

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA  
MOLECULAR

**ROSINEIDE CARDOSO DE SOUZA**

Caracterização fenotípica e molecular dos mecanismos de resistência aos  
beta-lactâmicos em linhagens clínicas de *Klebsiella pneumoniae* isoladas do  
Amazonas.

São Carlos - SP  
2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA  
MOLECULAR

**ROSINEIDE CARDOSO DE SOUZA**

Caracterização fenotípica e molecular dos mecanismos de resistência aos beta-lactâmicos em linhagens clínicas de *Klebsiella pneumoniae* isoladas do Amazonas.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora, área de concentração em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

**Orientadora:** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ilana Lopes Baratella da Cunha Camargo

**Aluna:** Rosineide Cardoso de Souza

São Carlos – SP

2018

“A missão desse ensino é transmitir não o mero saber, mas uma cultura que permita compreender nossa condição e nos ajude a viver, e que favoreça, ao mesmo tempo, um modo de pensar aberto e livre”

Edgar Morin (1921)



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

---

**Folha de Aprovação**

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Rosineide Cardoso de Souza, realizada em 25/10/2018.

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Flávia Lopes Baratella da Cunha Camargo  
USP

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Iran Malvazi  
UFSCar

  
\_\_\_\_\_  
P/ Prof. Dr. Leonardo Neves de Andrade  
USP

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dra. Nelma Regina Segnini Bossolan  
USP

  
\_\_\_\_\_  
P/ Prof. Dra. Luciene Andrade da Rocha Minarini  
UNIFESP

## AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por me dar o dom da vida, pela infinita misericórdia e pela proteção e força durante essa caminhada.

Aos meus ancestrais por me guiarem sempre no caminho da retidão divina e me ajudarem a observar a diversidade ao meu redor com delicadeza e sutileza, respeitando as diferenças de cada um.

À minha família, em especial minha filha Ana Beatriz de Souza Feitosa pelo companheirismo, carinho, paciência e torcida!

À minha orientadora **Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Ilana Lopes Baratella da Cunha Camargo**, excelente orientação. Muito obrigada pelos diversos ensinamentos, pela confiança, paciência durante o desenvolvimento dessa pesquisa.

À Dr.<sup>a</sup> Andrei Nicoli Dabul pelo carinho, paciência e dedicação no ensino das técnicas moleculares, muito obrigada!

À Universidade Federal de São Carlos-UFSCar e ao Programa de Pós - Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, pela possibilidade de realização do Doutorado.

À FAPEAM - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas pela bolsa concedida.

À equipe do Laboratórios Reunidos e dos responsáveis pela bacteriologia, Dr. Joaquim Loureiro, Rildo Mendes de Lima e Kleber Gomes de Souza pela disponibilidade de proporcionar a caracterização dos isolados bacterianos.

À Dr.<sup>a</sup> Zeina Campos e sua equipe da Comissão de Controle de Infecções Hospitalar do Hospital e Pronto Socorro Dr. João Lúcio Pereira Machado pela colaboração na captação dos dados epidemiológicos.

A todos os docentes que contribuíram para enriquecer o curso de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia, pelos valiosos conhecimentos transmitidos durante as disciplinas ministradas e pelo convívio.

Aos técnicos e amigos do laboratório do Laboratório de Biofísica Molecular “Sérgio Mascarenhas” do Instituto de Física de São Carlos (IFSC-USP) Isabel Morais e Rafael Spadaccia Panhota, Dr. José Fernando de Lima e Dra. Andressa Patrícia Alves Pinto. Aos colegas que fiz durante essa caminhada, a equipe do LEMiMo: Jessica Okado Alexandre Oliveira, Suelen Scarpa, Gabriela Righetto, Geovana Silva, Janaína Vieira, Juliana Avaca, Rafaela Fernandes.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI	Ágar infusão e cérebro coração
CC	Complexo Clonal
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Instituto de Normas Clínicas e Laboratoriais, do inglês, “ <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i> ”
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de cálcio
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
ESBL	Beta-lactamase de espectro estendido
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase
MDR	Resistência a Múltiplas Drogas, do inglês, “Multidrug resistance”
MLST	Tipagem por sequenciamento <i>Multilocus</i> , do inglês, “ <i>Multilocus Sequencing Typing</i> ”
MCR-1	<i>Mobilized colistin resistance</i>
NTE <sub>KPC</sub>	<i>Non-Tn4401 genetic element</i>
OMP	Porina de membrana externa
OXA	Oxacilina
PCR	<i>Reação em cadeia da polimerase do inglês, “Polymerase Chain Reaction”</i>
PFGE	Eletroforese em gel com campo pulsado do inglês, “ <i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i> ”
tttEM	Temoneira
CTX-M	Cefotaxima Munique
MBLs	Metallo-beta-lactamases
SPM	São Paulo metallo-beta-lactamase
IMP	Imipenemase
NDM	<i>New Delhi</i> metallo-beta-lactamase
ST	Tipo de sequência





## RESUMO

**Souza, R.C. Caracterização fenotípica e molecular dos mecanismos de resistência aos beta-lactâmicos em linhagens clínicas de *Klebsiella pneumoniae* isoladas do Amazonas.** 70 f. Tese (Doutorado). Universidade Federal de São Carlos, São Paulo. 2018.

*Klebsiella pneumoniae* resistentes aos beta-lactâmicos estão presentes em hospitais do mundo todo e reduzem as alternativas de tratamento. Nesse estudo, 40 isolados de *K. pneumoniae* foram caracterizados. Todos foram classificados como *multirresistentes* e com resistência aos antibióticos beta-lactâmicos. Dentre estes, oito amostras são resistentes aos carbapenêmicos e seis delas têm o gene *bla*<sub>KPC-2</sub>, que codifica a enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC). Os genes *bla*<sub>TEM</sub> e *bla*<sub>CTX-M</sub> foram encontrados em 80% das amostras. Os 40 isolados foram agrupados em 12 pulsotipos (A a L) de acordo com a similaridade genética determinada pela macrorrestrrição do DNA seguida de eletroforese em gel de campos pulsados. Um total de 20 isolados foram classificados como pulsotipo A, o qual foi subdividido em 13 subtipos (A1 a A13), sendo o subtipo A1 o prevalente. Representantes do pulsotipo A pertencem ao ST11, complexo clonal CC258. Neste estudo, quatro novos STs foram identificados: ST2540, ST2308, ST2258 e ST2307. AMKP5 e AMKP2, dos subtipos A7 e A8, respectivamente, são resistentes aos carbapenêmicos, mas não apresentaram o gene *bla*<sub>KPC</sub>. O sequenciamento do genoma da AMKP5 indicou mutações na região C-terminal da porina OmpK36 que pode alterar a entrada dos carbapenêmicos na célula. O sequenciamento do genoma da amostra AMKP10 identificou o plasmídeo pAMKP10, com 48,454 pb pertencente ao grupo de incompatibilidade IncX5. Neste plasmídeo, o gene *bla*<sub>KPC</sub> foi encontrado em um ambiente genético diferente do Tn4401 (NTE<sub>KPC</sub> do inglês, *non-Tn4401 genetic element*) contendo *tnpA-ISEc63-like/tnpR-Tn3/tnpA-ISKpn27/bla*<sub>KPC-2</sub>/ $\Delta$ *ISKpn6*, baseado no Tn1722. Todos os isolados com o gene *bla*<sub>KPC-2</sub> apresentaram o mesmo plasmídeo. A conjugação deste plasmídeo para *Escherichia coli* J53 ocorreu a partir dos isolados ST11 com baixas frequências de conjugação (de  $8,23 \times 10^{-12}$  a  $1,31 \times 10^{-7}$ ) resultando em resistência aos carbapenêmicos. Por fim, observou-se que o surto de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos deste hospital Amazonense envolveu a transferência do pAMKP10 contendo NTE<sub>KPC</sub> entre duas linhagens (ST11 e ST2302), mas ocorreu em grande parte devido à disseminação clonal da linhagem endêmica ST11.

