseer U, Tofteland S, Skutlaberg DH, Onken A, Hjetland R, et al. Emergence of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates of sequence type 258 producing plasmid-mediated KPC carbapenemase in Norway and Sweden. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2009;63(4):654-8.
63. Baraniak A, Izdebski R, Herda M, Fiett J, Hryniewicz W, Gniadkowski M, et al. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* ST258 with KPC-2 in Poland. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009;53(10):4565-7.
64. Osterblad M, Kirveskari J, Koskela S, Tissari P, Vuorenoja K, Hakanen AJ, et al. First isolations of KPC-2-carrying ST258 *Klebsiella pneumoniae* strains in Finland, June and August 2009. *Euro surveillance : bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2009;14(40).
65. Yoo JS, Kim HM, Yoo JI, Yang JW, Kim HS, Chung GT, et al. Detection of clonal KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST258 in Korea during nationwide surveillance in 2011. *Journal of medical microbiology*. 2013;62(Pt 9):1338-42.
66. Delfino E, Giacobbe DR, Del Bono V, Coppo E, Marchese A, Manno G, et al. First report of chronic pulmonary infection by KPC-3-producing and colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* sequence type 258 (ST258) in an adult patient with cystic fibrosis. *Journal of clinical microbiology*. 2015;53(4):1442-4.
67. Andrade LN, Curiao T, Ferreira JC, Longo JM, Climaco EC, Martinez R, 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*. 2011;55(7):3579-83.
68. Gomez SA, Pasteran FG, Faccone D, Tijet N, Rapoport M, Lucero C, et al. Clonal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* ST258 harbouring KPC-2 in Argentina. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2011;17(10):1520-4.
69. Deleo FR, Chen L, Porcella SF, Martens CA, Kobayashi SD, Porter AR, et al. Molecular dissection of the evolution of carbapenem-resistant multilocus sequence type 258 *Klebsiella pneumoniae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(13):4988-93.
70. Monteiro J, Santos AF, Asensi MD, Peirano G, Gales AC. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009;53(1):333-4.
71. Peirano G, Seki LM, Val Passos VL, Pinto MC, Guerra LR, Asensi MD. Carbapenem-hydrolysing beta-lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2009;63(2):265-8.
72. Pavez M, Mamizuka EM, Lincopan N. Early dissemination of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009;53(6):2702.
73. Seki LM, Pereira PS, de Souza Mda P, Conceicao Mde S, Marques EA, Porto CO, et al. Molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Brazil: the predominance of sequence type 437. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2011;70(2):274-7.

74. Pereira PS, de Araujo CF, Seki LM, Zahner V, Carvalho-Assef AP, Asensi MD. Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: spread of clonal complex 11 (ST11, ST437 and ST340). *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2013;68(2):312-6.
75. Tavares CP, Pereira PS, Marques Ede A, Faria C, Jr., de Souza Mda P, de Almeida R, et al. Molecular epidemiology of KPC-2-producing Enterobacteriaceae (non-*Klebsiella pneumoniae*) isolated from Brazil. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2015;82(4):326-30.
76. Jacome PR, Alves LR, Cabral AB, Lopes AC, Maciel MA. First report of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Brazil. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012;56(9):4990.
77. Almeida AC, Vilela MA, Cavalcanti FL, Martins WM, Morais MA, Jr., Morais MM. First description of KPC-2-producing *Pseudomonas putida* in Brazil. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012;56(4):2205-6.
78. Johnson AP, Woodford N. Global spread of antibiotic resistance: the example of New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM)-mediated carbapenem resistance. *Journal of medical microbiology*. 2013;62(Pt 4):499-513.
79. Patrice Nordmann LD, Laurent Poirel. Infections Due to NDM-1 producers. *Emerging Infectious Diseases: Clinical Case Studies*. 2014;Chapter: 21, (Publisher: Elsevier, Editors: Ergonul O.):275-95.
80. Huang TW, Wang JT, Lauderdale TL, Liao TL, Lai JF, Tan MC, et al. Complete sequences of two plasmids in a blaNDM-1-positive *Klebsiella oxytoca* isolate from Taiwan. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2013;57(8):4072-6.
81. Poirel L, Yilmaz M, Istanbulu A, Arslan F, Mert A, Bernabeu S, et al. Spread of NDM-1-producing Enterobacteriaceae in a neonatal intensive care unit in Istanbul, Turkey. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014;58(5):2929-33.
82. Khajuria A, Praharaj AK, Kumar M, Grover N. Carbapenem Resistance among Enterobacter Species in a Tertiary Care Hospital in Central India. *Chemotherapy research and practice*. 2014;2014:972646.
83. Huang YM, Zhong LL, Zhang XF, Hu HT, Li YQ, Yang XR, et al. NDM-1-Producing *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, and *Acinetobacter baumannii* Identified from a Single Patient in China. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2015;59(8):5073-7.
84. Qin S, Qi H, Zhang Q, Zhao D, Liu ZZ, Tian H, et al. Emergence of Extensively Drug-Resistant *Proteus mirabilis* Harboring a Conjugative NDM-1 Plasmid and a Novel *Salmonella* Genomic Island 1 Variant, SGII-Z. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2015;59(10):6601-4.
85. Gruber TM, Gottig S, Mark L, Christ S, Kempf VA, Wichelhaus TA, et al. Pathogenicity of pan-drug-resistant *Serratia marcescens* harbouring blaNDM-1. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2015;70(4):1026-30.
86. Manageiro V, Sampaio DA, Pereira P, Rodrigues P, Vieira L, Palos C, et al. Draft Genome Sequence of the First NDM-1-Producing *Providencia stuartii* Strain Isolated in Portugal. *Genome announcements*. 2015;3(5).
87. Jovicic B, Lepsanovic Z, Suljagic V, Rackov G, Begovic J, Topisirovic L, et al. Emergence of NDM-1 metallo-beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Serbia. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011;55(8):3929-31.
88. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Worldwide dissemination of the NDM-type carbapenemases in Gram-negative bacteria. *BioMed research international*. 2014;2014:249856.
89. Carvalho-Assef AP, Pereira PS, Albano RM, Beriao GC, Chagas TP, Timm LN, et al. Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2013;68(12):2956-7.
90. Pagano M, Poirel L, Martins AF, Rozales FP, Zavascki AP, Barth AL, et al. Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter pittii* in Brazil. *International journal of antimicrobial agents*. 2015;45(4):444-5.
91. Rozales FP, Ribeiro VB, Magagnin CM, Pagano M, Lutz L, Falci DR, et al. Emergence of NDM-1-producing Enterobacteriaceae in Porto Alegre, Brazil. *International journal of infectious*

- diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases. 2014;25:79-81.
92. Pillonetto M, Arend L, Vespero EC, Pelisson M, Chagas TP, Carvalho-Assef AP, et al. First report of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* sequence type 25 in Brazil. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014;58(12):7592-4.
93. T.P.G C. Detection of an NDM-1-producing *Acinetobacter bereziniae* strain in Brazil. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2015;3(2):147-8.
94. do Carmo Junior NV, Filho HF, Gomes ECDA, Calvalcante AJ, de Oliveira Garcia D, Furtado JJ. First report of a NDM-producing *Providencia rettgeri* strain in the state of Sao Paulo. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*. 2015;19(6):675-6.
95. Pereira PS, Borghi M, Albano RM, Lopes JC, Silveira MC, Marques EA, et al. Coproduction of NDM-1 and KPC-2 in *Enterobacter hormaechei* from Brazil. *Microbial drug resistance*. 2015;21(2):234-6.
96. Pereira PS, Albano RM, Asensi MD, Carvalho-Assef AP. Draft genome sequences of three NDM-1-producing *Enterobacteriaceae* species isolated from Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2015;110(4):580-2.
97. Poirel L, Naas T, Nordmann P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010;54(1):24-38.
98. Evans BA, Amyes SG. OXA beta-lactamases. *Clinical microbiology reviews*. 2014;27(2):241-63.
99. Poirel L, Potron A, Nordmann P. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2012;67(7):1597-606.
100. Poirel L, Heritier C, Tolun V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2004;48(1):15-22.
101. Nazic H, Poirel L, Nordmann P. Further identification of plasmid-mediated quinolone resistance determinant in *Enterobacteriaceae* in Turkey. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2005;49(5):2146-7.
102. Gulmez D, Woodford N, Palepou MF, Mushtaq S, Metan G, Yakupogullari Y, et al. Carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from Turkey with OXA-48-like carbapenemases and outer membrane protein loss. *International journal of antimicrobial agents*. 2008;31(6):523-6.
103. Carrer A, Poirel L, Eraksoy H, Cagatay AA, Badur S, Nordmann P. Spread of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Istanbul, Turkey. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2008;52(8):2950-4.
104. Potron A, Poirel L, Rondinaud E, Nordmann P. Intercontinental spread of OXA-48 beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* over a 11-year period, 2001 to 2011. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2013;18(31).
105. Zong Z. Discovery of bla(OXA-199), a chromosome-based bla(OXA-48)-like variant, in *Shewanella xiamenensis*. *PloS one*. 2012;7(10):e48280.
106. Hrabak J, Studentova V, Walkova R, Zemlickova H, Jakubu V, Chudackova E, et al. Detection of NDM-1, VIM-1, KPC, OXA-48, and OXA-162 carbapenemases by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of clinical microbiology*. 2012;50(7):2441-3.
107. Kalpoe JS, Al Naiemi N, Poirel L, Nordmann P. Detection of an Ambler class D OXA-48-type beta-lactamase in a *Klebsiella pneumoniae* strain in The Netherlands. *Journal of medical microbiology*. 2011;60(Pt 5):677-8.
108. Castanheira M, Deshpande LM, Mathai D, Bell JM, Jones RN, Mendes RE. Early dissemination of NDM-1- and OXA-181-producing *Enterobacteriaceae* in Indian hospitals: report

- from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2006-2007. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011;55(3):1274-8.
109. Williamson DA, Heffernan H, Sidjabat H, Roberts SA, Paterson DL, Smith M, et al. Intercontinental transfer of OXA-181-producing *Klebsiella pneumoniae* into New Zealand. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2011;66(12):2888-90.
110. Potron A, Nordmann P, Poirel L. Characterization of OXA-204, a carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2013;57(1):633-6.
111. Potron A, Rondinaud E, Poirel L, Belmonte O, Boyer S, Camiade S, et al. Genetic and biochemical characterisation of OXA-232, a carbapenem-hydrolysing class D beta-lactamase from Enterobacteriaceae. *International journal of antimicrobial agents*. 2013;41(4):325-9.
112. Oteo J, Hernandez JM, Espasa M, Fleites A, Saez D, Bautista V, et al. Emergence of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* and the novel carbapenemases OXA-244 and OXA-245 in Spain. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2013;68(2):317-21.
113. Poirel L, Castanheira M, Carrer A, Rodriguez CP, Jones RN, Smayevsky J, et al. OXA-163, an OXA-48-related class D beta-lactamase with extended activity toward expanded-spectrum cephalosporins. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011;55(6):2546-51.
114. Gomez S, Pasteran F, Faccone D, Bettiol M, Veliz O, De Belder D, et al. Inpatient emergence of OXA-247: a novel carbapenemase found in a patient previously infected with OXA-163-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2013;19(5):E233-5.
115. Sampaio JL, Ribeiro VB, Campos JC, Rozales FP, Magagnin CM, Falci DR, et al. Detection of OXA-370, an OXA-48-related class D beta-lactamase, in *Enterobacter hormaechei* from Brazil. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014;58(6):3566-7.
116. Pereira PS, Borghi M, de Araujo CF, Aires CA, Oliveira JC, Asensi MD, et al. Clonal Dissemination of OXA-370-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Rio de Janeiro, Brazil. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2015;59(8):4453-6.
117. Ramirez MS, Tolmasky ME. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*. 2010;13(6):151-71.
118. Yokoyama K, Doi Y, Yamane K, Kurokawa H, Shibata N, Shibayama K, et al. Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet*. 2003;362(9399):1888-93.
119. Doi Y, Arakawa Y. 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2007;45(1):88-94.
120. Doi Y, Yokoyama K, Yamane K, Wachino J, Shibata N, Yagi T, et al. Plasmid-mediated 16S rRNA methylase in *Serratia marcescens* conferring high-level resistance to aminoglycosides. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2004;48(2):491-6.
121. Galimand M, Sabtcheva S, Courvalin P, Lambert T. Worldwide disseminated armA aminoglycoside resistance methylase gene is borne by composite transposon Tn1548. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2005;49(7):2949-53.
122. Wachino J, Yamane K, Shibayama K, Kurokawa H, Shibata N, Suzuki S, et al. Novel plasmid-mediated 16S rRNA methylase, RmtC, found in a proteus mirabilis isolate demonstrating extraordinary high-level resistance against various aminoglycosides. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2006;50(1):178-84.
123. Doi Y, de Oliveira Garcia D, Adams J, Paterson DL. Coproduction of novel 16S rRNA methylase RmtD and metallo-beta-lactamase SPM-1 in a panresistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from Brazil. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007;51(3):852-6.
124. Bueno MF, Francisco GR, O'Hara JA, de Oliveira Garcia D, Doi Y. Coproduction of 16S rRNA methyltransferase RmtD or RmtG with KPC-2 and CTX-M group extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2013;57(5):2397-400.

125. Davis MA, Baker KN, Orfe LH, Shah DH, Besser TE, Call DR. Discovery of a gene conferring multiple-aminoglycoside resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010;54(6):2666-9.
126. Galimand M, Courvalin P, Lambert T. RmtF, a new member of the aminoglycoside resistance 16S rRNA N7 G1405 methyltransferase family. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012;56(7):3960-2.
127. O'Hara JA, McGann P, Snesrud EC, Clifford RJ, Waterman PE, Lesho EP, et al. Novel 16S rRNA methyltransferase RmtH produced by *Klebsiella pneumoniae* associated with war-related trauma. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2013;57(5):2413-6.
128. Wachino J, Shibayama K, Kurokawa H, Kimura K, Yamane K, Suzuki S, et al. Novel plasmid-mediated 16S rRNA m1A1408 methyltransferase, NpmA, found in a clinically isolated *Escherichia coli* strain resistant to structurally diverse aminoglycosides. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007;51(12):4401-9.
129. Hooper DC, Jacoby GA. Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2015;1354:12-31.
130. Fu Y, Zhang W, Wang H, Zhao S, Chen Y, Meng F, et al. Specific patterns of *gyrA* mutations determine the resistance difference to ciprofloxacin and levofloxacin in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *BMC infectious diseases*. 2013;13:8.
131. Bagel S, Hullen V, Wiedemann B, Heisig P. Impact of *gyrA* and *parC* mutations on quinolone resistance, doubling time, and supercoiling degree of *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1999;43(4):868-75.
132. Mazzariol A, Zuliani J, Cornaglia G, Rossolini GM, Fontana R. AcrAB Efflux System: Expression and Contribution to Fluoroquinolone Resistance in *Klebsiella* spp. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2002;46(12):3984-6.
133. Ferrari RG, Galiana A, Cremades R, Rodriguez JC, Magnani M, Tognim MC, et al. Expression of the *marA*, *soxS*, *acrB* and *ramA* genes related to the AcrAB/TolC efflux pump in *Salmonella enterica* strains with and without quinolone resistance-determining regions *gyrA* gene mutations. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*. 2013;17(2):125-30.
134. Martinez-Martinez L, Pascual A, Conejo Mdel C, Garcia I, Joyanes P, Domenech-Sanchez A, et al. Energy-dependent accumulation of norfloxacin and porin expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and relationship to extended-spectrum beta-lactamase production. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2002;46(12):3926-32.
135. Martinez-Martinez L, Pascual A, Jacoby GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet*. 1998;351(9105):797-9.
136. Jacoby GA, Strahilevitz J, Hooper DC. Plasmid-mediated quinolone resistance. *Microbiology spectrum*. 2014;2(5).
137. Jacoby GA, Strahilevitz J, DC H. Plasmid-mediated quinolone resistance. *MicrobiolSpectrum*. 2014;2(5):PLAS-0006-2013.
138. Yamane K, Wachino J, Suzuki S, Kimura K, Shibata N, Kato H, et al. New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007;51(9):3354-60.
139. Hansen LH, Johannesen E, Burmolle M, Sorensen AH, Sorensen SJ. Plasmid-encoded multidrug efflux pump conferring resistance to olaquinox in *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2004;48(9):3332-7.
140. Yuan J, Xu X, Guo Q, Zhao X, Ye X, Guo Y, et al. Prevalence of the *oqxAB* gene complex in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* clinical isolates. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2012;67(7):1655-9.
141. Veleba M, Higgins PG, Gonzalez G, Seifert H, Schneiders T. Characterization of RarA, a novel AraC family multidrug resistance regulator in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012;56(8):4450-8.