**Palavras-chave:** *Klebsiella pneumoniae*, *bla*<sub>KPC-2</sub>, NTE<sub>KPC</sub>, IncX5, carbapenêmicos.

## ABSTRACT

**Souza, R.C. Phenotypic and molecular characterization of beta-lactam resistance mechanisms in clinical strains of *Klebsiella pneumoniae* isolated from Amazonas.** 70 f. Tese (Doutorado). Universidade Federal de São Carlos, São Paulo. 2018

*Klebsiella pneumoniae* resistant to beta-lactams are present in hospitals worldwide and reduce treatment alternatives. In this study, 40 *K. pneumoniae* isolates were characterized. All of them were resistant to beta-lactam antibiotics and classified as multidrug resistant. Among these, eight isolates were resistant to carbapenems and six of which had the gene *bla*<sub>KPC-2</sub>, encoding the enzyme *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC). The *bla*<sub>TEM</sub> and *bla*<sub>CTX-M</sub> genes were found in 80% of the samples. The 40 isolates were grouped into 12 pulses (A to L) according to the genetic similarity determined by the DNA macro-restriction followed by pulsed-field gel electrophoresis. A total of 20 isolates were classified as pulsotype A, which was subdivided into 13 subtypes (A1 to A13), with subtype A1 being the most prevalent. Representatives of pulsotype A belong to the ST11, clonal complex CC258. In this study, we identified four new STs: ST2540, ST2308, ST2258, and ST2307. AMKP5 and AMKP2, belonging to subtypes A7 and A8, respectively, are resistant to carbapenems but did not present the *bla*<sub>KPC</sub> gene. Sequencing of the AMKP5 genome indicated mutations in the C-terminal region of the OmpK36 porin which may alter the entry of carbapenems into the cell. Genome sequencing of the AMKP10 isolate identified the plasmid pAMKP10, with 48.454 bp belonging to the IncX5 incompatibility group. In this plasmid, the *bla*<sub>KPC-2</sub> gene was found in a non-Tn4401 genetic element (NTE<sub>KPC</sub>) containing *tnpA*-*ISEc63*-like / *tnpR*-Tn3 / *tnpA*-*ISKpn27* / *bla*<sub>KPC-2</sub> /  $\Delta$ *ISKpn6*, based on Tn1722. All isolates with the *bla*<sub>KPC-2</sub> gene had the same plasmid. Conjugation of this plasmid to *Escherichia coli* J53 occurred from ST11 isolates with low conjugation frequencies ( $8.23 \times 10^{-12}$  to  $1.31 \times 10^{-7}$ ) resulting in resistance to carbapenems. Finally, the outbreak of carbapenem-resistant *K. pneumoniae* resistant of this Amazonian hospital involved the transfer of the NTE<sub>KPC</sub>-containing pAMKP10 between two lineages (ST11 and ST2302) but was largely due to the clonal dissemination of the ST11 endemic lineage.

**Keywords:** *Klebsiella pneumoniae*, *bla*<sub>KPC-2</sub>, NTE<sub>KPC</sub>, IncX5, carbapenem.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Estrutura química dos principais carbapenêmicos utilizados na clínica. .... 17
- Figura 2** - Principais componentes envolvidos nos mecanismos de resistência aos carbapenêmicos em bactérias Gram-negativas..... 19
- Figura 3** - Estrutura esquemática do transposon Tn4401. .... 22
- Figura 4** - Número de amostras resistentes a todos os antibióticos testados cada cor representa uma classe de antibióticos..... 23
- Figura 5** - Dendrograma de similaridade genética e análises fenotípicas e genotípicas dos isolados de *K. pneumoniae*. .... 27
- Figura 6** - Alinhamento das sequências de nucleotídeos que codificam a porina OmpK36 do isolado *K. pneumoniae* AMKP5 com o da linhagem referência *K. pneumoniae* HS11286. .... 31
- Figura 7** - Estrutura esquemática do ambiente genético do gene *bla<sub>KPC</sub>* em estudos anteriores realizados para comparar em linhagens analisadas..... 32
- Figura 8** - Alinhamento dos ambientes genéticos do gene *bla<sub>KPC-2</sub>* do plasmídeo pKP048 e do plasmídeo pAMKP10.. .... 34
- Figura 9** - Esquema da estrutura do plasmídeo conjugativo pAMKP10..... 35

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Principais características moleculares e funcionais das beta-lactamases .....	20
<b>Tabela 2</b> - Variantes do elemento Tn4401 carreando o gene <i>bla</i> <sub>KPC</sub> .....	23
<b>Tabela 3</b> - Sequências de primers utilizados para amplificação do novo ambiente genético que abriga o gene <i>bla</i> <sub>KPC-2</sub> no plasmídeo pAMKP10.....	13
<b>Tabela 4</b> - Linhagens utilizadas como controle positivo nas reações de PCR .....	14
<b>Tabela 5</b> - Sequências de primers utilizados para amplificação do novo ambiente genético que abriga o gene <i>bla</i> <sub>KPC-2</sub> no plasmídeo pAMKP10.....	19
<b>Tabela 6</b> - Perfil alélico e resultado do Tipo da Sequência das amostras analisadas pelo MLST dos clones da amostragem dos isolados bacterianos do hospital. ....	26
<b>Tabela 7</b> - Genes adquiridos que conferem resistência a antibióticos encontrados pelo Resfinder no genoma da amostra <i>K. pneumoniae</i> AMPK10.....	28
<b>Tabela 8</b> - Genes que conferem resistência adquiridas aos antibióticos encontrados pelo Resfinder no genoma da amostra <i>K. pneumoniae</i> AMPK5.....	29
<b>Tabela 9</b> - Valores da CIM das <i>E. coli</i> transconjugantes e transformantes para os três carbapenêmicos demonstrando a elevada capacidade de transferência do plasmídeo carreando o gene <i>bla</i> <sub>KPC-2</sub> .....	36

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	12
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	13
1.1 Resistência bacteriana e saúde pública .....	13
1.2 As bactérias Gram-negativas multirresistentes .....	14
1.3 A família Enterobacteriaceae .....	15
1.4 <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	15
1.5 Beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) .....	17
1.6 Mecanismos de resistência aos carbapenêmicos .....	18
1.7 <i>bla</i> <sub>KPC</sub> e sua propagação .....	21
<b>2. OBJETIVO GERAL</b> .....	24
2.1 Objetivos específicos .....	24
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	25
3.1 Isolados bacterianos .....	25
3.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima .....	25
3.3 Caracterização genotípica .....	27
3.4 Extração de DNA genômico dos isolados bacterianos .....	27
3.5 Detecção dos genes de resistência .....	27
3.6 Amplificação e sequenciamento do gene <i>mgrB</i> .....	14
3.7 Tipagem por macrorrestrição do DNA seguida de eletroforese em gel com campos pulsados (PFGE) .....	15
3.8 Determinação das linhagens bacterianas por <i>Multilocus Sequence Typing</i> (MLST) .....	16
3.9 Sequenciamento completo do genoma .....	17
3.10 Caracterização do ambiente genético do gene <i>bla</i> <sub>KPC-2</sub> .....	18
3.11 Experimento de conjugação .....	20
3.12 Preparo da células competentes .....	20
3.13 Transformação por choque térmico .....	20
3.14 Sequenciamento do plasmídeo .....	21
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	22
4.1 Características fenotípicas .....	22
4.1.1 Perfil de sensibilidade dos isolados .....	22
4.2 Características genotípicas .....	24

4.2.1 Detecções dos genes que codificam carbapenemases e outras beta-lactamases .....	24
4.2.2 Perfil de clonalidade das amostras e determinação das linhagens .....	25
4.2.3 Análises dos genomas.....	28
4.2.4 Análise do ambiente genético do gene <i>bla<sub>KPC</sub></i> .....	32
4.2.5 Caracterização do plasmídeo da amostra AMKP10.....	34
5. CONCLUSÕES .....	37
6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	38
ANEXO 1. Parecer do comitê de ética .....	54
ANEXO 2. Dados do parecer do comitê de ética .....	55

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Resistência bacteriana e saúde pública

O tratamento de infecções bacterianas foi alcançado com as primeiras descobertas e desenvolvimento de antibióticos. Contudo, com uso em excesso dos antibióticos, a constância de infecções bacterianas causadas por bactérias multirresistentes (MDR, do inglês *multidrug resistant*) atualmente representa um desafio relevante para a saúde pública mundial (SANTAJIT; INDRAWATTANA, 2016; JIANG L. et al., 2018). As infecções causadas por bactérias patogênicas acometem pessoas com o sistema imunológico comprometido e por procedimentos invasivos como, cirúrgicos, contatos entre os pacientes, profissionais de saúde, objetos contaminados, visitantes, e de fontes ambientais (SORNETTE et al., 2007; CABRAL PSJ. 2010). As bactérias multirresistentes por apresentarem uma plasticidade genética têm a capacidade de manter em diversos ambientes incluindo amostras ambientais OLIVERIA et al 2014; MUNITA JM. e ARIAS, A.C 2016; CERDEIRA et al 2017).

A multirresistência gera diversas consequências como: utilização de medicamentos mais tóxicos, aumento do tempo de hospitalização, necessidade de isolamento do paciente, aumento da frequência e da gravidade das infecções hospitalares, aumento do índice de mortalidade associada a este tipo de infecção e, por fim, aumento do custo do tratamento (MARQUES; ZUCCHI, 2006; MENEZES et al., 2006; TRAVERS; BARZA, 2002; MEVIUS et al., 1999; *Centers for Disease Control and Prevention* CDC, 2013) estimam que, pelo menos dois milhões de pessoas sejam infectadas por microrganismos multirresistentes por ano e que ocorra cerca de vinte e três mil mortes nos Estados Unidos em decorrência de infecções por microrganismos resistentes aos antibióticos de acordo com os *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC, 2013). Muitas espécies de bactérias têm sido responsáveis pelos elevados números de infecções hospitalares (SFAIR, et al., 2014; DIENSTMANN et al., 2010; KUNIN et al., 1990), principalmente bactérias da ordem Enterobacterales.

Para adaptação e preservação da espécie, algumas espécies de bactérias utilizam de estratégias para seu processo evolutivo incluindo mutações, aquisição de material genético móvel e alterações na expressão gênica, resultando em resistência aos antibióticos disponíveis (MUNITA, e ARIAS, 2016). O ambiente hospitalar tem proporcionado a seleção dessas linhagens bacterianas que apresentam um perfil de resistir aos antibióticos mais utilizados nos hospitais. O fenótipo multirresistente das populações microbianas hospitalares endêmicas, aliado ao sistema imunológico debilitado dos doentes e aos procedimentos invasivos a que estes estão sujeitos aumenta a dificuldade de tratamento das infecções, surgindo a necessidade de uma antibioticoterapia mais específica e eficaz.

## 1.2 As bactérias Gram-negativas multirresistentes

Nos últimos anos, as infecções causadas por bactérias Gram-negativas multirresistentes aumentaram drasticamente em todo mundo (EXNER et al., 2015). As principais Gram-negativas de importância médica incluem: *Acinetobacter* spp, *Bordetella pertussis*, *Campylobacter* spp, *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp; *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp, *Salmonella* spp; *Serratia marcescens*; *Shigella* spp; *Yersinia* spp. *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila*, *Neisseria* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, e *Vibrio cholerae*. (SILHAVY et al., 2010; GESUNDHEITSSCHUTZ, 2012). As infecções provocadas por esses patógenos tornaram-se um desafio principalmente em países e regiões em desenvolvimento e estão relacionadas a elevada taxa de mortalidade (SINGH e MANCHANDA, 2017).

Dentre as bactérias Gram-negativas da ordem Enterobacterales, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* são as principais espécies responsáveis por infecções relacionadas ao trato urinário, bacteremias e pneumonias. A capacidade adaptativa de linhagens produtoras de enzimas carbapenemases KPC, VIM, IMP e NDM são um problema de saúde pública, pois apresentam perfil genético que facilita propagação e são resistentes as principais classes de antibióticos utilizados na clínica (ANVISA 2013; DOI e PATERSON, 2015; LAVAGNOLI et al., 2017; DORTET et al., 2014; LOGAN e WEINSTEIN, 2017). Atualmente, o número de espécies que apresentam



esses mecanismos vem aumentando e levando a diversos casos de infecções comunitárias e adquiridas na saúde (LOGAN e WEINTEIN, 2017).