142. NK S, JW T. Fosfomycin : a Review. . *Infec Dis Clin Pract* 2001;10:255–60.
143. Souza AXd, Sant'Anna CMR. UDP-N-acetilglicosamina enolpiruvil transferase: determinação dos estados de protonação de resíduos de aminoácidos do sítio ativo pelo método PM6. *Química Nova*. 2012;35:1522-86.
144. Castañeda-García A, Blázquez J, Rodríguez-Rojas A. Molecular Mechanisms and Clinical Impact of Acquired and Intrinsic Fosfomycin Resistance. . *Antibiotics*. 2013;2:217-36.
145. Falagas ME, Kasiakou SK. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2005;40(9):1333-41.
146. Olaitan AO, Morand S, Rolain JM. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Frontiers in microbiology*. 2014;5:643.
147. Poirel L, Jayol A, Bontron S, Villegas MV, Ozdamar M, Turkoglu S, et al. The mgrB gene as a key target for acquired resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2015;70(1):75-80.
148. Olaitan AO, Diene SM, Kempf M, Berrazeg M, Bakour S, Gupta SK, et al. Worldwide emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* from healthy humans and patients in Lao PDR, Thailand, Israel, Nigeria and France owing to inactivation of the PhoP/PhoQ regulator mgrB: an epidemiological and molecular study. *International journal of antimicrobial agents*. 2014;44(6):500-7.
149. Gaibani P, Lombardo D, Lewis RE, Mercuri M, Bonora S, Landini MP, et al. In vitro activity and post-antibiotic effects of colistin in combination with other antimicrobials against colistin-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2014;69(7):1856-65.
150. Lopez-Camacho E, Gomez-Gil R, Tobes R, Manrique M, Lorenzo M, Galvan B, et al. Genomic analysis of the emergence and evolution of multidrug resistance during a *Klebsiella pneumoniae* outbreak including carbapenem and colistin resistance. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2014;69(3):632-6.
151. Cannatelli A, D'Andrea MM, Giani T, Di Pilato V, Arena F, Ambretti S, et al. In vivo emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-type carbapenemases mediated by insertional inactivation of the PhoQ/PhoP mgrB regulator. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2013;57(11):5521-6.
152. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious diseases*. 2016;16(2):161-8.
153. Skov RL, Monnet DL. Plasmid-mediated colistin resistance (mcr-1 gene): three months later, the story unfolds. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2016;21(9).
154. Pankey GA. Tigecycline. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2005;56(3):470-80.
155. Sheng ZK, Hu F, Wang W, Guo Q, Chen Z, Xu X, et al. Mechanisms of tigecycline resistance among *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014;58(11):6982-5.
156. He F, Fu Y, Chen Q, Ruan Z, Hua X, Zhou H, et al. Tigecycline susceptibility and the role of efflux pumps in tigecycline resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *PloS one*. 2015;10(3):e0119064.
157. Bialek-Davenet S, Marcon E, Leflon-Guibout V, Lavigne JP, Bert F, Moreau R, et al. In vitro selection of ramR and soxR mutants overexpressing efflux systems by fluoroquinolones as well as cefoxitin in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011;55(6):2795-802.
158. Brisse S, Fevre C, Passet V, Issenhuth-Jeanjean S, Tournebize R, Diancourt L, et al. Virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*: identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization. *PloS one*. 2009;4(3):e4982.

159. Burmolle M, Bahl MI, Jensen LB, Sorensen SJ, Hansen LH. Type 3 fimbriae, encoded by the conjugative plasmid pOLA52, enhance biofilm formation and transfer frequencies in Enterobacteriaceae strains. *Microbiology*. 2008;154(Pt 1):187-95.
160. Di Martino P, Bertin Y, Girardeau JP, Livrelli V, Joly B, Darfeuille-Michaud A. Molecular characterization and adhesive properties of CF29K, an adhesin of *Klebsiella pneumoniae* strains involved in nosocomial infections. *Infection and immunity*. 1995;63(11):4336-44.
161. Pan YJ, Lin TL, Chen CT, Chen YY, Hsieh PF, Hsu CR, et al. Genetic analysis of capsular polysaccharide synthesis gene clusters in 79 capsular types of *Klebsiella* spp. *Scientific reports*. 2015;5:15573.
162. Hunt JJ, Wang JT, Callegan MC. Contribution of mucoviscosity-associated gene A (*magA*) to virulence in experimental *Klebsiella pneumoniae* endophthalmitis. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2011;52(9):6860-6.
163. Fang CT, Chuang YP, Shun CT, Chang SC, Wang JT. A novel virulence gene in *Klebsiella pneumoniae* strains causing primary liver abscess and septic metastatic complications. *The Journal of experimental medicine*. 2004;199(5):697-705.
164. Struve C, Bojer M, Nielsen EM, Hansen DS, Krogfelt KA. Investigation of the putative virulence gene *magA* in a worldwide collection of 495 *Klebsiella* isolates: *magA* is restricted to the gene cluster of *Klebsiella pneumoniae* capsule serotype K1. *Journal of medical microbiology*. 2005;54(Pt 11):1111-3.
165. Hsu CR, Lin TL, Chen YC, Chou HC, Wang JT. The role of *Klebsiella pneumoniae* *rpmA* in capsular polysaccharide synthesis and virulence revisited. *Microbiology*. 2011;157(Pt 12):3446-57.
166. Chou HC, Lee CZ, Ma LC, Fang CT, Chang SC, Wang JT. Isolation of a chromosomal region of *Klebsiella pneumoniae* associated with allantoin metabolism and liver infection. *Infection and immunity*. 2004;72(7):3783-92.
167. Lawlor MS, O'Connor C, Miller VL. Yersiniabactin is a virulence factor for *Klebsiella pneumoniae* during pulmonary infection. *Infection and immunity*. 2007;75(3):1463-72.
168. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. *Infection control and hospital epidemiology*. 1997;18(6):426-39.
169. Poh CL, Yap SC, Yeo M. Pulsed-field gel electrophoresis for differentiation of hospital isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *The Journal of hospital infection*. 1993;24(2):123-8.
170. Hansen DS, Skov R, Benedi JV, Sperling V, Kolmos HJ. *Klebsiella* typing: pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) in comparison with O:K-serotyping. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2002;8(7):397-404.
171. Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PA, Brisse S. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *Journal of clinical microbiology*. 2005;43(8):4178-82.
172. Vimont S, Mnif B, Fevre C, Brisse S. Comparison of PFGE and multilocus sequence typing for analysis of *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Journal of medical microbiology*. 2008;57(Pt 10):1308-10.
173. Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. *Nature biotechnology*. 2008;26(10):1135-45.
174. Didelot X, Bowden R, Wilson DJ, Peto TE, Crook DW. Transforming clinical microbiology with bacterial genome sequencing. *Nature reviews Genetics*. 2012;13(9):601-12.
175. Normand R, Yanai I. An introduction to high-throughput sequencing experiments: design and bioinformatics analysis. *Methods in molecular biology*. 2013;1038:1-26.
176. Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, et al. Comparison of next-generation sequencing systems. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2012;2012:251364.

177. Bialek-Davenet S, Criscuolo A, Ailloud F, Passet V, Jones L, Delannoy-Vieillard AS, et al. Genomic definition of hypervirulent and multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clonal groups. *Emerging infectious diseases*. 2014;20(11):1812-20.
178. Lery LM, Frangeul L, Tomas A, Passet V, Almeida AS, Bialek-Davenet S, et al. Comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* genomes identifies a phospholipase D family protein as a novel virulence factor. *BMC biology*. 2014;12:41.
179. MURRAY P.R., BARON E.J., Jorgensen F. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington (USA); Ed American Society for Microbiology (ASM) v1, 9 ed. 2007:649-98.
180. KONEMAN EW, ALLEN S. D., M. JW. *Diagnóstico Microbiológico*. . 5 ed, São Paulo, p177-261, 2001. 2001.
181. Caetano-Anolles G, Gresshoff P. *DNA markers: protocols, applications and overviews*. . New York, NY: J Wiley and Sons p151-171. 1997.
182. CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard - Twelfth Edition*. CLSI document M02-A12. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.
183. CLSI. Clinical Laboratory Standards Institute. *Performance standard for antimicrobial susceptibility testing*. Document M100–S25 CLSI. Wayne, PA. 2015.
184. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Medidas de prevenção e controle de infecções por enterobactérias multiresistentes*. Nota técnica No 01/2013 [Internet]. Brasília, DF; [Acesso em 25 mai 2015] Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/ea4d4c004f4ec3b98925d9d785749fbd/Microsoft+Word++NOTA+T%C3%89CNICA+ENTEROBACTERIAS+17+04+2013%281%29.pdf?MOD=AJPERES>. 2013.
185. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2012;18(3):268-81.
186. Mulvey MR, Soule G, Boyd D, Demczuk W, Ahmed R, Multi-provincial Salmonella Typhimurium Case Control Study G. Characterization of the first extended-spectrum beta-lactamase-producing *Salmonella* isolate identified in Canada. *Journal of clinical microbiology*. 2003;41(1):460-2.
187. Hasman H, Mevius D, Veldman K, Olesen I, Aarestrup FM. beta-Lactamases among extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-resistant *Salmonella* from poultry, poultry products and human patients in The Netherlands. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2005;56(1):115-21.
188. Cattoir V, Poirel L, Rotimi V, Soussy CJ, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance qnr genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2007;60(2):394-7.
189. Melano R, Corso A, Petroni A, Centron D, Orman B, Pereyra A, et al. Multiple antibiotic-resistance mechanisms including a novel combination of extended-spectrum beta-lactamases in a *Klebsiella pneumoniae* clinical strain isolated in Argentina. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2003;52(1):36-42.
190. Enne VI, Delsol AA, Roe JM, Bennett PM. Evidence of antibiotic resistance gene silencing in *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2006;50(9):3003-10.
191. Patricia Díaz Q HBT, Mariana Domínguez Y, Natalia Trabal F, Sergio Mella M, Raúl Zemelman Z, Gerardo González R. Resistencia a gentamicina, amikacina y ciprofloxacina en cepas hospitalarias de *Klebsiella pneumoniae* subespecie *pneumoniae* productoras de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido. *Rev Méd Chile*. 2004;132:1173-8.
192. Warburg G, Hidalgo-Grass C, Partridge SR, Tolmasky ME, Temper V, Moses AE, et al. A carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* epidemic clone in Jerusalem: sequence type 512 carrying a plasmid encoding aac(6)-Ib. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2012;67(4):898-901.
193. Fritsche TR, Castanheira M, Miller GH, Jones RN, Armstrong ES. Detection of methyltransferases conferring high-level resistance to aminoglycosides in enterobacteriaceae from

Europe, North America, and Latin America. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2008;52(5):1843-5.

194. Castanheira M, Fritsche TR, Sader HS, Jones RN. RmtD 16S RNA methylase in epidemiologically unrelated *spm-1*-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Brazil. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2008;52(4):1587-8; author reply 8.

195. Lafeuille E, Decre D, Mahjoub-Messai F, Bidet P, Arlet G, Bingen E. OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from Libyan patients. *Microbial drug resistance*. 2013;19(6):491-7.

196. Ma LC, Fang CT, Lee CZ, Shun CT, Wang JT. Genomic heterogeneity in *Klebsiella pneumoniae* strains is associated with primary pyogenic liver abscess and metastatic infection. *The Journal of infectious diseases*. 2005;192(1):117-28.

197. Yu WL, Ko WC, Cheng KC, Lee CC, Lai CC, Chuang YC. Comparison of prevalence of virulence factors for *Klebsiella pneumoniae* liver abscesses between isolates with capsular K1/K2 and non-K1/K2 serotypes. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2008;62(1):1-6.

198. Bachman MA, Oyler JE, Burns SH, Caza M, Lepine F, Dozois CM, et al. *Klebsiella pneumoniae* yersiniabactin promotes respiratory tract infection through evasion of lipocalin 2. *Infection and immunity*. 2011;79(8):3309-16.

199. Ribot EM, Fair MA, Gautam R, Cameron DN, Hunter SB, Swaminathan B, et al. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne pathogens and disease*. 2006;3(1):59-67.

200. Kado CI, Liu ST. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *Journal of bacteriology*. 1981;145(3):1365-73.

201. Barton BM, Harding GP, Zuccarelli AJ. A general method for detecting and sizing large plasmids. *Analytical biochemistry*. 1995;226(2):235-40.

202. Sambrook J, Russell D. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. . 3ed New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001.

203. Coil D, Jospin G, Darling AE. A5-miseq: an updated pipeline to assemble microbial genomes from Illumina MiSeq data. *Bioinformatics*. 2015;31(4):587-9.

204. Kaas RS, Leekitcharoenphon P, Aarestrup FM, Lund O. Solving the problem of comparing whole bacterial genomes across different sequencing platforms. *PloS one*. 2014;9(8):e104984.

205. Ramos PI, Picao RC, Almeida LG, Lima NC, Girardello R, Vivan AC, 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*. 2014;15:54.

206. Alberti S, Rodriguez-Quinones F, Schirmer T, Rummel G, Tomas JM, Rosenbusch JP, et al. A porin from *Klebsiella pneumoniae*: sequence homology, three-dimensional model, and complement binding. *Infection and immunity*. 1995;63(3):903-10.

207. Domenech-Sanchez A, Martinez-Martinez L, Hernandez-Alles S, del Carmen Conejo M, Pascual A, Tomas JM, et al. Role of *Klebsiella pneumoniae* OmpK35 porin in antimicrobial resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2003;47(10):3332-5.

208. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerging infectious diseases*. 2011;17(10):1791-8.

209. G1 P. Bactéria super-resistente já matou 18 pessoas no Distrito Federal. . *O globo* 2010;2010 out 7. [acesso em 27 dez 2015]. Disponível em: <http://g1.globo.com/brasil/noticia/2010/10/bacteria-super-resistente-ja-matou-18-pessoas-no-distrito-federal.html>.

210. Federal GdD. Secretaria de Estado de Saúde, Subsecretaria de Vigilância a saúde, Gerência de investigação e prevenção à infecção e eventos adversos em serviços de saúde. Protocolo para manejo se surto de Enterobactérias produtoras de carbapenemase tipo KPC. . [Internet] Disponível em: [www.saudedfgovbr/sites/300/313/00000048.pdf](http://www.saudedfgovbr/sites/300/313/00000048.pdf). 2010.