### **1.3 A família Enterobacteriaceae**

Bactérias da família Enterobacteriaceae são bacilos Gram-negativos, que apresentam muitas propriedades em comum (fermentam a glicose, são citocromo-oxidase negativa e reduzem nitrato a nitrito) e apresentam-se como indicadoras na emergência de linhagens com perfil de resistência aos antibióticos (YULISTIANI et al., 2016). Embora possam ser encontradas amplamente na natureza, a maioria habita o trato intestinal do homem e de outros animais, seja como membros da microbiota normal ou como agentes de infecção (MURRAY, 2004). A relação de comensalismo do hospedeiro com essas bactérias acontece até o momento que clones desses microrganismos ganham atributos de virulência específicos que permitem causar infecções.

### **1.4 *Klebsiella pneumoniae***

*K. pneumoniae* está incluída taxonomicamente na ordem Enterobacterales, família Enterobacteriaceae (ADEOLU et al., 2016). Apresenta-se como um patógeno oportunista comumente encontrado em distintos nichos ecológicos como trato intestinal dos animais sendo também encontrado em água de rios, lagoas e oceano, solo e esgoto (BAGLEY, 1985; NASCIMENTO et al., 2017; CDC 2018). *K. pneumoniae* é a segunda bactéria Gram-negativa associada a uma elevada taxa de infecções, como infecções do trato respiratório, do trato urinário, pneumonias, infecções intra-abdominal, meningites abscessos hepáticos e bacteremias (PODSCHUN e ULLMANN, U 1998; VADING, et al.,2018; NAVON-VENEZIA et al., 2017).

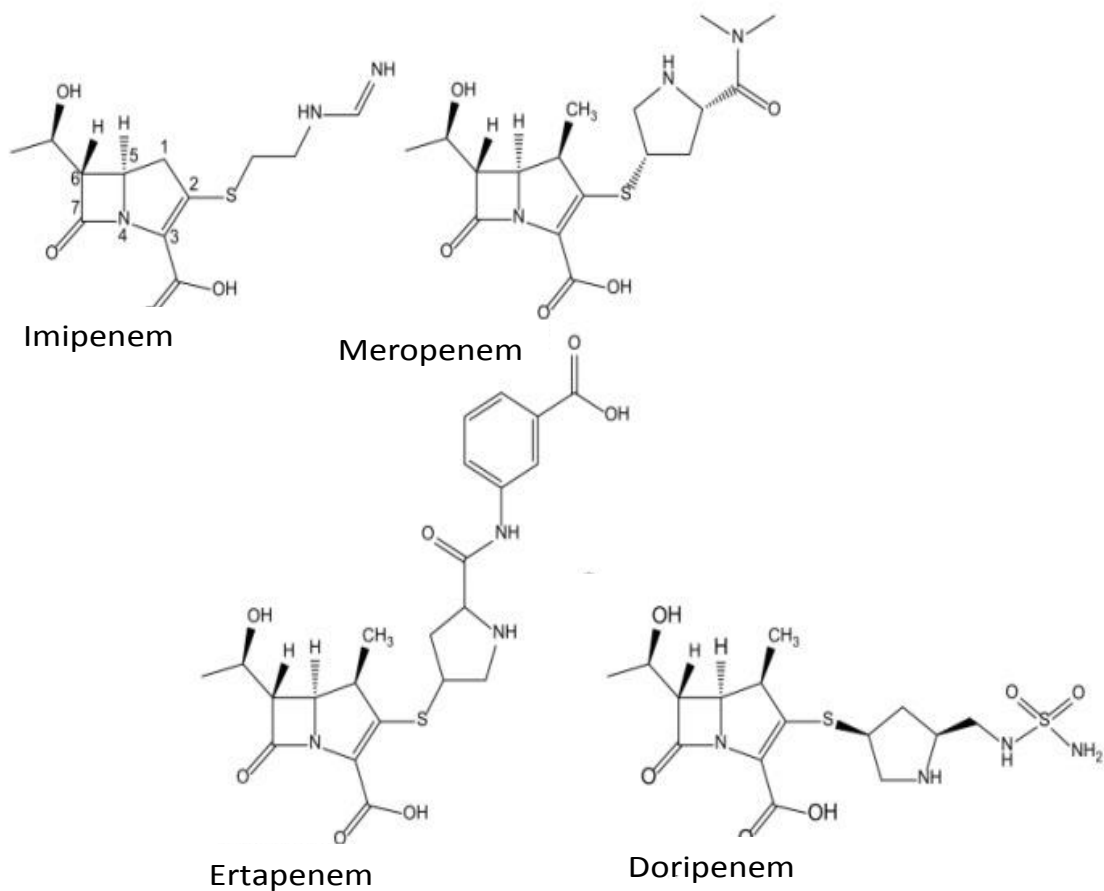
Monitorar a epidemiologia de *K. pneumoniae* principalmente em ambientes hospitalares é importante, uma vez que, a presença de algumas linhagens pode levar a casos de surtos e infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS). As linhagens provenientes de surtos hospitalares são identificadas pela técnica de MLST que fornece uma abordagem padronizada para caracterizar as relações genéticas entre

isolados bacterianos. Para isso, sequências de nucleotídeos de 7 loci que codificam genes constitutivos da espécie analisada são utilizados (DIANCOURT et al., 2005; MAIDEN, 2006). No Brasil, as principais linhagens descritas inclui ST11 que é disseminada em todo mundo e pertence ao complexo clonal CC 258, ainda assim, outros novos STs têm sido relatados em algumas regiões do país (ANDRADE et al., 2012; PEREIRA et al., 2013; FEHLBERG et al., 2012; NICOLETTI et al., 2015).

As penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas e carbapenêmicos estão entre os beta-lactâmicos comumente utilizados nos tratamentos de infecções bacterianas graves devido sua alta especificidade (ZENG e LIN, 2013; EDWARDS et al., 2018). O tratamento das infecções causadas por enterobactérias MDR envolve também outros antibióticos como as polimixinas, fosfomicina, tigeciclina, aminoglicosídeos e as combinações de beta-lactâmicos com inibidores de beta-lactamase como ceftazidima-avibactam e meropenem-vaborbactam (JACOBS et al., 2017; MARTEVA-PROEVSKA et al., 2018; JIANG et al., 2018).

Os carbapenêmicos são antibióticos beta-lactâmicos que têm ação bactericida e possuem um amplo espectro em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas como ilustrado na Figura 1. Atualmente os carbapenêmicos são utilizados na clínica como primeira e segunda escolha para tratar determinadas síndromes clínicas e grupos de pacientes graves causadas por bactérias multirresistentes (OMS, 2017).

De modo geral, os antibióticos beta-lactâmicos são hidrolisados por enzimas beta-lactamases, as quais, atuam no anel beta-lactâmico inativando a síntese da parede celular (WILLIAMS, 1999). As proteínas envolvidas na ligação dos beta-lactâmicos em *K. pneumoniae* ainda são pouco descritas, além disso, as estratégias que envolvem os eventos bioquímicos e genéticos são diferentes para cada beta-lactâmico (PAPP-WALLACE et al., 2011; SUTARIA et al., 2018).



**Figura 1-** Estrutura química dos principais carbapenêmicos utilizados na clínica. Fonte: JEON et al., (2015). **Modificado pela autora.**

### 1.5 Beta-lactamases de espectro estendido (ESBL)

*K. pneumoniae* apresenta uma elevada prevalência de resistência as cefalosporinas de terceira geração quando comparado com o segundo patógeno *E. coli* na lista do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC, 2013; VADING et al., 2018) especialmente por que algumas linhagens estão envolvidas com a disseminação de genes que codificam as enzimas beta-lactamases de espectro estendido (ESBL, do inglês, *Extended Spectrum  $\beta$ -betactamase*) (QUEENAN, e BUSH, 2007). A caracterização das linhagens resistentes aos beta-lactâmicos circulantes em ambientes hospitalares auxilia em medidas de tratamento.

Dentre os mecanismos de resistência aos beta-lactâmicos destaca-se a expressão de ESBL que conferem resistência a diversos antibióticos beta-lactâmicos, incluindo as penicilinas, cefalosporinas, e ao monobactâmico aztreonam (RUBIN e PITOUT, 2014; GARCÍA-HERNÁNDEZ et al.; 2011). Estas atuam clivando o anel beta-lactâmico destes antibióticos, deixando-os sem atividade terapêutica (LIVERMORE, 2008). Uma vez que o mecanismo de resistência é mediado por plasmídeos, facilmente ocorre a disseminação através da comunidade bacteriana.

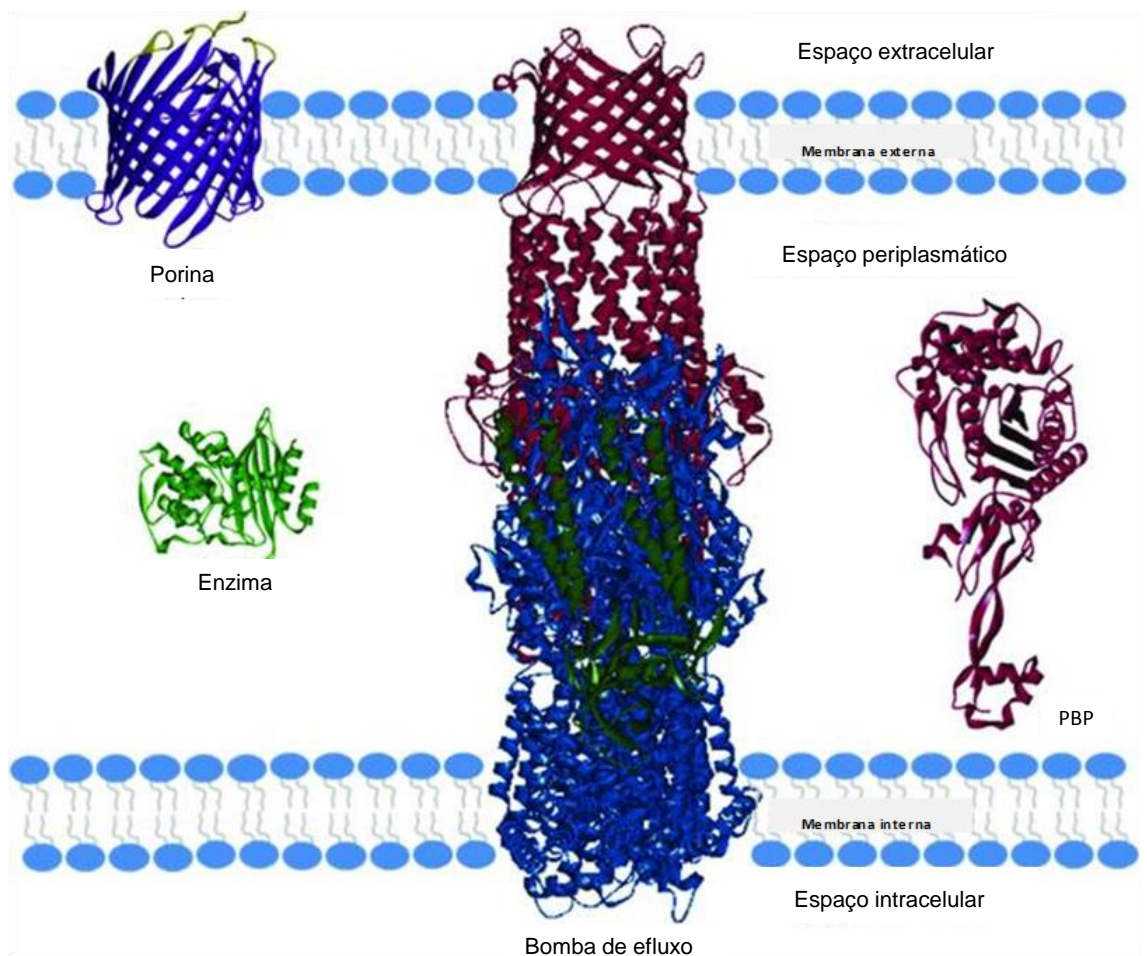
Atualmente, a classificação das ESBLs pode ser de acordo com suas características molecular e ou funcional. Ambler dividiu as beta-lactamases em quatro classes A, B, C, e D levando em consideração a homologia de proteínas e similaridade de aminoácidos sendo que, as classes A, C e D são as serino beta-lactamases e as enzimas da classe B são as metalo-beta-lactamases. (BUSH, JACOBY e MEDEIROS, 1995. Para os grupos funcionais 1, 2 e 3 a classificação dar-se pela perfis de substrato e inibidor BUSH, 2013).

No Brasil, há ampla disseminação de ESBL entre os membros da família Enterobacteriaceae como *K. pneumoniae* e *E. coli*, e as enzimas já reportadas em diferentes estados brasileiros são TEM, SHV, CTX-M, VEB, BES, GES, CTX-M-2, CTX-M-8 e CTX-M-9, estas últimas sendo relatadas não apenas em ambientes hospitalares, mas também em alimentos de origem animal (SILVA, 2012). No entanto, o aparecimento de bactérias como a presença das ESBL tem ocorrido com mais frequência em pacientes hospitalizados, com históricos de exposição a antibióticos e uso de cateteres (SFAIR et al., 2014).

### **1.6 Mecanismos de resistência aos carbapenêmicos**

Diferentes mecanismos estão envolvidos na resistência aos carbapenêmicos: mutações que podem alterar a expressão e função de porinas, presença de bombas de efluxo capazes de expulsar os antimicrobianos da célula bacteriana, e enzimas beta-lactamases que degradam os antimicrobianos da classe dos beta-lactâmicos (PAPP-WALLACE et al., 2011) (Figura 2). Distinguir os diferentes mecanismos de resistência existentes nas bactérias de um hospital ajuda na verificação da efetividade do controle

da disseminação destas bactérias (HAWKEY e LIVERMORE, 2012; JEON et al., 2015).