211. ANVISA. Medidas para identificação, prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde por microrganismos multirresistentes. Disponível em [http://www.cvesaude.sp.gov.br/htm/ih/pdf/nota\\_tecnica2\\_IHpdf](http://www.cvesaude.sp.gov.br/htm/ih/pdf/nota_tecnica2_IHpdf) 2010.
212. ANVISA. Informe Técnico sobre a RDC nº20/2011. Orientações de procedimentos relativos ao controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos, de uso sob prescrição isoladas ou em associação. 2011. [Internet] Disponível em: [www.crfms.org.br/\\_arquivos/diversos/anvisa-antibioticos.pdf](http://www.crfms.org.br/_arquivos/diversos/anvisa-antibioticos.pdf). 2011.
213. Bratu S, Tolaney P, Karumudi U, Quale J, Mooty M, Nichani S, et al. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, NY: molecular epidemiology and in vitro activity of polymyxin B and other agents. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2005;56(1):128-32.
214. Castanheira M, Sader HS, Deshpande LM, Fritsche TR, Jones RN. Antimicrobial activities of tigecycline and other broad-spectrum antimicrobials tested against serine carbapenemase- and metallo-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2008;52(2):570-3.
215. Docquier JD, Calderone V, De Luca F, Benvenuti M, Giuliani F, Bellucci L, et al. Crystal structure of the OXA-48 beta-lactamase reveals mechanistic diversity among class D carbapenemases. *Chemistry & biology*. 2009;16(5):540-7.
216. Chen S, Hu F, Xu X, Liu Y, Wu W, Zhu D, et al. High prevalence of KPC-2-type carbapenemase coupled with CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a teaching hospital in China. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011;55(5):2493-4.
217. Cuzon G, Naas T, Truong H, Villegas MV, Wisell KT, Carmeli Y, et al. Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produce beta-lactamase blaKPC-2 gene. *Emerging infectious diseases*. 2010;16(9):1349-56.
218. Barguigua A, Zerouali K, Katfy K, El Otmani F, Timinouni M, Elmdaghri N. Occurrence of OXA-48 and NDM-1 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Moroccan university hospital in Casablanca, Morocco. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2015;31:142-8.
219. Tolentino FM. Investigação de genes de resistência às quinolonas e aminoglicosídeos em *Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapenemases do tipo KPC em hospitais do estado de São Paulo. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto 2015:151p.
220. Giakkoupi P, Papagiannitsis CC, Miriagou V, Pappa O, Polemis M, Tryfinopoulou K, et al. An update of the evolving epidemic of blaKPC-2-carrying *Klebsiella pneumoniae* in Greece (2009-10). *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2011;66(7):1510-3.
221. Biedenbach D, Bouchillon S, Hackel M, Hoban D, Kazmierczak K, Hawser S, et al. Dissemination of NDM metallo-beta-lactamase genes among clinical isolates of Enterobacteriaceae collected during the SMART global surveillance study from 2008 to 2012. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2015;59(2):826-30.
222. Cuzon G, Ouanich J, Gondret R, Naas T, Nordmann P. Outbreak of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in France. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011;55(5):2420-3.
223. Kim SY, Park YJ, Yu JK, Kim YS. Aminoglycoside susceptibility profiles of *Enterobacter cloacae* isolates harboring the aac(6)-Ib gene. *The Korean journal of laboratory medicine*. 2011;31(4):279-81.
224. Caulin E, Coutrot A, Carbon C, Collatz E. Resistance to amikacin and isepamicin in rabbits with experimental endocarditis of an aac(6)-Ib-bearing strain of *Klebsiella pneumoniae* susceptible in vitro. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1996;40(12):2848-53.
225. Chmelnitsky I, Hermesh O, Navon-Venezia S, Strahilevitz J, Carmeli Y. Detection of aac(6)-Ib-cr in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from Tel Aviv, Israel. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2009;64(4):718-22.

226. Huang S, Dai W, Sun S, Zhang X, Zhang L. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance and aminoglycoside resistance determinants among carbapenem non-susceptible *Enterobacter cloacae*. *PloS one*. 2012;7(10):e47636.
227. Ma L, Lin CJ, Chen JH, Fung CP, Chang FY, Lai YK, et al. Widespread dissemination of aminoglycoside resistance genes *armA* and *rmtB* in *Klebsiella pneumoniae* isolates in Taiwan producing CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009;53(1):104-11.
228. Li JJ, Sheng ZK, Deng M, Bi S, Hu FS, Miao HF, et al. Epidemic of *Klebsiella pneumoniae* ST11 clone coproducing KPC-2 and 16S rRNA methylase *RmtB* in a Chinese University Hospital. *BMC infectious diseases*. 2012;12:373.
229. Poirel L, Savov E, Nazli A, Trifonova A, Todorova I, Gergova I, et al. Outbreak caused by NDM-1- and *RmtB*-producing *Escherichia coli* in Bulgaria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014;58(4):2472-4.
230. Endimiani A, Carias LL, Hujer AM, Bethel CR, Hujer KM, Perez F, et al. Presence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolates possessing *blaKPC* in the United States. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2008;52(7):2680-2.
231. Poirel L, Cattoir V, Nordmann P. Is plasmid-mediated quinolone resistance a clinically significant problem? *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2008;14(4):295-7.
232. Robicsek A, Jacoby GA, Hooper DC. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *The Lancet Infectious diseases*. 2006;6(10):629-40.
233. Nordmann P, Poirel L. Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in *Enterobacteriaceae*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2005;56(3):463-9.
234. Filippa N, Carricajo A, Grattard F, Fascia P, El Sayed F, Defilippis JP, et al. Outbreak of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* carrying *qnrB1* and *blaCTX-M15* in a French intensive care unit. *Annals of intensive care*. 2013;3(1):18.
235. Richter SN, Frasson I, Bergo C, Manganelli R, Cavallaro A, Palu G. Characterisation of *qnr* plasmid-mediated quinolone resistance in *Enterobacteriaceae* from Italy: association of the *qnrB19* allele with the integron element *ISCR1* in *Escherichia coli*. *International journal of antimicrobial agents*. 2010;35(6):578-83.
236. Paiva MC, Nascimento AM, Camargo IL, Lima-Bittencourt CI, Nardi RM. The first report of the *qnrB19*, *qnrS1* and *aac(6)-Ib-cr* genes in urinary isolates of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* in Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2012;107(5):687-9.
237. Pallecchi L, Riccobono E, Mantella A, Bartalesi F, Sennati S, Gamboa H, et al. High prevalence of *qnr* genes in commensal enterobacteria from healthy children in Peru and Bolivia. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009;53(6):2632-5.
238. Oktem IM, Gulay Z, Bicmen M, Gur D, Group HPS. *qnrA* prevalence in extended-spectrum beta-lactamase-positive *Enterobacteriaceae* isolates from Turkey. *Japanese journal of infectious diseases*. 2008;61(1):13-7.
239. Castanheira M, Pereira AS, Nicoletti AG, Pignatari AC, Barth AL, Gales AC. First report of plasmid-mediated *qnrA1* in a ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* strain in Latin America. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007;51(4):1527-9.
240. Andrade LN, Vitali L, Gaspar GG, Bellissimo-Rodrigues F, Martinez R, Darini AL. Expansion and evolution of a virulent, extensively drug-resistant (polymyxin B-resistant), *QnrS1*-, CTX-M-2-, and KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 international high-risk clone. *Journal of clinical microbiology*. 2014;52(7):2530-5.
241. Endimiani A, Hujer AM, Perez F, Bethel CR, Hujer KM, Kroeger J, et al. Characterization of *blaKPC*-containing *Klebsiella pneumoniae* isolates detected in different institutions in the Eastern USA. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2009;63(3):427-37.
242. Satlin MJ, Kubin CJ, Blumenthal JS, Cohen AB, Furuya EY, Wilson SJ, et al. Comparative effectiveness of aminoglycosides, polymyxin B, and tigecycline for clearance of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* from urine. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011;55(12):5893-9.

243. Hirsch EB, Tam VH. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2010;65(6):1119-25.
244. Livermore DM, Warner M, Mushtaq S, Doumith M, Zhang J, Woodford N. What remains against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae? Evaluation of chloramphenicol, ciprofloxacin, colistin, fosfomicin, minocycline, nitrofurantoin, temocillin and tigecycline. *International journal of antimicrobial agents*. 2011;37(5):415-9.
245. Vidyalakshmi PRFIG, K. Abdul MRCP, FRCPath; Gohel, Swati MD; Thirunarayan, M.A. MD. Fosfomicin, a Promising Option in the Era of NDM1: Susceptibility Data With a Discussion on Its Role in Indian Scenario. *Infectious Diseases in Clinical Practice*. 2016;24 ( 1):35–8.
246. Souli M, Galani I, Antoniadou A, Papadomichelakis E, Poulakou G, Panagea T, et al. An outbreak of infection due to beta-Lactamase *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase 2-producing *K. pneumoniae* in a Greek University Hospital: molecular characterization, epidemiology, and outcomes. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2010;50(3):364-73.
247. Endimiani A, Patel G, Hujer KM, Swaminathan M, Perez F, Rice LB, et al. In vitro activity of fosfomicin against blaKPC-containing *Klebsiella pneumoniae* isolates, including those nonsusceptible to tigecycline and/or colistin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010;54(1):526-9.
248. Kelesidis T, Karageorgopoulos DE, Kelesidis I, Falagas ME. Tigecycline for the treatment of multidrug-resistant Enterobacteriaceae: a systematic review of the evidence from microbiological and clinical studies. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2008;62(5):895-904.
249. Suh JY, Son JS, Chung DR, Peck KR, Ko KS, Song JH. Nonclonal emergence of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from blood samples in South Korea. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010;54(1):560-2.
250. Stahlhut SG, Chattopadhyay S, Struve C, Weissman SJ, Aprikian P, Libby SJ, et al. Population variability of the FimH type 1 fimbrial adhesin in *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of bacteriology*. 2009;191(6):1941-50.
251. Beyrouthy R, Robin F, Dabboussi F, Mallat H, Hamze M, Bonnet R. Carbapenemase and virulence factors of Enterobacteriaceae in North Lebanon between 2008 and 2012: evolution via endemic spread of OXA-48. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2014;69(10):2699-705.
252. Lavigne JP, Cuzon G, Combescure C, Bourg G, Sotto A, Nordmann P. Virulence of *Klebsiella pneumoniae* isolates harboring bla KPC-2 carbapenemase gene in a *Caenorhabditis elegans* model. *PloS one*. 2013;8(7):e67847.
253. Russo TA, Shon AS, Beanan JM, Olson R, MacDonald U, Pomakov AO, et al. Hypervirulent *K. pneumoniae* secretes more and more active iron-acquisition molecules than "classical" *K. pneumoniae* thereby enhancing its virulence. *PloS one*. 2011;6(10):e26734.
254. Wand ME, McCowen JW, Nugent PG, Sutton JM. Complex interactions of *Klebsiella pneumoniae* with the host immune system in a *Galleria mellonella* infection model. *Journal of medical microbiology*. 2013;62(Pt 12):1790-8.
255. Cejas D, Fernandez Canigia L, Rincon Cruz G, Elena AX, Maldonado I, Gutkind GO, et al. First isolate of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* sequence type 23 from the Americas. *Journal of clinical microbiology*. 2014;52(9):3483-5.
256. Chiang TT, Yang YS, Yeh KM, Chiu SK, Wang NC, Lin TY, et al. Quantification and comparison of virulence and characteristics of different variants of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from Taiwan and the United States. *Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi*. 2016;49(1):83-90.
257. Beceiro A, Tomas M, Bou G. Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world? *Clinical microbiology reviews*. 2013;26(2):185-230.
258. Sahly H, Navon-Venezia S, Roesler L, Hay A, Carmeli Y, Podschun R, et al. Extended-spectrum beta-lactamase production is associated with an increase in cell invasion and expression of fimbrial adhesins in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2008;52(9):3029-34.

259. Bialek S, Lavigne JP, Chevalier J, Marcon E, Leflon-Guibout V, Davin A, et al. Membrane efflux and influx modulate both multidrug resistance and virulence of *Klebsiella pneumoniae* in a *Caenorhabditis elegans* model. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010;54(10):4373-8.
260. Han H, Zhou H, Li H, Gao Y, Lu Z, Hu K, et al. Optimization of pulse-field gel electrophoresis for subtyping of *Klebsiella pneumoniae*. *International journal of environmental research and public health*. 2013;10(7):2720-31.
261. Mulvey MR, Grant JM, Plewes K, Roscoe D, Boyd DA. New Delhi metallo-beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*, Canada. *Emerging infectious diseases*. 2011;17(1):103-6.
262. Lee MY, Ko KS, Kang CI, Chung DR, Peck KR, Song JH. High prevalence of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Asian countries: diverse clones and clonal dissemination. *International journal of antimicrobial agents*. 2011;38(2):160-3.
263. Nielsen JB, Skov MN, Jorgensen RL, Heltberg O, Hansen DS, Schonning K. Identification of CTX-M15-, SHV-28-producing *Klebsiella pneumoniae* ST15 as an epidemic clone in the Copenhagen area using a semi-automated Rep-PCR typing assay. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology. 2011;30(6):773-8.
264. Diestra K, Miro E, Marti C, Navarro D, Cuquet J, Coll P, et al. Multiclonal epidemic of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing DHA-1 in a Spanish hospital. *Clinical microbiology and infection* : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2011;17(7):1032-6.
265. Lohr IH, Hulter N, Bernhoff E, Johnsen PJ, Sundsfjord A, Naseer U. Persistence of a pKPN3-like CTX-M-15-encoding IncFIIK plasmid in a *Klebsiella pneumoniae* ST17 host during two years of intestinal colonization. *PloS one*. 2015;10(3):e0116516.
266. Baraniak A, Izdebski R, Fiett J, Sadowy E, Adler A, Kazma M, et al. Comparative population analysis of *Klebsiella pneumoniae* strains with extended-spectrum beta-lactamases colonizing patients in rehabilitation centers in four countries. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2013;57(4):1992-7.
267. Damjanova I, Toth A, Paszti J, Hajbel-Vekony G, Jakab M, Berta J, 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 'MRSA's'? *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2008;62(5):978-85.
268. Oteo J, Cuevas O, Lopez-Rodriguez I, Banderas-Florido A, Vindel A, Perez-Vazquez M, 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. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2009;64(3):524-8.
269. Qi Y, Wei Z, Ji S, Du X, Shen P, Yu Y. ST11, the dominant clone of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in China. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2011;66(2):307-12.
270. Ko KS, Lee JY, Baek JY, Suh JY, Lee MY, Choi JY, et al. Predominance of an ST11 extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* clone causing bacteraemia and urinary tract infections in Korea. *Journal of medical microbiology*. 2010;59(Pt 7):822-8.
271. Toth A, Damjanova I, Puskas E, Janvari L, Farkas M, Dobak A, et al. Emergence of a colistin-resistant KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST258 clone in Hungary. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology. 2010;29(7):765-9.
272. Voulgari E, Gartzonika C, Vrioni G, Politi L, Priavali E, Levidiotou-Stefanou S, et al. The Balkan region: NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 clonal strain causing outbreaks in Greece. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2014;69(8):2091-7.
273. Giske CG, Froding I, Hasan CM, Turlej-Rogacka A, Toleman M, Livermore D, et al. Diverse sequence types of *Klebsiella pneumoniae* contribute to the dissemination of blaNDM-1 in India, Sweden, and the United Kingdom. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012;56(5):2735-8.
274. Netikul T, Sidjabat HE, Paterson DL, Kamolvit W, Tantisiriwat W, Steen JA, et al. Characterization of an IncN2-type blaNDM-(1)-carrying plasmid in *Escherichia coli* ST131 and