**Figura 2** - Principais componentes envolvidos nos mecanismos de resistência aos carbapenêmicos em bactérias Gram-negativas. Adaptada de PAPP-WALLACE et al., (2011). **Modificado pela autora**

Dentre as enzimas beta-lactamases que hidrolisam os antibióticos beta-lactâmicos, estão as enzimas carbapenemases serina e metalo-beta-lactamases que se apresentam como um mecanismo de resistência emergente, o que merece atenção pelo alto grau de disseminação entre as bactérias patogênicas presentes em ambientes hospitalares (RUBIN, et al.; 2014; HAWKEY e LIVERMORE, 2012; JEON, J. H. et al., 2015). As metalo-beta-lactamases (MBLs) apenas não degradam o monobactâmico aztreonam. Já as serina-beta-lactamases, em especial a *K. pneumoniae* carbapenemases (KPC) podem hidrolisar os carbapenêmicos (meropenem, ertapenem e imipenem),

bem como todos os beta-lactâmicos (HANES et al., 2009; KITCHEL et al., 2009; YONG et al., 2009; QUEENAN e BUSH, 2007; SMITH MOLAND et al., 2003; YIGIT, et al., 2001) (Tabela 1).

Atualmente, há presença de enzimas beta-lactamases como ESBL (SHV, TEM e CTX-M), MBLs (incluindo os tipos VIM, IPM e NDM) e serina-beta-lactamases (SME, IMI, NMC, GES e KPC) entre as espécies da família Enterobacteriaceae. (JACOBY, 2005; NORDMANN et al.; 2011; BUSCH, 2013; MUNITA e ARIAS, 2016)

**Tabela 1-** Principais características moleculares e funcionais das beta-lactamases.

Sítio ativo	Classe molecular	Grupo funcional	Subgrupos funcionais	Substratos	Perfil de inibidor		Enzimas
					CA	EDTA	
Serina	C	1	1	Cf	--	--	AmpC, CMY
			1e	Cf, Esc	--	--	GC1
	A	2	2a	Pn	+	--	PC1
			2b	Pn, Cf	+	--	TEM-1, SHV-1
			2be	Pn, Cf, Esc, M	+	--	CTX-M, ESBLs (TEM, SHV)
			2br	Pn	--	--	IRT, SHV-10
			2f	Pn, Cf, Cb, Esc, M	+/--	--	KPC, SME
			2de	Pn, Esc, M	+/--	--	OXA-11, OXA-15
	D	2d	2df	Pn, Cb	+/--	--	OXA-23, OXA-48
			3a	Pn, Cf, Cb, Esc	--	--	IMP, NDM, VIM
Metalo	B	3	3b	Cb	+	+	CphA

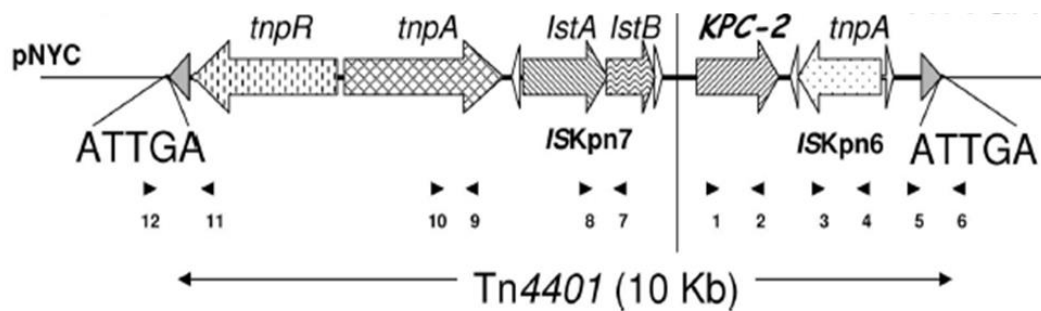
Cb, carbapenêmicos; Cf, cefalosporinas; CA, ácido clavulânico; EDTA, ácido etilendiamino tetraacético; Esc, cefalosporinas de espectro estendido; M, monobactâmicos; Pn, penicilinas. Fonte: KAREN BUSH, (2013). **Modificada pela autora.**

Dentre as carbapenemases mais encontradas estão as KPCs, serino-beta-lactamases classificadas como classe A de Ambler que são facilmente inibidas pelo ácido clavulânico (QUEENAN; BUSH 2007; NORDMANN, et al., 2010; ANVISA, 2013). No Brasil, as KPC têm sido relatadas desde 2005, com um surto em 2011, e inúmeros casos como estes posteriormente (PAVEZ et al., 2009; PEIRANO, et al., 2009; ZAVASCKI, et al., 2009; BEIRÃO, et al., 2011; CABRAL, et al., 2012; PEREIRA, et al., 2013; COTRIM, et al., 2012). Em 2011, 367 casos ocorridos em um hospital no Distrito Federal –DF foram notificados e houve 26 óbitos (SECRETARIA DO ESTADO DE SAÚDE DO DISTRITO FEDERAL, 2011; MIRANDA et al., 2019), sendo que 263 casos foram identificados na unidade de terapia intensiva (PEREIRA et al., 2013). A investigação e caracterização das enzimas beta-lactamases, em particular a enzima KPC, é significativo para viabilizar informações epidemiológicas para futuras medidas de controle relacionadas à assistência à saúde nas unidades hospitalares.

### 1.7 *bla*<sub>KPC</sub> e sua propagação

O gene *bla*<sub>KPC</sub> que codifica a enzima KPC apresenta diversas variantes descritas (MEHTA et al., 2015; JEON, et al., 2015). O gene variante *bla*<sub>KPC-2</sub> é o mais descrito em todo o mundo, principalmente relacionado à linhagem do CC258, bem adaptada ao ambiente hospitalar (MONTEIRO et al., 2009; FEHLBERG et al., 2012; MUNOZ-PRICE et al., 2013). O gene *bla*<sub>KPC-2</sub> propagado por distintas entrebaterias e vem sendo descrito em vários estados do Brasil (ANDRADE et al., 2011; TAVARES et al., 2015; SAMPAIO et al., 2016).

A disseminação do gene *bla*<sub>KPC-2</sub> é mediada por transposons e outros elementos genéticos móveis, na maioria das vezes contidos em plasmídeos conjugativos (PAVEZ et al., 2009; ZENG e LIN, 2013; BARANIAK, et al., 2016; BARANIAK, A et al., 2018). No entanto, a propagação do gene também pode ocorrer apenas através da propagação clonal. O gene *bla*<sub>KPC</sub> é bastante disseminado entre espécies da família Enterobacteriaceae principalmente em linhagens de *K. pneumoniae*, sendo comumente descrito no transposon Tn4401 (NAAS et al., 2008b; CUZON et al., 2011; MATHERS, STOESSER, et al., 2015; STOESSER et al., 2017). No entanto, algumas isoformas do Tn4401 sugere uma evolução desse transposon (Tabela 2).