- Klebsiella pneumoniae* ST11 and ST15 isolates in Thailand. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2014;69(11):3161-3.
275. Hudson CM, Bent ZW, Meagher RJ, Williams KP. Resistance determinants and mobile genetic elements of an NDM-1-encoding *Klebsiella pneumoniae* strain. *PloS one*. 2014;9(6):e99209.
276. Voulgari E, Zarkotou O, Ranellou K, Karageorgopoulos DE, Vrioni G, Mamali V, et al. Outbreak of OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece involving an ST11 clone. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2013;68(1):84-8.
277. Ma L, Wang JT, Wu TL, Siu LK, Chuang YC, Lin JC, et al. Emergence of OXA-48-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *PloS one*. 2015;10(9):e0139152.
278. Leavitt A, Carmeli Y, Chmelnitsky I, Goren MG, Ofek I, Navon-Venezia S. Molecular epidemiology, sequence types, and plasmid analyses of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Israel. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010;54(7):3002-6.
279. Poirel L, Al Maskari Z, Al Rashdi F, Bernabeu S, Nordmann P. NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in the Sultanate of Oman. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2011;66(2):304-6.
280. Kim MN, Yong D, An D, Chung HS, Woo JH, Lee K, et al. Nosocomial clustering of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* sequence type 340 strains in four patients at a South Korean tertiary care hospital. *Journal of clinical microbiology*. 2012;50(4):1433-6.
281. Ahn C, Butt AA, Rivera JI, Yaqoob M, Hag S, Khalil A, et al. OXA-48-producing Enterobacteriaceae causing bacteremia, United Arab Emirates. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2015;30:36-7.
282. Oliveira S, Moura RA, Silva KC, Pavez M, McCulloch JA, Dropa M, et al. Isolation of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains belonging to the high-risk multiresistant clonal complex 11 (ST437 and ST340) in urban rivers. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2014;69(3):849-52.
283. Seara N, Oteo J, Carrillo R, Perez-Blanco V, Mingorance J, Gomez-Gil R, et al. Interhospital spread of NDM-7-producing *Klebsiella pneumoniae* belonging to ST437 in Spain. *International journal of antimicrobial agents*. 2015;46(2):169-73.
284. Carattoli A. Plasmids and the spread of resistance. *International journal of medical microbiology : IJMM*. 2013;303(6-7):298-304.
285. Illiaquer M, Caroff N, Bemer P, Aubin GG, Juvin ME, Lepelletier D, et al. Occurrence and molecular characterization of *Klebsiella pneumoniae* ST37 clinical isolates producing plasmid-mediated AmpC recovered over a 3-year period. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2012;74(1):95-7.
286. Yang J, Ye L, Guo L, Zhao Q, Chen R, Luo Y, et al. A nosocomial outbreak of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese hospital: dissemination of ST11 and emergence of ST37, ST392 and ST395. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2013;19(11):E509-15.
287. Orsi GB, Bencardino A, Vena A, Carattoli A, Venditti C, Falcone M, et al. Patient risk factors for outer membrane permeability and KPC-producing carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolation: results of a double case-control study. *Infection*. 2013;41(1):61-7.
288. Zhu J, Sun L, Ding B, Yang Y, Xu X, Liu W, et al. Outbreak of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST76 and ST37 isolates in neonates. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 2016.
289. Perez-Chaparro PJ, Cerdeira LT, Queiroz MG, de Lima CP, Levy CE, Pavez M, et al. Complete nucleotide sequences of two blaKPC-2-bearing IncN Plasmids isolated from sequence type 442 *Klebsiella pneumoniae* clinical strains four years apart. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014;58(5):2958-60.
290. Campos JC, da Silva MJ, dos Santos PR, Barros EM, Pereira Mde O, Seco BM, et al. Characterization of Tn3000, a Transposon Responsible for blaNDM-1 Dissemination among Enterobacteriaceae in Brazil, Nepal, Morocco, and India. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2015;59(12):7387-95.

291. Gangoue-Pieboji J, Miriagou V, Vourli S, Tzelepi E, Ngassam P, Tzouveleki LS. Emergence of CTX-M-15-producing enterobacteria in Cameroon and characterization of a blaCTX-M-15-carrying element. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2005;49(1):441-3.
292. Dhanji H, Patel R, Wall R, Doumith M, Patel B, Hope R, et al. Variation in the genetic environments of bla(CTX-M-15) in *Escherichia coli* from the faeces of travellers returning to the United Kingdom. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2011;66(5):1005-12.
293. Silva KC, Moreno M, Cabrera C, Spira B, Cerdeira L, Lincopan N, et al. First Characterization of CTX-M-15-Producing *Escherichia coli* Strains Belonging to ST410, ST224 and ST1284 from Commercial Swine in South America. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2016.
294. Dropa M, Lincopan N, Balsalobre LC, Oliveira DE, Moura RA, Fernandes MR, et al. Genetic background of novel sequence types of CTX-M-8- and CTX-M-15-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from public wastewater treatment plants in Sao Paulo, Brazil. *Environmental science and pollution research international*. 2016;23(5):4953-8.
295. Yu FY, Yao D, Pan JY, Chen C, Qin ZQ, Parsons C, et al. High prevalence of plasmid-mediated 16S rRNA methylase gene rmtB among *Escherichia coli* clinical isolates from a Chinese teaching hospital. *BMC infectious diseases*. 2010;10:184.
296. Yim G, Kwong W, Davies J, Miao V. Complex integrons containing qnrB4-ampC (bla(DHA-1)) in plasmids of multidrug-resistant *Citrobacter freundii* from wastewater. *Canadian journal of microbiology*. 2013;59(2):110-6.
297. Ma J, Zeng Z, Chen Z, Xu X, Wang X, Deng Y, et al. High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants qnr, aac(6')-Ib-cr, and qepA among ceftiofur-resistant Enterobacteriaceae isolates from companion and food-producing animals. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009;53(2):519-24.
298. Paauw A, Fluit AC, Verhoef J, Leverstein-van Hall MA. Enterobacter cloacae outbreak and emergence of quinolone resistance gene in Dutch hospital. *Emerging infectious diseases*. 2006;12(5):807-12.
299. Bado I, Cordeiro NF, Robino L, Garcia-Fulgueiras V, Seija V, Bazet C, et al. Detection of class 1 and 2 integrons, extended-spectrum beta-lactamases and qnr alleles in enterobacterial isolates from the digestive tract of Intensive Care Unit inpatients. *International journal of antimicrobial agents*. 2010;36(5):453-8.
300. Chen X, Zhang W, Pan W, Yin J, Pan Z, Gao S, et al. Prevalence of qnr, aac(6')-Ib-cr, qepA, and oqxAB in *Escherichia coli* isolates from humans, animals, and the environment. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012;56(6):3423-7.
301. Rodriguez-Martinez JM, Diaz de Alba P, Briaies A, Machuca J, Lossa M, Fernandez-Cuenca F, et al. Contribution of OqxAB efflux pumps to quinolone resistance in extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2013;68(1):68-73.
302. Park KS, Kim MH, Park TS, Nam YS, Lee HJ, Suh JT. Prevalence of the plasmid-mediated quinolone resistance genes, aac(6')-Ib-cr, qepA, and oqxAB in clinical isolates of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Korea. *Annals of clinical and laboratory science*. 2012;42(2):191-7.
303. Perez F, Rudin SD, Marshall SH, Coakley P, Chen L, Kreiswirth BN, et al. OqxAB, a quinolone and olaquinox efflux pump, is widely distributed among multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates of human origin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2013;57(9):4602-3.
304. Wong MH, Chan EW, Chen S. Evolution and dissemination of OqxAB-like efflux pumps, an emerging quinolone resistance determinant among members of Enterobacteriaceae. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2015;59(6):3290-7.
305. Navas J, Garcia-Lobo JM, Leon J, Ortiz JM. Structural and functional analyses of the fosfomycin resistance transposon Tn2921. *Journal of bacteriology*. 1985;162(3):1061-7.
306. Doi Y, Hazen TH, Boitano M, Tsai YC, Clark TA, Korch J, et al. Whole-genome assembly of *Klebsiella pneumoniae* coproducing NDM-1 and OXA-232 carbapenemases using single-molecule, real-time sequencing. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014;58(10):5947-53.

307. Ruiz J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2003;51(5):1109-17.
308. Stoesser N, Batty EM, Eyre DW, Morgan M, Wyllie DH, Del Ojo Elias C, et al. Predicting antimicrobial susceptibilities for *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates using whole genomic sequence data. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2013;68(10):2234-44.
309. Minarini LA, Darini AL. Mutations in the quinolone resistance-determining regions of *gyrA* and *parC* in *Enterobacteriaceae* isolates from Brazil. *Brazilian journal of microbiology* : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]. 2012;43(4):1309-14.
310. Bowers JR, Kitchel B, Driebe EM, MacCannell DR, Roe C, Lemmer D, et al. Genomic Analysis of the Emergence and Rapid Global Dissemination of the Clonal Group 258 *Klebsiella pneumoniae* Pandemic. *PloS one*. 2015;10(7):e0133727.
311. Rosenblum R, Khan E, Gonzalez G, Hasan R, Schneiders T. Genetic regulation of the *ramA* locus and its expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *International journal of antimicrobial agents*. 2011;38(1):39-45.
312. Zhong X, Xu H, Chen D, Zhou H, Hu X, Cheng G. First emergence of *acrAB* and *oqxAB* mediated tigecycline resistance in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* pre-dating the use of tigecycline in a Chinese hospital. *PloS one*. 2014;9(12):e115185.
313. Bialek-Davenet S, Lavigne JP, Guyot K, Mayer N, Tournebize R, Brisse S, et al. Differential contribution of *AcrAB* and *OqxAB* efflux pumps to multidrug resistance and virulence in *Klebsiella pneumoniae*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2015;70(1):81-8.
314. De Majumdar S, Veleba M, Finn S, Fanning S, Schneiders T. Elucidating the regulon of multidrug resistance regulator *RarA* in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2013;57(4):1603-9.
315. Mendes AC, Rodrigues C, Pires J, Amorim J, Ramos MH, Novais A, et al. Importation of Fosfomycin Resistance *fosA3* Gene to Europe. *Emerging infectious diseases*. 2016;22(2):346-8.
316. Clancy CJ, Chen L, Hong JH, Cheng S, Hao B, Shields RK, et al. Mutations of the *ompK36* porin gene and promoter impact responses of sequence type 258, KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains to doripenem and doripenem-colistin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2013;57(11):5258-65.
317. Zhang Y, Jiang X, Wang Y, Li G, Tian Y, Liu H, et al. Contribution of beta-lactamases and porin proteins *OmpK35* and *OmpK36* to carbapenem resistance in clinical isolates of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014;58(2):1214-7.
318. Yan JJ, Wang MC, Zheng PX, Tsai LH, Wu JJ. Associations of the major international high-risk resistant clones and virulent clones with specific *ompK36* allele groups in *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *New microbes and new infections*. 2015;5:1-4.
319. Papagiannitsis CC, Giakkoupi P, Kotsakis SD, Tzelepi E, Tzouvelekis LS, Vatopoulos AC, et al. *OmpK35* and *OmpK36* porin variants associated with specific sequence types of *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of chemotherapy*. 2013;25(4):250-4.

## 8. ANEXO A

Lista de artigos publicados pela autora em revistas indexadas durante o período de Doutorado (abril de 2012 a abril de 2016), em ordem decrescente em relação à data da publicação. As publicações relacionadas diretamente com as amostras incluídas nesta Tese de Doutorado estão disponibilizadas em sua versão completa nos Anexos A1, A2 e A3 e foram sinalizadas em negrito na listagem abaixo.

1. Tavares CP, Pereira PS, Marques E de A, Faria C Jr, de Souza M da P, de Almeida R, Alves C de F, Asensi MD, Carvalho-Assef AP. Molecular epidemiology of KPC-2-producing Enterobacteriaceae (non-*Klebsiella pneumoniae*) isolated from Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2015 Aug;82(4):326-330.
2. **Pereira PS, Borghi M, de Araújo CF, Aires CA, Oliveira JC, Asensi MD, Carvalho-Assef AP. Clonal Dissemination of OXA-370-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Rio de Janeiro, Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Aug;59(8):4453-4456. (ANEXO A1)**
3. **Pereira PS, Albano RM, Asensi MD, Carvalho-Assef AP. Draft genome sequences of three NDM-1 producing Enterobacteriaceae species isolated from Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015 Jun;110(4):580-582. (ANEXO A2)**
4. Pereira PS, Borghi M, Albano RM, Lopes JC, Silveira MC, Marques EA, Oliveira JC, Asensi MD, Carvalho-Assef AP. Coproduction of NDM-1 and KPC-2 in *Enterobacter hormaechei* from Brazil. *Microb Drug Resist*. 2015 Apr;21(2):234-236.
5. Carvalho-Assef AP, Pereira PS, Albano RM, Berião GC, Tavares CP, Chagas TP, Marques EA, Timm LN, Da Silva RC, Falci DR, Asensi MD. Detection of NDM-1-, CTX-M-15-, and *qnrB4*-producing *Enterobacter hormaechei* isolates in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(4):2475-2476.
6. Carvalho-Assef AP, Pereira PS, Albano RM, Berião GC, Chagas TP, Timm LN, Da Silva RC, Falci DR, Asensi MD. Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. *J Antimicrob Chemother*. 2013 Dec;68(12):2956-2957.
7. Seki LM, Pereira PS, de Souza Conceição M, Souza MJ, Marques EA, Carballido JM, de Carvalho ME, Assef AP, Asensi MD. Molecular epidemiology of CTX-M producing Enterobacteriaceae isolated from bloodstream infections in Rio de Janeiro, Brazil: emergence of CTX-M-15. *Braz J Infect Dis*. 2013 Nov-Dec;17(6):640-646.
8. **Pereira PS, de Araujo CF, Seki LM, Zahner V, Carvalho-Assef AP, Asensi MD. Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: spread of clonal complex 11 (ST11, ST437 and ST340). *J Antimicrob Chemother*. 2013 Feb; 68(2):312-316. (ANEXO A3)**



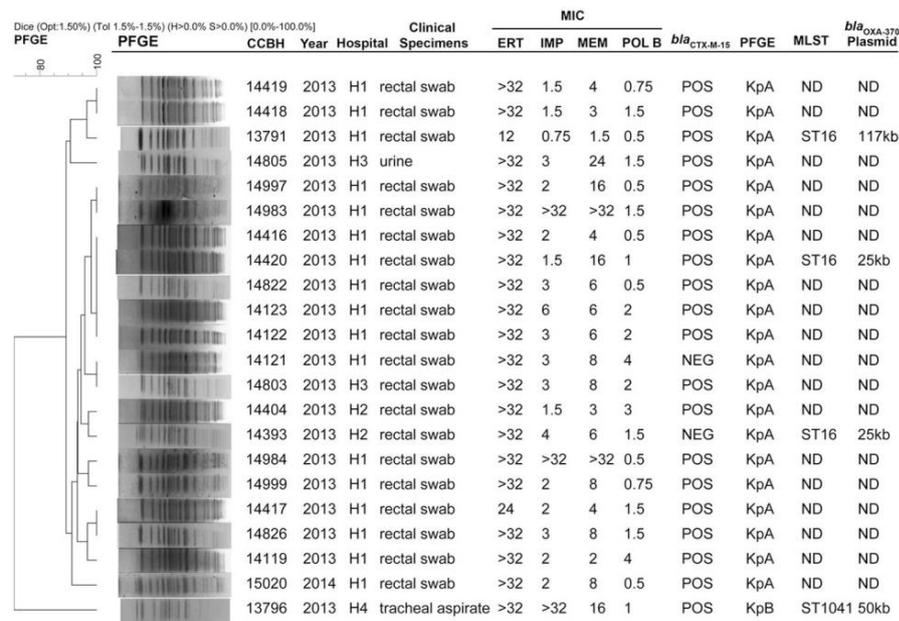


FIG 1 Characteristics of 22 OXA-370-producing *K. pneumoniae* isolates obtained in the Rio de Janeiro state, Brazil. All MIC values are presented in milligrams per liter. The banding patterns were compared by using the unweighted pair group method with arithmetic averages (UPGMA) with the Dice similarity coefficient using the following parameters: optimization (Opt), 1.5%; position tolerance (Tol), 1.5%; minimal height (H) > 0.0%; and minimal surface (S) > 0.0%. CCBH, Coleção de Culturas de Bactérias de Origem Hospitalar; H1, hospital 1; H2, hospital 2; H3, hospital 3; H4, hospital 4; ERT, ertapenem; IMP, imipenem; MEM, meropenem; POLB, polymyxin B; PFGE, pulsed-field gel electrophoresis; MLST, multilocus sequence typing; POS, positive; NEG, negative; ND, not determined.