**Figura 3** - Estrutura esquemática do transposon Tn4401. Fonte: NAAS et al., 2008

Os genes *bla*<sub>KPC</sub> tem sido encontrado também, mais recentemente, em elementos diferentes do Tn4401 (NTE<sub>KPC</sub>, do inglês non-Tn4401 Element carrying KPC) demonstrando a mobilização de diferentes sequências de inserções que o compõe (KITCHEL et al., 2010; CHEN et al., 2012; NAAS et al., 2012; CHEN et al., 2014; ARAUJO et al., 2018).

Visto que bactérias produtoras de carbapenemases apresentam poucas alternativas de tratamento, tem-se resgatado o uso de polimixinas. Com isso, linhagens de *K. pneumoniae* vêm sendo descritas com perfil de resistência as polimixinas também, limitando ainda mais as alternativas disponíveis. Existem vários mecanismos de resistência as polimixinas, mas todos resultam em modificações do lipopolissacarídeo (LPS) alterando a carga da membrana externa da bactéria culminando na repulsão do antibiótico (OLAITAN et al., 2014).



**Tabela 2** - Variantes do elemento Tn4401 carreando o gene *bla<sub>KPC</sub>*.

Transposon	Evolução genética	Número de acesso	Referência.
Tn4401a	Deleção de 99-bp upstream do <i>bla<sub>KPC</sub></i>	EU176011	(Naas <i>et al</i> 2008a)
Tn4401b	Sem deleção	EU176014	(Naas <i>et al</i> 2008a)
Tn4401c	Deleção de 215-bp upstream do <i>la<sub>KPC</sub></i>	DQ989640	None
Tn4401d	Deleção de 68-bp lastreiam do <i>bla<sub>KPC</sub></i>	HM769262	(Kitchel <i>et al</i> 2010)
Tn4401d	Isoforma do Tn4401b com <i>tnpA</i> e <i>bla<sub>KPC</sub></i> truncado e <i>ISKpn7</i> com deleção	JN974188	(Chen <i>et al</i> 2012)
Tn4401e	Deleção de 255-bp upstream do <i>bla<sub>KPC</sub></i>		(Kitchel <i>et al</i> 2009)
Tn4401f	Isoforma do Tn4401b com <i>tnpA</i> truncada <i>tnpR</i> deletada	JQ837276	(Bryant <i>et al</i> 2013)
Tn4401g	Isoforma do Tn4401b com <i>tnpA</i> truncada devido a uma sequência de inserção de 256-bp	KJ510411	(Chmelnitsky <i>et al</i> 2014)

Visto que pode haver uma relação entre linhagem de *K. pneumoniae* e plasmídeos/elementos geneticamente móveis para a rápida disseminação da resistência aos carbapenêmicos, foi de interesse identificar as linhagens de *K. pneumoniae* de infecções de pacientes internados no hospital Hospital e Pronto Socorro Dr. João Lúcio Pereira Machado em Manaus (AM), e avaliar os possíveis mecanismos de resistência aos carbapenêmicos, por meio de análises fenotípicas e seguida das análises genotípicas.

## 2. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do estudo foi determinar a ocorrência de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos e caracterizar fenotípica e molecular os mecanismos de resistência em isolados clínicos de diversos tipos de infecções de pacientes internados no período de janeiro a julho de 2015 no Hospital e Pronto Socorro Dr. João Lúcio Pereira Machado em Manaus, AM.

### 2.1 Objetivos específicos

- ✓ Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de tigeciclina, fosfomicina, polimixina B e colistina e aos carbapenêmicos (ertapenem, imipenem e meropenem);
- ✓ Detectar a presença de genes de resistência que codificam as principais carbapenemases (*bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>SPM</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>GIM</sub>, *bla*<sub>GES</sub>), as beta-lactamases de espectro ampliado (ESBL) (*bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> e *bla*<sub>CTX-M</sub>), e os genes relacionados com a resistência à polimixina B (*mcr-1*, *mcr-2* e *mgrB*);
- ✓ Verificar se houve disseminação clonal entre os pacientes do hospital e determinar a linhagem através do tipo de sequência (ST) de representantes de cada clone;
- ✓ Determinar o ambiente genético do gene *bla*<sub>KPC</sub>.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Isolados bacterianos

Um total de 40 isolados de *K. pneumoniae* foram obtidos junto ao laboratório clínico do Hospital e Pronto Socorro Dr. João Lúcio Pereira Machado, situado na cidade de Manaus (AM), no período de janeiro a julho de 2015. O hospital atende várias especialidades, com capacidade para 210 leitos e tem atendimento médio de 600 pacientes por mês. Pacientes de toda a região e de países como Venezuela, Peru e Colômbia também são atendidos neste hospital em Manaus. As amostras bacterianas foram coletadas de diversos espécimes clínicos (culturas de urina, úlcera de pressão, *swab* nasal; aspirado traqueal e hemocultura), isoladas, identificadas e caracterizadas quanto ao perfil de sensibilidade por meio do equipamento Vitek® (Biomérieux, França), utilizando o cartão AST-N239/REF 413 204 pelo laboratório clínico do hospital. Os isolados foram preservados em caldo infusão de cérebro e coração (BHI-do inglês *Brain Heart Infusion*) (Kasvi) com glicerol a 40% e congelados a -80°C no Laboratório de Epidemiologia e Microbiologia Molecular (LEMiMo) do Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo (IFSC/USP) em São Carlos-SP.

Este projeto foi submetido ao comitê de ética em pesquisa (CEP), por meio da plataforma Brasil e foi aprovado pelo CEP da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), com número do CAAE: 49923215.5.0000.5504 e parecer final número: 1.295.545.

#### 3.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima

As concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos antibióticos polimixina B (PB) (Sigma-Aldrich, Co., St Louis, EUA), colistina (CL) (Sigma-aldrich), tigeciclina (TGC) (Pfizer, EUA), ertapenem sódica (ERT) (Invanzs-Merck Sharp & Dohme Farmacêutica LTDA, Brasil), imipenem (IMI) (Goldbio Biotechnology, St. Louis, EUA), meropenem (MER) (ABL antibióticos do Brasil, Brasil) foram determinadas pelo método de microdiluição em caldo segundo o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI 2015).