*bla*<sub>OXA-1</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>GES</sub>, and *bla*<sub>KPC</sub>) was performed by PCR using previously reported conditions and primers (8).

**Molecular typing.** For epidemiological analysis, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) was used for *K. pneumoniae*, whereas multilocus sequence typing (MLST) analysis was performed on the representative isolates of the PFGE clones of this species. For PFGE (9), the plug containing the genomic DNA was digested with XbaI for 3 h and the fragments were separated in a 1.0% Seakem Gold agarose gel (Lonza) in a CHEF-DRIII system (Bio-Rad, Richmond, CA), under the following conditions: 13°C, 120° field angle, 6 V/cm, 0.5- to 35-s pulse times, for 15.5 h. Band patterns were analyzed using Bionumerics 6.6 software (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium), and isolates displaying ≥85% similarity (Dice coefficient) were considered to belong to the same clone.

For MLST, seven housekeeping genes of *K. pneumoniae* (*infB*, *tonB*, *pgi*, *gapA*, *phoE*, *rpoB*, and *mdh*) were amplified and sequenced according to the protocol described on the *K. pneumoniae* MLST website (<http://bigsdw.web.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>). The sequence analyses were performed using BioEdit software (version 7.0.5.3).

**Plasmid analysis.** Plasmid analysis by restriction digestion was performed with S1 nuclease (10). The *bla*<sub>OXA-370</sub>-specific probe labeled with digoxigenin (DIG) was generated with the PCR DIG detection system (Roche Diagnostics). Hybridization experiments were performed as reported by Sambrook and Russell (11).

## RESULTS AND DISCUSSION

The *K. pneumoniae* isolates ( $n = 22$ ) were recovered from four hospitals (hospital 1 [H1], H2, H3, and H4) (Fig. 1). Most of those isolates ( $n = 17$  [77.2%]) were obtained from rectal swabs from patients at H1 between September 2013 and January 2014, during routine surveillance for carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. Of the remaining isolates, two were obtained from rectal swabs

from patients at H2 in October 2013, two were obtained from urine and rectal swabs from patients at H3 in November 2013, and one was recovered from the tracheal aspirate of a patient at H4 in August 2013 (Fig. 1). During the same period, an *E. aerogenes* isolate was recovered from a rectal swab from another patient at H4. Also, an *E. cloacae* isolate was obtained from the urine of a patient at H5.

The high prevalence of OXA-48-like-carbapenemase-producing *K. pneumoniae* isolates from rectal swabs ( $n = 20$  [90.9%]) was also observed in a study performed from 2001 to 2011 in various Mediterranean countries in Europe and North Africa by Potron et al. and published in 2013 (12). This phenomenon may contribute to the silent dissemination of this gene in bacterial populations.

In performing PCR and sequencing, we observed that all of the isolates possessed the OXA-370 allelic variant, which differs from *bla*<sub>OXA-48</sub> by three nucleotide changes, resulting in one amino acid substitution (4). This variant was recently identified in an *Enterobacter hormaechei* strain in the southern region of Brazil (4). This species is one of the five species belonging to the *Enterobacter cloacae* complex that cannot be differentiated by conventional identification techniques (13).

OXA-48-like-carbapenemase-producing bacteria may show different patterns of resistance to beta-lactams. Some strains show susceptibility to broad-spectrum cephalosporins and carbapenems, while others are susceptible to broad-spectrum cephalosporins and resistant to carbapenems and others are resistant to both broad-spectrum cephalosporins and carbapenems (3). These differences represent a challenge for identifying the production of these OXA-48-producing bacteria. Thus, the criteria used in this

study to select OXA-48-producing bacteria (resistant or intermediate to carbapenems) might have underestimated the real occurrence of OXA-48-like carbapenemase in our set of isolates.

In the present study, most of the *K. pneumoniae* isolates were resistant to  $\beta$ -lactams, such as cefotaxime (95.4%), cefepime (95.4%), ceftazidime (95.4%), aztreonam (95.4%), ertapenem (100%), imipenem (95.4%), and meropenem (100%), according to CLSI breakpoints. The *E. aerogenes* and *E. cloacae* isolates were resistant to all of the beta-lactams tested.

Some OXA-48 variants, such as OXA-163 and OXA-247, do not have carbapenem-hydrolyzing activity (3). Although the hydrolytic profile of OXA-370 has not yet been determined, Sampaio et al. showed that the OXA-370-producing *E. hormaechei* strain was resistant to ertapenem (MIC = 4 mg/liter) and exhibited reduced susceptibility to imipenem (MIC = 1.5 mg/liter) but was susceptible to meropenem (MIC = 0.5 mg/liter) and the *Escherichia coli* transformant was susceptible to carbapenems (4).

Assessing the MICs of *K. pneumoniae* isolates, our study showed high MIC<sub>50</sub> values for ertapenem (>32 mg/liter), with a MIC range of 12 to >32 mg/liter. For meropenem and imipenem, the MIC<sub>50</sub> values were lower (6.0 mg/liter and 2.0 mg/liter, respectively), with MIC ranges of 1.5 to >32 mg/liter for meropenem and 0.75 to >32 mg/liter for imipenem. The *E. aerogenes* isolate showed MICs of >32 mg/liter for all carbapenems tested, while the *E. cloacae* isolate showed MICs of >32 mg/liter for ertapenem, 1.5 mg/liter for meropenem, and 2 mg/liter for imipenem. These findings showed higher levels of resistance to carbapenems in the isolates included in this study, compared with the previously detected OXA-370-producing *E. hormaechei* isolate (4).

All isolates were resistant to sulfamethoxazole-trimethoprim and ciprofloxacin, with the exception of the *E. aerogenes* isolate, which was considered to have intermediate resistance to ciprofloxacin. For the aminoglycosides, 95.4% of the *K. pneumoniae* isolates were considered nonsusceptible to amikacin (63.6% resistant) and 54.5% nonsusceptible to gentamicin (18.1% resistant). The *E. aerogenes* and *E. cloacae* isolates were resistant to both drugs.

The MICs for polymyxin B placed 12.5% of the isolates in the resistant category; all of them were *K. pneumoniae* strains. In Brazil, previous reports showed similar rates of resistance to this drug among KPC-producing *K. pneumoniae* isolates (14). This result is alarming, since polymyxin B is considered one of the last resources in the fight against carbapenemase-producing pathogens.

Apart from OXA-370, no other carbapenemase genes were detected by PCR. However, genes encoding narrow-spectrum beta-lactamases and extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) were detected. The *bla*<sub>OXA-1</sub> gene was found in all isolates, and 22 (91.6%) possessed the *bla*<sub>CTX-M-15</sub> gene (including the two *Enterobacter* isolates). Many different studies have shown the association of the OXA-48-like carbapenemase with other beta-lactamases, mainly CTX-M-15, the most disseminated ESBL reported worldwide (5, 12). Differently from the isolates included in our study, *bla*<sub>OXA-370</sub> was found to be associated with the *bla*<sub>TEM-1</sub> and *bla*<sub>CTX-M-8</sub> variants in the first OXA-370-producing *E. hormaechei* isolate in Brazil (4). The association of OXA-48-like carbapenemase production with ESBLs probably contributes to increased MICs against third-generation cephalosporins, against which the oxacillinases of this family are not very effective (3).

Molecular typing, performed first by PFGE of *K. pneumoniae* isolates, showed the presence of two clonal groups (KpA and KpB)

(Fig. 1). KpA was represented by 21 isolates (95.4%) and KpB by only one isolate, which was recovered from the tracheal aspirate from a patient at H4. We selected three representative KpA isolates and the one KpB isolate for MLST analysis. The isolate belonging to pulsotype KpB was characterized as sequence type 1041 (ST1041), which was deposited in the Pasteur *Klebsiella pneumoniae* MLST database in 2012 from other isolates recovered in Rio de Janeiro in 2008.

All KpA isolates tested belonged to ST16. This clone has already been associated with different carbapenemases and *bla*<sub>CTX-M-15</sub> in diverse countries around the world (for example, NDM-1 in Canada and CTX-M-15 in Taiwan and Copenhagen, Denmark) (15–17). Furthermore, ST16 was also described for an OXA-48-producing *K. pneumoniae* strain that caused outbreaks in two hospitals in different regions of Spain (18). In Brazil, ST16 has already been observed for two KPC-producing isolates that were recovered from blood, in 2008 and 2010 (14, 19), in Rio de Janeiro state. In this work, the *K. pneumoniae* isolates belonging to KpA ST16 were found in three of the four hospitals studied (Fig. 1). This spread in Rio de Janeiro of a clone of *K. pneumoniae* carrying OXA-370 is very worrisome, because this species has plasticity to acquire different mechanisms of resistance and has great dispersion capacity.

Plasmid analysis was performed for six OXA-370-producing isolates, i.e., three *K. pneumoniae* isolates belonging to ST16, the *K. pneumoniae* ST1041 isolate, and the *E. cloacae* and *E. aerogenes* isolates. Plasmids harboring the *bla*<sub>OXA-370</sub> gene were observed in all strains, ranging from 25 kb to 150 kb (Fig. 1). In the *K. pneumoniae* strains, three different plasmids were observed. The *K. pneumoniae* ST1041 isolate (CCBH13796) had *bla*<sub>OXA-370</sub> in a plasmid of ~50 kb. In two ST16 isolates (CCBH14393 and CCBH14420), this gene was observed in an ~25-kb plasmid; however, in the CCBH13791 isolate, which also belongs to ST16, the plasmid was ~117 kb. In the *E. cloacae* isolate CCBH14402, the gene was observed in a plasmid of approximately 40 kb. Only the *E. aerogenes* isolate presented a plasmid of ~150 kb, the same plasmid size as described for the *E. hormaechei* strain detected in Rio Grande do Sul state (4). However, it is necessary to sequence these plasmids to compare the similarities between them. This study showed that the *bla*<sub>OXA-370</sub> gene was detected in plasmids of different sizes in representative isolates. Other genes from the OXA-48 family have also been detected in different genetic platforms (12).

This study showed the presence of OXA-370 in different *Enterobacteriaceae* species in Rio de Janeiro, Brazil, and dissemination of the *K. pneumoniae* ST16 clone carrying this gene. Since phenotypic detection of the OXA-48-like carbapenemase is a serious concern in clinical laboratories, we deduce that the extent of the spread of OXA-370 may well be underestimated. Thus, our findings call attention to an urgent need to investigate the presence of OXA-370, as well as studying the phenotypic and molecular characteristics of the *bla*<sub>OXA-370</sub> gene.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by research grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Fundação Carlos Chagas de Amparo a Pesquisa, and Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz.

We thank the Genomic Platform for DNA Sequencing (Instituto Oswaldo Cruz).

## REFERENCES

- Nordmann P, Naas T, Poirel L. 2011. Global spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis* 17:1791–1798. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1710.110655>.
- Gupta N, Limbago BM, Patel JB, Kallen AJ. 2011. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: epidemiology and prevention. *Clin Infect Dis* 53:60–67. <http://dx.doi.org/10.1093/cid/cir202>.
- Poirel L, Potron A, Nordmann P. 2012. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *J Antimicrob Chemother* 67:1597–1606. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dks121>.
- Sampaio JL, Ribeiro VB, Campos JC, Rozales FP, Magagnin CM, Falci DR, da Silva RC, Dalarosa MG, Luz DI, Vieira FJ, Antchevis LC, Barth AL, Zavascki AP. 2014. Detection of OXA-370, an OXA-48-related class D  $\beta$ -lactamase, in *Enterobacter hormaechei* from Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 58:3566–3567. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.02510-13>.
- Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P. 2004. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 48:15–22. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.48.1.15-22.2004>.
- Abbott SL. 2011. *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Plesiomonas*, and other Enterobacteriaceae, p 639–657. In Versalovic J, Carroll KC, Jorgensen JG, Funke G, Landry ML, Warnock DW (ed), *Manual of clinical microbiology*, 10th ed, vol 1. ASM Press, Washington, DC.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2014. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 21st informational supplement. CLSI M100-S24. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Dallenne C, Da Costa A, Decré D, Favier C, Arlet G. 2010. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important  $\beta$ -lactamases in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* 65:490–495. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkp498>.
- Ribot EM, Fair MA, Gautom R. 2006. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathog Dis* 3:59–67. <http://dx.doi.org/10.1089/fpd.2006.3.59>.
- Barton BM, Harding GP, Zuccarelli AJ. 1995. A general method for detecting and sizing large plasmids. *Anal Biochem* 226:235–240. <http://dx.doi.org/10.1006/abio.1995.1220>.
- Sambrook J, Russell DW. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Potron A, Poirel L, Rondinaud E, Nordmann P. 2013. Intercontinental spread of OXA-48 beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae over a 11-year period, 2001 to 2011. *Euro Surveill* 18(31):pii=20549. <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20549>.
- Brady C, Cleenwerck I, Venter S, Coutinho T, De Vos P. 2013. Taxonomic evaluation of the genus *Enterobacter* based on multilocus sequence analysis (MLSA): proposal to reclassify *E. nimipressuralis* and *E. amnigenus* into *Lelliottia* gen. nov. as *Lelliottia nimipressuralis* comb. nov. and *Lelliottia amnigena* comb. nov., respectively, *E. gergoviae* and *E. pyrinus* into *Pluralibacter* gen. nov. as *Pluralibacter gergoviae* comb. nov. and *Pluralibacter pyrinus* comb. nov., respectively, *E. cowanii*, *E. radicincitans*, *E. oryzae* and *E. arachidis* into *Kosakonia* gen. nov. as *Kosakonia cowanii* comb. nov., *Kosakonia radicincitans* comb. nov., *Kosakonia oryzae* comb. nov. and *Kosakonia arachidis* comb. nov., respectively, and *E. turicensis*, *E. helveticus* and *E. pulveris* into *Cronobacter* as *Cronobacter zurichensis* nom. nov., *Cronobacter helveticus* comb. nov. and *Cronobacter pulveris* comb. nov., respectively, and emended description of the genera *Enterobacter* and *Cronobacter*. *Syst Appl Microbiol* 36:309–319. <http://dx.doi.org/10.1016/j.syapm.2013.03.005>.
- Pereira PS, de Araujo CF, Seki LM, Zahner V, Carvalho-Assef AP, Asensi MD. 2013. Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: spread of clonal complex 11 (ST11, ST437 and ST340). *J Antimicrob Chemother* 68:312–316. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dks396>.
- Mulvey MR, Grant JM, Plewes K, Roscoe D, Boyd DA. 2011. New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*, Canada. *Emerg Infect Dis* 17:103–106. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1701.101358>.
- Lee MY, Ko KS, Kang CI, Chung DR, Peck KR, Song JH. 2011. High prevalence of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Asian countries: diverse clones and clonal dissemination. *Int J Antimicrob Agents* 38:160–163. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.03.020>.
- Nielsen JB, Skov MN, Jørgensen RL, Heltberg O, Hansen DS, Schønning K. 2011. Identification of CTX-M15-, SHV-28-producing *Klebsiella pneumoniae* ST15 as an epidemic clone in the Copenhagen area using a semi-automated Rep-PCR typing assay. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 30:773–778. <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-011-1153-x>.
- Oteo J, Hernández JM, Espasa M, Fleites A, Sáez D, Bautista V, Pérez-Vázquez M, Fernández-García MD, Delgado-Iribarren A, Sánchez-Romero I, García-Picazo L, Miguel MD, Solís S, Aznar E, Trujillo G, Mediavilla C, Fontanals D, Rojo S, Vindel A, Campos J. 2013. Emergence of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* and the novel carbapenemases OXA-244 and OXA-245 in Spain. *J Antimicrob Chemother* 68:317–321. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dks383>.
- Seki LM, Pereira PS, de Souza MP, Conceição MS, Marques EA, Porto CO, Colnago EM, Alves CF, Gomes D, Assef AP, Samuelsen Ø, Asensi MD. 2011. Molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Brazil: the predominance of sequence type 437. *Diagn Microbiol Infect Dis* 70:274–247. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2011.01.006>.

## Draft genome sequences of three NDM-1-producing Enterobacteriaceae species isolated from Brazil

Polyana Silva Pereira<sup>1</sup>, Rodolpho Mattos Albano<sup>2</sup>,  
Marise Dutra Asensi<sup>1</sup>, Ana Paula D'Alincourt Carvalho-Assef<sup>1/+</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar, Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Bioquímica, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

*The emergence of multidrug-resistant Enterobacteriaceae strains producing carbapenemases, such as NDM-1, has become a major public health issue due to a high dissemination capacity and limited treatment options. Here we describe the draft genome of three NDM-1-producing isolates: Providencia rettgeri (CCBH11880), Enterobacter hormaechei subsp. oharae (CCBH10892) and Klebsiella pneumoniae (CCBH13327), isolated in Brazil. Besides bla<sub>NDM-1</sub>, resistance genes to aminoglycosides [aadA1, aadA2, aac(6')-Ib-cr] and quinolones (qnrA1, qnrB4) were observed which contributed to the multidrug resistance profile. The element ISAbal25 was found associated to the bla<sub>NDM-1</sub> gene in all strains.*

Key words: NDM-1 - Brazil - Enterobacteriaceae

The emergence of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae has become a major public health issue worldwide due to a high dissemination capacity and limited treatment options (Nordaman et al. 2011). NDM is a metallo-beta-lactamase first reported in 2009 (Yong et al. 2009) and, now, it has already been detected in several countries worldwide. In Brazil, this carbapenemase was first described in a *Providencia rettgeri* isolate from the city of Porto Alegre, state of Rio Grande do Sul (RS) (South Region of Brazil), in 2013 (Carvalho-Assef et al. 2013). Then, the detection of six clonally related NDM-producing *Enterobacter hormaechei* subsp. *oharae* isolates was reported from the same public hospital (Carvalho-Assef et al. 2014). After that, nine NDM-1-producing *Enterobacter cloacae* complex isolates and two *Morganella morganii* were also recovered from three different hospitals in Porto Alegre (Rozales et al. 2014). Recently, NDM-1-producing bacteria have been described in the state of Rio de Janeiro (RJ) (Southeast Region of Brazil) (Pereira et al. 2014). In 2014, a NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* was also detected in Londrina, state of Paraná (South Region of Brazil) (Pillonetto et al. 2014).

Here, we aim to announce the draft genome of three NDM-1-producing isolates: *P. rettgeri* (CCBH11880), isolated from a surgical wound of a patient from RS, *E. hormaechei* subsp. *oharae* (CCBH10892), isolated from a rectal swab of another patient in RS, and *Klebsiella pneumoniae* (CCBH13327), isolated from a rectal swab of a patient in the city of Rio de Janeiro, RJ.

Initially all of the strains were tested against different antimicrobial drugs and showed multidrug resistance profiles. Genomic DNA of all strains was extracted using QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Germany). Whole genome shotgun libraries from each strain were prepared with the Nextera XT DNA Sample Prep kit (Illumina Inc, USA), according to the manufacturer's instructions, and sequenced on an Illumina MiSeq system with the MiSeq Reagent v.2 500 cycles kit. Sequence reads were then trimmed and filtered using a Phred score >20. The software Geneious v.6.1.7 (Biomatters Ltd, New Zealand) was used to perform *de novo* assembling. Rapid Annotation using System Technology v.2.0 server was used for genome annotation. Acquired resistance genes were analysed using the ResFinder platform (genomicepidemiology.org). The detailed features of all isolates can be found on Table.

For the *P. rettgeri* isolate (CCBH11880) we obtained 656,560 paired end reads of 250 base pairs (bp), which were assembled into 80 contigs. The G+C content for this strain was 41%, considered common for this species. The estimated genome size, comprising all contigs, was 4,999,177 bp. Overall, 4,670 protein coding sequences were found and 89 RNAs were annotated (79 tRNA and 10 rRNA). Acquired resistance genes were searched using the ResFinder platform and different resistance genes were observed such as: *aadA1* (GenBank JSEQ01000006.1; 199,767-200,555 bp), *strA* (GenBank JSEQ01000017.1; 91,398-92,201 bp), *strB* (GenBank JSEQ01000017.1; 92,201-93,037 bp), *aadB* (GenBank JSEQ01000041.1; 326-859 bp), *aac(6')-Ib* (GenBank JSEQ01000017.1; 2,882-3,400 bp), *qnrD* (GenBank JSEQ01000028.1; 1,671-2,315 bp), *bla<sub>OXA-10</sub>* (GenBank JSEQ01000017.1; 2,014-2,814 bp), *bla<sub>NDM-1</sub>* (GenBank JSEQ01000024.1; 412-1,224 bp), *ere(A)* (GenBank JSEQ01000025.1; 295-1,521 bp), *msr(E)* (GenBank JSEQ01000023.1; 37,090-38,565 bp), *mph(E)* (GenBank JSEQ01000023.1; 36,150-37,034 bp), *floR* (GenBank JSEQ01000017.1; 96,173-97,386 bp), *catA1* (GenBank JSEQ01000031.1; 870-1,529 bp), *sul1* (GenBank JSEQ01000017.1; 3,823-4,749 bp), *sul2* (GenBank

doi: 10.1590/0074-02760150081

Financial support: CNPq, FIOCRUZ

+ Corresponding author: anapdca@ioc.fiocruz.br

Received 27 February 2015

Accepted 27 April 2015

online | memorias.ioc.fiocruz.br

TABLE  
Genetic information about three NDM-1-producing isolates from Brazil

Isolate feature	<i>Providencia rettgerii</i> (CCBH11880)	<i>Enterobacter hormaechei</i> (CCBH10892)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (CCBH13327)
NCBI accession	JSEQ00000000	JSBO00000000	JSER00000000
BioProject	PRJNA264579	PRJNA264581	PRJNA264954
Isolation source	Surgical wound	Rectal swab	Rectal swab
City/state of origin	Porto Alegre/RS	Porto Alegre/RS	Rio de Janeiro/RJ
GC content (%)	41	54.5	56.6
Paired end reads (n)	656,560	2,283,589	1,748,579
Genome coverage	32X	106X	72X
Estimated genome size (bp)	4,999,177	5,373,562	6,023,847
Contigs (n)	80	58	106
N50	282,487	277,989	133,213
Coding sequences (n)	4,670	5,134	5,722
RNAs (n)	89	102	99
tRNA (n)	79	89	86
rRNA (n)	10	13	13
Resistance genes	<i>aadA1</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>aadB</i> , <i>aac(6)-Ib</i> , <i>qnrD</i> , <i>bla</i> <sub>OXA-10</sub> , <i>bla</i> <sub>NDM-1*</sub> , <i>ere(A)</i> , <i>msr(E)</i> , <i>mph(E)</i> , <i>floR</i> , <i>catA1</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>tet(A)</i> , <i>dfrA1</i> , <i>dfrA8</i>	<i>aadA2</i> , <i>aph(3')-Ia</i> , <i>strA</i> , <i>strB</i> , <i>bla</i> <sub>DHA-1*</sub> , <i>bla</i> <sub>ACT-7*</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-15*</sub> , <i>bla</i> <sub>NDM-1*</sub> , <i>qnrB4</i> , <i>ere(A)</i> , <i>sul1</i> , <i>tet(A)</i> , <i>tet(D)</i>	<i>aadA2</i> , <i>aac(3)-IIa</i> , <i>bla</i> <sub>SHV-99*</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-2*</sub> , <i>bla</i> <sub>CARB-2*</sub> , <i>bla</i> <sub>NDM-1*</sub> , <i>oqxA</i> , <i>oqxB</i> , <i>qnrA1</i> , <i>catA1</i> , <i>sul1</i> , <i>tet(D)</i> , <i>dfrA8</i>

bp: base pair; NCBI: National Center for Biotechnology Information; RJ: state of Rio de Janeiro; RS: state of Rio Grande do Sul.

JSEQ01000017.1; 90,522-91,337 bp), *tet(A)* (GenBank JSEQ01000017.1; 94,373-95,544 bp), *dfrA1* (GenBank JSEQ01000006.1; 198,617-199,090 bp) and *dfrA8* (GenBank JSEQ01000033.1; 334-843 bp).

Genome sequencing of *E. hormaechei* subsp. *oharae* isolate (CCBH10892) generated 2,283,589 paired end reads of 250 bp, yielding 58 contigs after assembly (Geneious v.6.1.7) for a genome size estimative of 5,373,562 bp. A total of 5,134 protein coding sequences and 102 RNAs were observed, being 89 tRNA and 13 rRNA. ResFinder analysis provided the following acquired resistance genes: *aadA2* (GenBank JSBO01000022.1; 2,498-3,289 bp), *aph(3')-Ia* (GenBank JSBO01000057.1; 354-932 bp), *strA* (GenBank JSBO01000042.1; 2,178-2,981 bp), *strB* (GenBank JSBO01000042.1; 2,981-3,817 bp), *bla*<sub>DHA-1</sub> (GenBank JSBO01000036.1; 13,727-14,866 bp), *bla*<sub>ACT-7</sub> (GenBank JSBO01000001.1; 594,635-595,780 bp), *bla*<sub>CTX-M-15</sub> (GenBank JSBO01000007.1; 210,876-211,751 bp), *bla*<sub>NDM-1</sub> (GenBank JSBO01000041.1; 4,501-5,313 bp), *qnrB4* (GenBank JSBO01000036.1; 8,959-9,606 bp), *ere(A)* (GenBank JSBO01000002.1; 405,895-406,937 bp), *sul1* (GenBank JSBO01000022.1; 3,707-4,633 bp), *tet(A)* (GenBank JSBO01000046.1; 2,098-3,297 bp) and *tet(D)* (GenBank JSBO01000044.1; 1,151-2,335 bp).

The *K. pneumoniae* isolate (CCB13327) had an estimated genome size of 6,023,847 bp. An assembly (Geneious v.6.1.7) with 106 contigs was achieved with 1,748,579 paired end reads of 250 bp. A total of 5,722 protein coding sequences were observed, including 99 RNA sequences (86 tRNA and 13 rRNA). Ac-

quired resistant genes found were: *aadA2* (GenBank JSER01000014.1; 552-1,343 bp), *aac(3)-IIa* (GenBank JSER01000058.1; 14,738-15,598 bp), *bla*<sub>SHV-99</sub> (GenBank JSER01000008.1; 101,044-101,904 bp), *bla*<sub>CTX-M-2</sub> (GenBank JSER01000045.1; 2,516-3,391 bp), *bla*<sub>CARB-2</sub> (GenBank JSER01000014.1; 1,461-2,375 bp), *bla*<sub>NDM-1</sub> (GenBank JSER01000063.1; 4,749-5,561 bp), *oqxA* (GenBank JSER01000088.1; 4,991-6,166 bp), *oqxB* (GenBank JSER01000088.1; 2,518-4,967 bp), *qnrA1* (GenBank JSER01000080.1; 416-1,072 bp), *catA1* (GenBank JSER01000041.1; 3,303-3,962 bp), *sul1* (GenBank JSER01000058.1; 4,497-5,423 bp), *tet(D)* (GenBank JSER01000091.1; 392-1,576 bp) and *dfrA8* (GenBank JSER01000058.1; 816-1,325 bp). Overall, we observed that these NDM-1-producing Enterobacteriaceae strains carry resistance genes to different antimicrobial classes, which can explain the multidrug resistant profile observed.

In *P. rettgeri* CCBH 11880, the *bla*<sub>NDM-1</sub> was found inside the Tn125 transposon, which is composed of two copies of IS*Aba125* (Carvalho-Assef et al. 2013) (data not shown). In the *E. hormaechei* (Carvalho-Assef et al. 2014) (GenBank accession NG041719) and *K. pneumoniae* isolates, the *bla*<sub>NDM-1</sub> gene was found flanked by only one copy of IS*Aba125* (truncated) at the right boundary (data not shown).

The announcement of the whole-genome sequence of the three NDM-1-producing Enterobacteriaceae strains also provides basis for other studies, which will certainly increase our understanding of the role of this species in the drug resistance scenario.

*Nucleotide sequence accessions* - These Whole Genome Shotgun project have been deposited in DDBJ/ENA/GenBank under the accessions JSEQ00000000, JSBO00000000 and JSER00000000 for *P. rettgerii* (CCBH11880), *E. hormaechei* (CCBH10892) and *K. pneumoniae* (CCBH13327), respectively. The versions described in this paper are the first version (JSEQ00000000, JSBO00000000 and JSER00000000).

#### REFERENCES

- Carvalho-Assef AP, Pereira PS, Albano RM, Berião GC, Chagas TPG, Timm LN, da Silva RCF, Falci DR, Asensi MD 2013. Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. *J Antimicrob Chemother* 68: 2956-2957.
- Carvalho-Assef AP, Pereira PS, Albano RM, Berião GC, Tavares CP, Chagas TP, Marques EA, Timm LN, da Silva RC, Falci DR, Asensi MD 2014. Detection of NDM-1, CTX-M-15 and *qnrB4*-producing *Enterobacter hormaechei* isolates in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 58: 2475-2476.
- Nordmann P, Naas T, Poirel L 2011. Global spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis* 17: 1791-1798.
- Pereira PS, Borghi M, Albano RM, Berião GC, Lopes JCO, Asensi MD, Carvalho-Assef APD 2014. First description of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil. 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, P1196, Poster Session V, Worldwide spread of carbapenem resistance. Available from: [escmid.org/escmid\\_library/online\\_lecture\\_library/?search=1&current\\_page=1&search\\_term=polyana+silva+pereira&timeperiod%5B%5D=ly](http://escmid.org/escmid_library/online_lecture_library/?search=1&current_page=1&search_term=polyana+silva+pereira&timeperiod%5B%5D=ly).
- Pillonetto M, Arend L, Vespero EC, Pelisson M, Chagas TP, Carvalho-Assef AP, Asensi MD 2014. The first report of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* ST 25 in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 58: 7592-7594.
- Rozales FP, Ribeiro VB, Magagnin CM, Pagano M, Lutz L, Falci DR, Machado A, Barth AL, Zavascki AP 2014. Emergence of NDM-1-producing Enterobacteriaceae in Porto Alegre, Brazil. *Int J Infect Dis* 25: 79-81.
- Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, Walsh TR 2009. Characterization of a new metallo- $\beta$ -lactamase gene, *bla*<sub>NDM-1</sub> and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 5046-5054.

## Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: spread of clonal complex 11 (ST11, ST437 and ST340)

Polyana Silva Pereira, Carlos Felipe Machado de Araujo, Liliane Miyuki Seki, Viviane Zahner, Ana Paula D'Alincourt Carvalho-Assef and Marise Dutra Asensi\*

Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar (LAPIH), Instituto Oswaldo Cruz—FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

\*Corresponding author. Tel: +552125621636; Fax: +552125621634; E-mail: marise@ioc.fiocruz.br

Received 6 June 2012; returned 19 July 2012; revised 6 September 2012; accepted 7 September 2012

**Objectives:** To perform molecular epidemiology for 113 KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in 2010 from 12 Brazilian states.

**Methods:** The resistance profile was determined by disc diffusion and Etest. Genetic polymorphism was analysed by PFGE and multilocus sequence typing. The genetic environment of the *bla*<sub>KPC</sub> gene was determined by PCR and identification of the carrier plasmid was determined by hybridization.

**Results:** Most of the isolates were multidrug resistant, with 15% and 49% being resistant to polymyxin and tigecycline, respectively. Twenty-two sequence types (STs) were observed, with ST11, ST437 and ST340 [clonal complex 11 (CC11)] being the most prevalent (75% of isolates) observed in 10 states. *bla*<sub>KPC-2</sub> was associated with transposon Tn4401 'b' and in 36% this gene was found in IncN plasmids of 40 kb.

**Conclusions:** In Brazil, the spread of *bla*<sub>KPC-2</sub> is occurring due to dispersion of Tn4401 'b', carried by IncN plasmids of 40 kb, and mainly the dissemination of CC11, with ST437 and ST11 playing an important role.

**Keywords:** KPC, *K. pneumoniae*, CC11, Tn4401, IncN plasmids

### Introduction

The most important mechanism of resistance against carbapenems in Enterobacteriaceae is the production of carbapenemases such as *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC). This enzyme was first described in a *K. pneumoniae* strain isolate from the USA in 1996<sup>1</sup> and has been responsible for many outbreaks worldwide.<sup>2</sup> In addition to being resistant to all  $\beta$ -lactams available, this carbapenemase has a high capacity to spread, since its gene has been described in transferable plasmids and transposons such as Tn4401 associated with insertion sequence (IS) elements.<sup>3</sup>

KPC-producing *K. pneumoniae* was first described as occurring in Brazil in 2006<sup>4</sup> and since then its incidence has greatly increased.<sup>5</sup> Seki *et al.*<sup>5</sup> observed the presence of the *bla*<sub>KPC-2</sub> gene in *K. pneumoniae* strains isolated in five states from 2006 through to 2009. In 2010, however, a great dispersion of this gene was observed in this country, with the spread of carbapenem-resistant *K. pneumoniae* observed in several hospitals in different Brazilian cities and states.

Thus, the aim of this study was to perform molecular typing, determine the antimicrobial resistance profile and identify the

carrier plasmid and the flanking region of the *bla*<sub>KPC</sub> gene of 113 KPC-producing *K. pneumoniae* from 32 hospitals located in 12 Brazilian states belonging to the five different geographical regions of this country in 2010.

### Materials and methods

#### Bacterial isolates and phenotypic tests

Our laboratory (LAPIH), located at Instituto Oswaldo Cruz—FIOCRUZ, Ministry of Health, Brazil, routinely receives clinical bacterial isolates from hospitals and LACENs (Central Laboratory of Public Health) from different states. According to the clinical specimens (such as blood, urine, abdominal fluid and lower respiratory tract secretions) and locality [south (SC), south-east (ES, RJ and MG), north-east (PE, AL, CE, PI and MA), north (AM) and mid-west (GO and DF)], we selected 113 non-duplicate *K. pneumoniae* isolates among the 500 KPC-producing strains received in 2010. Bacteria were identified by conventional techniques<sup>6</sup> and identification of KPC allele variants was performed by PCR and sequencing.<sup>5</sup> Antimicrobial susceptibility testing was performed by the disc diffusion method<sup>7</sup> and Etest (AB Biodisk, Solna, Sweden).<sup>8</sup>

**Molecular investigations**

For molecular typing and epidemiological analysis we used PFGE<sup>9</sup> and multilocus sequence typing (MLST).<sup>10</sup>

The genetic environment of the *bla*<sub>KPC-2</sub> gene was investigated by PCR as described previously by Naas *et al.*,<sup>3</sup> except for amplification of ISKpn7, in which the primers described by Kitchel *et al.*<sup>11</sup> were used.

Using multiplex PCR, we analysed the plasmid incompatibility groups present in the different MLST types according to the scheme proposed by Carattoli *et al.*<sup>12</sup>

The plasmids were extracted by alkaline lysis,<sup>13</sup> and the Southern blot hybridizations<sup>14</sup> were performed with digoxigenin-labelled *bla*<sub>KPC-2</sub> and plasmid incompatibility group probes generated by the PCR DIG detection system (Roche Diagnostics).

**Results and discussion**

The majority of the 113 isolates were recovered from patients from the south-east (*n*=46) and mid-west (*n*=42) regions, mainly the Federal District (38/113, 34%) and Rio de Janeiro state (28/113, 25%) (Figure 1). Most of the isolates were recovered from blood (46/113, 41%) and urine (37/113, 33%). All isolates possessed the KPC-2 allele variant.

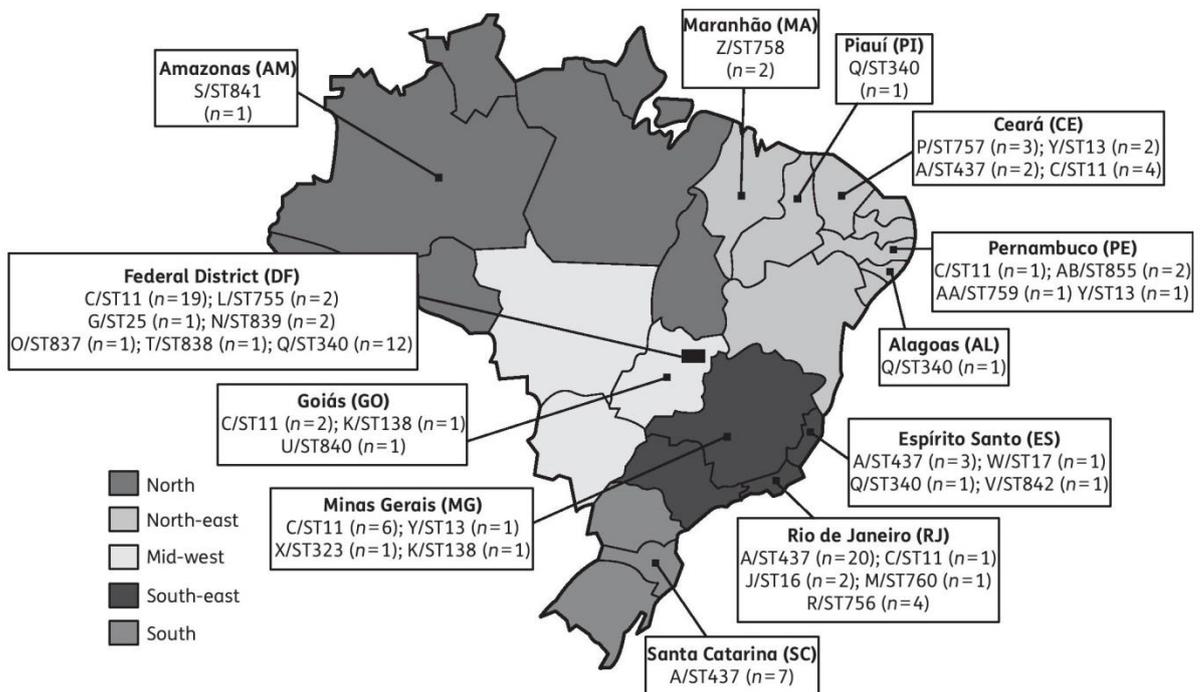
According to CLSI 2011 breakpoints,<sup>7</sup> most of the isolates were resistant to β-lactams, such as cefotaxime (93.8%), ceftazidime (87.6%) and piperacillin/tazobactam (100%). All isolates were non-susceptible to ertapenem (MIC<sub>50</sub> >32 mg/L, MIC range 2–>32 mg/L), 99.1% to imipenem (MIC<sub>50</sub> >32 mg/L, MIC range 1–>32 mg/L) and 99.1% to meropenem (MIC<sub>50</sub> >32 mg/L, MIC range 0.5–>32 mg/L). We observed elevated resistance to

ciprofloxacin (94.6%) and sulfamethoxazole/trimethoprim (85.4%), whereas 68/113 (60.2%), 47/113 (41.6%) and 6/113 (5.3%) were resistant to gentamicin, amikacin and fosfomycin trometamol, respectively. According to EUCAST 2011 breakpoints,<sup>8</sup> 11/113 (9.7%) of the strains were resistant to polymyxin B (MIC<sub>50</sub>=0.75 mg/L, MIC<sub>90</sub>=2 mg/L, MIC range 0.25–32 mg/L), whereas 43/113 (38.1%) were resistant to tigecycline (MIC<sub>50</sub>=2 mg/L, MIC<sub>90</sub>=6 mg/L, MIC range 0.38–24 mg/L).

A high level of resistance to different antimicrobial classes has frequently been observed in KPC-producing isolates worldwide.<sup>2</sup> Resistance to polymyxin and tigecycline is very worrisome, because these antimicrobials have been the last option for treatment of severe infections caused by KPC-producing organisms. According to Endimiani *et al.*,<sup>15</sup> fosfomycin demonstrates *in vitro* activity against KPC-producing *K. pneumoniae* isolates and represents a possible alternative to polymyxin and tigecycline as a salvage therapy.

Figure 1 shows the distribution of the 22 PFGE clones observed in the 113 KPC-producing *K. pneumoniae* for each Brazilian state. Despite the clonal diversity observed, the most prevalent profiles were A/Kp-RJ (28%), C (29%) and Q (13%). About 70% of polymyxin- and tigecycline-resistant strains belonged to clones A/Kp-RJ and C (polymyxin: A/Kp-RJ=4, C=4; tigecycline: A/Kp-RJ=20, C=10).

MLST performed on 39 isolates representing all PFGE clones, including isolates from each state, also found 22 sequence types (STs), showing great consistency between the two methodologies used (Figure 1). Thirteen new STs were first described in our study and were deposited in the *K. pneumoniae* MLST



**Figure 1.** Distribution of the 22 PFGE clones and STs according to state and geographical region of 113 KPC-producing *K. pneumoniae* from Brazil.

**Table 1.** MLST analysis, genetic environment of the *bla*<sub>KPC-2</sub> gene and plasmid analysis of 39 KPC-producing *K. pneumoniae* from 12 states in Brazil

Isolate number	PFGE profile <sup>a</sup>	ST	CC	State	Specimen	Tn4401	<i>bla</i> <sub>KPC</sub> -containing plasmid size (kb)	Incompatibility group
CCBH 5658	C	11	CC11	Goiás	blood	'b' without JSKpn7	60	UT
CCBH 5982	C	11	CC11	Distrito Federal	blood	'b'	40	IncN
CCBH 6370	C	11	CC11	Ceará	blood	'b'	48-25-3	UT
CCBH 6375	C	11	CC11	Ceará	blood	'b' without JSKpn7	43-16-7	UT
CCBH 6429	C	11	CC11	Minas Gerais	urine	'b'	16-7	UT
CCBH 6633	C	11	CC11	Distrito Federal	blood	'b' without JSKpn7	43	UT
CCBH 6740	C	11	CC11	Pernambuco	urine	'b'	15-7-5	UT
CCBH 6798	C	11	CC11	Rio de Janeiro	blood	'b'	5	UT
CCBH 5788	Y	13	—	Minas Gerais	urine	'b'	5	UT
CCBH 6372	Y	13	—	Ceará	blood	'b'	39	UT
CCBH 6530	Y	13	—	Pernambuco	blood	'b'	39	UT
CCBH 6106	J	16	CC16-17	Rio de Janeiro	blood	'b'	40	IncN
CCBH 6030	W	17	CC16-17	Espirito Santo	urine	'b'	ND	ND
CCBH 6707	G	25	—	Distrito Federal	urine	'b'	33	UT
CCBH 5659	K	138	—	Goiás	urine	'b' without JSKpn7	60	UT
CCBH 5683	K	138	—	Minas Gerais	blood	'b' without JSKpn7	2	UT
CCBH 6428	X	323	—	Minas Gerais	urine	'b'	58-6	UT
CCBH 5641	Q	340	CC11	Espirito Santo	abdominal fluid	'b'	20-13	UT
CCBH 5745	Q	340	CC11	Distrito Federal	urine	'b'	40	IncN
CCBH 6018	Q	340	CC11	Distrito Federal	catheter	'b' without JSKpn7	32	UT
CCBH 6556	Q	340	CC11	Alagoas	ND	'b'	50-15-6	UT
CCBH 6805	Q	340	CC11	Pauli	LRTS	'b'	17	UT
CCBH 5623	A-KpRj	437	CC11	Santa Catarina	catheter	'b'	40	IncN
CCBH 5631	A-KpRj	437	CC11	Espirito Santo	urine	'b'	40	IncN
CCBH 6366	A-KpRj	437	CC11	Ceará	urine	'b'	40	IncN
CCBH 6540	A-KpRj	437	CC11	Rio de Janeiro	catheter	'b'	40	IncN
CCBH 5625	L	755	—	Distrito Federal	blood	'b'	40	IncN
CCBH 6091	R	756	—	Rio de Janeiro	catheter	'b'	40	IncN
CCBH 6354	P	757	CC11	Ceará	blood	'b'	39	UT
CCBH 6524	Z	758	CC758-840	Maranhão	catheter	'b'	40	IncN
CCBH 6742	AA	759	—	Pernambuco	blood	'b'	46-35-8	UT
CCBH 6806	M	760	—	Rio de Janeiro	urine	'b'	40	IncN
CCBH 6010	O	837	—	Distrito Federal	catheter	'b'	44	UT
CCBH 6298	T	838	—	Distrito Federal	blood	'b'	40	IncN
CCBH 6306	N	839	—	Distrito Federal	catheter	'b'	40	IncN
CCBH 6511	U	840	CC758-840	Goiás	LRTS	'b'	10	UT
CCBH 6527	AB	841	—	Pernambuco	blood	'b'	21-7-3	UT
CCBH 6566	S	842	—	Amazonas	blood	'b'	6	UT
CCBH 6603	V	855	CC11	Espirito Santo	blood	'b'	40	IncN

LRTS, lower respiratory tract secretion; ND, not determined; UT, untypeable.

<sup>a</sup>Assignment of profiles followed the numbering used by Seki et al.<sup>5</sup>

database (ST755, ST756, ST757, ST758, ST759, ST760, ST837, ST838, ST839, ST840, ST841, ST842 and ST855).

The most prevalent PFGE profiles were designated by MLST as A/Kp-RJ/ST437, C/ST11 and Q/ST340. ST11 and ST340 were reported in Greece.<sup>16</sup> In our previous report that considered isolates during the years 2006–09,<sup>5</sup> we found ST437 in the south-east region (RJ and ES) and ST11 in the north-east and south-east (PE and MG). The current study reports the dispersion of these clones to different regions, with ST437 now being found in the south (SC), south-east (ES and RJ) and north-east (CE) regions. The ST11 and ST340 clones were found in the mid-west, south-east and north-east regions (ST11 in CE, DF, GO, MG, PE, RJ and ST340 in AL, DF, ES, PI). Andrade *et al.*<sup>17</sup> also found ST11 and ST437 in the south-east region: São Paulo and Rio de Janeiro, respectively.

Phylogenetic analysis showed that all these STs belong to the CC11 (where CC stands for clonal complex), which is widespread worldwide and includes the epidemic clone ST258. Two other clones first described in our study also belong to this CC: ST757 and ST855. All these clones were considered single locus variants, displaying differences in the *tonB* gene. Therefore, we found CC11 strains dispersed in 10 of the 12 Brazilian states studied (AL, CE, DF, ES, GO, PE, RJ and SC), comprising 75% of isolates. This study confirms that CC11 should be considered the most important CC related to *bla*<sub>KPC</sub> gene dispersion worldwide.<sup>18</sup>

Two other CCs were found in our isolates: CC16–17 (ST16 and ST17) and CC758–840 (ST758 and ST840). ST16 was previously described in Canada, in strains producing NDM-1.<sup>19</sup> ST17 has already been observed in KPC-2-producing *K. pneumoniae* from Greece.<sup>16</sup>

We found the *bla*<sub>KPC-2</sub> gene is associated with Tn4401, variant 'b', in all strains tested ( $n=39$ ) (Table 1). This isoform has already been observed in the USA,<sup>11</sup> Greece<sup>16</sup> and Colombia.<sup>20</sup> In Brazil, previous reports observed the Tn4401 variants 'a' and 'b' associated with KPC-2-producing organisms of ST11, ST258 and ST437.<sup>17,20</sup> The inverted repeat sequences of the flanking region were not amplified, suggesting that the insertion site found in our isolates may be different from that of *K. pneumoniae* YC of Naas *et al.*<sup>3</sup> ISKpn7 was observed in 84.6% (33/39) of the isolates, being absent from three isolates of ST11, two of ST138 and one of ST340. The lack of this IS suggests that another transposition event might have occurred.

The size of the plasmids carrying the *bla*<sub>KPC-2</sub> gene varied between 3 and 60 kb, with the most prevalent being ~40 kb (24%). In just one isolate of ST17 it was not possible to observe the *bla*<sub>KPC-2</sub> gene associated with plasmids. Incompatibility group analysis of these plasmids revealed that in 14 isolates (36%) belonging to different STs (ST11, ST16, ST340, ST437, ST756, ST758, ST760, ST838, ST839, ST855), the *bla*<sub>KPC-2</sub> gene was associated with 40 kb IncN plasmids; in the other 24 isolates we could not identify the incompatibility group of the *bla*<sub>KPC</sub>-carrying plasmids (Table 1). Andrade *et al.*<sup>17</sup> found IncN (40 kb), IncL/M (50–60 kb) and IncFII (130 kb) plasmids associated with the *bla*<sub>KPC-2</sub> gene of ST11, ST437 and ST258 in Brazil. In one global study that included six countries, the *bla*<sub>KPC-2</sub> gene was also found associated with plasmids of IncN (35, 70, 75 and 80 kb), IncL/M (12, 35 and 75 kb) and IncFII (80 kb).<sup>20</sup>

## Conclusions

In Brazil, we believe the spread of the *bla*<sub>KPC-2</sub> gene is occurring due to the dispersion of Tn4401 'b', carried and spread by strains of different STs. We described 13 new STs, however, a great dispersion of CC11 isolates, mainly A-KpRJ/ST437 and C/ST11, carrying IncN plasmids of 40 kb were observed. Thus, the spread of KPC carbapenemase may be facilitated by its localization on plasmids and transposons and also by efficient clones.

## Acknowledgements

We thank the Institute Pasteur MLST database curators for coding the MLST alleles and profiles, and the Genomic Platform for DNA Sequencing PDTIS (Instituto Oswaldo Cruz). We also thank the microbiologists who provided the strains: Ivoneide Barroso, Ana Lúcia de Souza, Maria Iracema Patrício, Celso Faria Junior, Maria da Penha Herkenhoff, Robmary de Almeida, Lécia Cosme, Carlene Alves, Valdelúcia Cavalcanti, Letiano da Silva, Maria Pia and Rita Bertocini from the Public Health Laboratories (LACENs) of Alagoas, Amazonas, Ceará, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Minas Gerais, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro and Santa Catarina, respectively.

## Funding

This work was funded by research grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico—CNPq, Fundação Carlos Chagas de Amparo a Pesquisa—FAPERJ and Instituto Oswaldo Cruz—FIOCRUZ.

## Transparency declarations

None to declare.

## References

- 1 Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ *et al.* Novel carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45**: 1151–61.
- 2 Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis* 2011; **17**: 1791–8.
- 3 Naas T, Cuzon G, Villegas MV *et al.* Genetic structures at the origin of acquisition of the  $\beta$ -lactamase *bla*<sub>KPC</sub> gene. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**: 1257–63.
- 4 Monteiro J, Santos AF, Asensi MD *et al.* First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 333–4.
- 5 Seki LM, Pereira PS, de Souza MPAH *et al.* Molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Brazil: the predominance of sequence type 437. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; **70**: 274–7.
- 6 Koneman EW, Allen SD, Janda WM *et al.* *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, 6th edn. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005.
- 7 Clinical Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-first Informational Supplement M100–S21*. CLSI, Wayne, PA, USA, 2011.

- 8** EUCAST. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 1.3, January 2011. [http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/) (15 August 2012, date last accessed).
- 9** Ribot EM, Fair MA, Gautam R et al. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathog Dis* 2006; **3**: 59–67.
- 10** Diancourt L, Passet V, Verhoef J et al. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 4178–82.
- 11** Kitchel B, Rasheed JK, Patel JB et al. Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: clonal expansion of multilocus sequence type 258. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 3365–70.
- 12** Carattoli A, Bertini A, Villa L et al. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods* 2005; **63**: 219–28.
- 13** Kado CI, Liu ST. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J Bacteriol* 1981; **145**: 1365–73.
- 14** Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- 15** Endimiani A, Patel G, Hujer KM et al. In vitro activity of fosfomycin against *bla*<sub>KPC</sub>-containing *Klebsiella pneumoniae* isolates, including those nonsusceptible to tigecycline and/or colistin. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 526–9.
- 16** Giakkoupi P, Papagiannitsis CC, Miriagou V et al. An update of the evolving epidemic of *bla*<sub>KPC-2</sub>-carrying *Klebsiella pneumoniae* in Greece (2009–10). *J Antimicrob Chemother* 2011; **66**: 1510–3.
- 17** Andrade LN, Curiao T, Ferreira JC et al. Dissemination of *bla*<sub>KPC-2</sub> by the spread of *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 258 clones (ST258, ST11, ST437) and plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among Enterobacteriaceae species in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 3579–83.
- 18** Grundmann H, Livermore DM, Giske CG et al. Carbapenem-non-susceptible Enterobacteriaceae in Europe: conclusions from a meeting of national experts. *Euro Surveill* 2010; **15**: pii=19711.
- 19** Mulvey MR, Grant JM, Plewes K et al. New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*, Canada. *Emerg Infect Dis* 2011; **17**: 103–6.
- 20** Cuzon G, Naas T, Truong H et al. Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produce  $\beta$ -lactamase *bla*<sub>KPC-2</sub> gene. *Emerg Infect Dis* 2010; **16**: 1349–56.

## 9. ANEXO B

Termos de autorização de reprodução de imagens e artigos científicos utilizados nesta Tese de Doutorado fornecidos pelas revistas científicas.

### 1. Termo referente ao uso de imagem da Figura 1.3.

<b>ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS</b>	
Jun 17, 2016	
This Agreement between Polyana Silva Pereira ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.	
License Number	3890740979168
License date	Jun 16, 2016
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	The Lancet Infectious Diseases
Licensed Content Title	Clinical epidemiology of the global expansion of Klebsiella pneumoniae carbapenemases
Licensed Content Author	L Silvia Munoz-Price, Laurent Poirel, Robert A Bonomo, Mitchell J Schwaber, George L Daikos, Martin Cormican, Giuseppe Cornaglia, Javier Garau, Marek Gniadkowski, Mary K Hayden, Karthikeyan Kumarasamy, David M Livermore, Juan J Maya, Patrice Nordmann et al.
Licensed Content Date	September 2013
Licensed Content Volume Number	13
Licensed Content Issue Number	9
Licensed Content Pages	12
Start Page	785
End Page	796
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier	No
Will you be translating?	Yes
Number of languages	1
Languages	Portuguese
Order reference number	
Original figure numbers	Figure
Title of your thesis/dissertation	Caracterização molecular de Klebsiella pneumoniae produtoras de carbapenemases do tipo KPC-2, NDM-1 e OXA-370 isoladas no Brasil
Expected completion date	Jun 2016
Estimated size (number of pages)	215
Elsevier VAT number	GB 494 6272 12
Requestor Location	Polyana Silva Pereira
Total	0.00 USD

2. Termo referente ao uso de imagens das Figuras 1.4 e 1.5.

<b>ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS</b>	
Jun 17, 2016	
This Agreement between Polyana Silva Pereira ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.	
License Number	3890750172379
License date	Jun 16, 2016
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Clinical Microbiology and Infection
Licensed Content Title	The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide
Licensed Content Author	P. Nordmann,L. Poirel
Licensed Content Date	September 2014
Licensed Content Volume Number	20
Licensed Content Issue Number	9
Licensed Content Pages	10
Start Page	821
End Page	830
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	2
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	Yes
Number of languages	1
Languages	Portuguese
Order reference number	
Original figure numbers	Fig.2; Fig.3
Title of your thesis/dissertation	Caracterização molecular de Klebsiella pneumoniae produtoras de carbapenemases do tipo KPC-2, NDM-1 e OXA-370 isoladas no Brasil
Expected completion date	Jun 2016
Estimated size (number of pages)	215
Elsevier VAT number	GB 494 6272 12
Requestor Location	Polyana Silva Pereira Avenida Brasil, 4365, Manguinhos Pavilhao Rocha Lima, 3° andar, Sala 319 Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21040-900 Brazil Attn: Polyana Silva Pereira
Total	0.00 USD

3. Termo de autorização referente à reprodução do artigo intitulado “**Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: spread of clonal complex 11 (ST11, ST437 and ST340)**”, publicado na revista *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* em 2013 (ANEXO A2).

<b>OXFORD UNIVERSITY PRESS LICENSE TERMS AND CONDITIONS</b>	
Jun 16, 2016	
This Agreement between Polyana Silva Pereira ("You") and Oxford University Press ("Oxford University Press") consists of your license details and the terms and conditions provided by Oxford University Press and Copyright Clearance Center.	
License Number	3890760294910
License date	Jun 16, 2016
Licensed Content Publisher	Oxford University Press
Licensed Content Publication	Journal of Antimicrobial Chemotherapy
Licensed Content Title	Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing <i>Klebsiella pneumoniae</i> in Brazil: spread of clonal complex 11 (ST11, ST437 and ST340):
Licensed Content Author	Polyana Silva Pereira, Carlos Felipe Machado de Araujo, Liliane Miyuki Seki, Viviane Zahner, Ana Paula D'Alincourt Carvalho-Assef, Marise Dutra Asensi
Licensed Content Date	02/01/2013
Type of Use	Thesis/Dissertation
Institution name	
Title of your work	Caracterização molecular de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtoras de carbapenemases do tipo KPC-2, NDM-1 e OXA-370 isoladas no Brasil
Publisher of your work	n/a
Expected publication date	Jun 2016
Permissions cost	0.00 USD
Value added tax	0.00 USD
<b>Total</b>	<b>0.00 USD</b>
Requestor Location	Polyana Silva Pereira Avenida Brasil, 4365, Manguinhos Pavilhao Rocha Lima, 3° andar, Sala 319 Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21040-900 Brazil Attn: Polyana Silva Pereira
Publisher Tax ID	GB125506730
Billing Type	Invoice
Billing Address	Polyana Silva Pereira Avenida Brasil, 4365, Manguinhos Pavilhao Rocha Lima, 3° andar, Sala 319 Rio de Janeiro, Brazil 21040-900 Attn: Polyana Silva Pereira
Total	<b>0.00 USD</b>

Ressaltamos que a Figura 1.2 não necessita de autorização de reprodução, visto que foi publicada originalmente na Revista *Antimicrobial Agents and Chemoteraphy*, da Sociedade Americana de Microbiologia (*American Society of Microbiolgy - ASM*), que autoriza a reprodução de imagens de suas publicações em teses e dissertações, segundo o trecho retirado de seu website: “*ASM authorizes an advanced degree candidate to republish the requested material in his/her doctoral thesis or dissertation. If your thesis, or dissertation, is to be published commercially, then you must reapply for permission.*”

A Figura 4.6 foi publicada originalmente na Revista de acesso público *BMC Genomics* que autoriza a reprodução de seu conteúdo total desde que citada a fonte, segundo o trecho retirado de seu website: “*About BioMed Central. We are an STM (Science, Technology and Medicine) publisher with a large portfolio of peer-reviewed open access journals. Our journals span all areas of biology, medicine and health, including broad interest titles such as BMC Biology and BMC Medicine alongside specialist journals, such as Malaria Journal and BMC Infectious Diseases. All original research articles we publish are made freely accessible online immediately upon publication. Authors retain the copyright to their work, licensing it under the Creative Commons Attribution License which allows articles to be re-used and re-distributed without restriction, as long as the original work is correctly cited.*”

O artigo constante no ANEXO A1 intitulado “**Clonal Dissemination of OXA-370-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Rio de Janeiro, Brazil**”, publicado na revista *Antimicrobial Agents and Chemoteraphy*, da Sociedade Americana de Microbiologia (*American Society of Microbiolgy - ASM*), não necessita de autorização visto que a reprodução do conteúdo pelos autores em dissertações e teses é autorizada desde que informada a fonte original da publicação, de acordo com informações do website: “*Authors in ASM journals retain the right to republish discrete portions of his/her article in any other publication (including print, CD-ROM, and other electronic formats) of which he or she is author or editor, provided that proper credit is given to the original ASM publication. ASM authors also retain the right to reuse the full article in his/her dissertation or thesis*”.

O artigo constante no ANEXO A2 intitulado “**Draft genome sequences of three NDM-1 producing Enterobacteriaceae species isolated from Brazil**” foi publicado na revista *Mémoires do Instituto Oswaldo Cruz*, também de acesso público, que autoriza a reprodução de seu conteúdo total com fins educativos desde que citada a fonte, segundo informações do website da revista: “*The Memorias is published under the Open Access model and is therefore free for anybody to read and download, and to copy and disseminate for educational purposes. Content is freely accessible to readers and no publication fees are charged to authors. All content is published via a Creative Commons licence.*”