Já CIM da fosfomicina (FOS) (Sigma-Aldrich) foi realizada por diluição em ágar utilizando metodologia descrita no CLSI (2015). *Escherichia coli* ATCC BAA-25922 foi cedida pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e usada como controle de qualidade. As amostras clínicas de *K. pneumoniae* foram inoculadas em meio caldo cérebro e coração (BHI) acrescido de ágar (ágar BHI) e incubadas a 36 °C por 24 h. Uma colônia de cada amostra foi inoculada em 10 ml de caldo BHI a 36°C por 18 h. A suspensão bacteriana de todos os isolados foi ajustada em solução fisiológica a 0,85% até obter a escala de 0,5 de McFarland no equipamento Densimat (Biomérieux, França). Em seguida, uma diluição 1:10 foi realizada obtendo uma concentração de  $1,5 \times 10^7$  UFC/ml. A partir dessa diluição, 5µL da suspensão bacteriana foram inoculados nos poços de placa de 96 poços contendo 100µl de solução com os respectivos antibióticos.

As diluições variaram para cada antibiótico como descrito abaixo: para CL e PB as concentrações testadas foram de 0,015 µg/ml a 256 µg/ml, em diluições de 1:2 e um poço sem antibiótico. Os resultados foram interpretados usando os parâmetros de ponto de corte do CLSI (2017). Para tigeciclina, as concentrações testadas foram de 0,015 µg/ml a 16 µg/ml, em diluições 1:2 e um poço sem antibiótico. A leitura da DO<sub>600</sub> foi realizada no equipamento de Spectramax M5 (Molecular Devices, California). Os valores da leitura foram calculados de acordo com orientação do CLSI (2018).

Para o antibiótico FOS, a CIM foi determinada por microdiluição em Ágar Müeller Hinton (MH) enriquecido com 25 µg/ml de glicose-6-fosfato (G6P, Sigma-Aldrich), segundo o recomendado em CLSI (2015). As amostras clínicas de *K. pneumoniae* foram inoculadas e ajustadas como descrito anteriormente, até a concentração de  $1,5 \times 10^7$  UFC/ml. A partir dessa diluição, 2 µL da suspensão bacteriana foram inoculados sobre o meio ágar MH enriquecido com G6P, com as concentrações apropriadas do antibiótico em cada placa. Neste caso, foram utilizadas as concentrações de 0,01 µg/ml a 512 µg/ml de antimicrobiano e controle positivo em placa sem antibiótico. Como controle de qualidade do experimento foram utilizadas as linhagens *Staphylococcus aureus* ATCC29213 e *E. coli* ATCC25922. Os resultados foram interpretados usando os parâmetros de ponto de corte do (CLSI 2017).

### 3.3 Caracterização genotípica

Testes moleculares foram realizados para observar o perfil de clonalidade dos isolados bacterianos por meio da técnica *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE), para verificar a disseminação de linhagens neste hospital e o tipo sequência foi determinado via *Multilocus Sequence Typing* (MLST). Os genes de ESBL e carbapenemases presentes em cada isolado foram detectados e caracterizados por meio de PCR convencional. Além disso, com o sequenciamento genômico foi possível analisar o ambiente genético do gene *bla<sub>KPC</sub>* e com isso, verificou-se o tamanho do plasmídeo juntamente com seu grupo de incompatibilidade envolvido na disseminação do gene entre os isolados do hospital e detalhes de cada experimento está descrito a seguir.

### 3.4 Extração de DNA genômico dos isolados bacterianos

A extração do DNA genômico foi realizada por lise mecânica através de metodologia descrita por PALAZZO et al., (2006). As bactérias foram cultivadas por 18 h a 37°C em tubos de plásticos cônicos de 15 ml com tampa contendo 10 mL de caldo BHI. A suspensão bacteriana foi centrifugada, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi lavado com 10 mL de solução fisiológica. Após uma nova centrifugação o sobrenadante foi desprezado e o precipitado suspenso em tampão de extração TED (Tris-HCl 0,5 M, NaCl 3,76%, EDTA 0,5 M; SDS 0,75%). Em seguida, adicionou-se pérolas de vidro de 1 mm de diâmetro tratadas previamente com ácido nítrico 50%, homogeneizou-se por agitador e adicionou-se fenol-clorofórmio seguido de isopropanol para purificação. Os DNAs extraídos foram quantificados analisando a relação da razão entre 280/260 no equipamento NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific Co., Waltham, Massachusetts EUA), e uma razão entre 1,8 a 2,2 foi considerado aceitável.

### 3.5 Detecção dos genes de resistência

A presença dos genes investigados neste estudo foi verificada através de PCR com *primers* descritos por MONSTEIN et al.; 2007; POIREL et al., 2011 (Tabela 3),

no termociclador modelo S1000™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Califórnia, EUA). Para amplificação dos genes das carbapenemases (*bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>IMP</sub>* e *bla<sub>OXA-48</sub>*) foi utilizado uma reação com volume final de 50 µl contendo as concentrações finais de 1x solução tampão de PCR, cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>) 1,5 mM, dNTPs 200 µM de cada, 0,5 µM de cada primer, 200 ng de DNA; 2 U de Taq DNA Polymerase de *Thermus aquaticus* recombinant, expressada em *Escherichia coli* (Sigma-Aldrich, Co., St Louis, EUA) e água ultrapura autoclavada. As condições da reação foram: desnaturação inicial 95 °C por 5 minutos, 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos; anelamento de 50 °C por 40 segundos, extensão 72 °C por 50 segundos e extensão final de 72 °C, por 5 minutos. Para os genes de ESBL (*bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>* e *bla<sub>CTX-M</sub>*) a reação continha: solução tampão de PCR 10 1X, 4 mM de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>), dNTPs 200 µM de cada, 0,5 µM de cada primer, 100 ng de DNA; 2 U de Taq DNA polimerase (Sigma-Aldrich), e água ultrapura autoclavada. A etapa de desnaturação inicial foi a 94 °C por 5 minutos; seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto; anelamento de 60 °C por 30 segundos, extensão de 72 °C por 1 minuto e uma extensão final de 72 °C por 10 minutos. Em todas as reações foi utilizada água como controle negativo e DNA genômico das linhagens descritas na Tabela 4 foram utilizados como controle positivo das reações de PCR.

O produto amplificado foi corado com Hydragreen™ (Sinapse Inc., São Paulo, Brasil), adicionado BlueJuice™ Gel Loading Buffer (Invitrogen, Brasil) e verificado em gel de agarose 1% (Sigma-Aldrich, Co., St Louis, EUA) contendo TAE 1X após a corrida de eletroforese a 100 V por 40 minutos em cuba de eletroforese modelo *Sub-Cell* GT (Bio-Rad Laboratories, Califórnia, EUA) e fonte de eletroforese *PowerPac*™ HC. Os tamanhos das bandas obtidas foram comparados com padrão de peso molecular 100 pb (New england *BioLabs*® Inc.). O gel foi visualizado no fotodocumentador ChemiDoc XRS™ (Bio-Rad Laboratories).

A reação para detecção dos genes *mcr-1* e *mcr-2*, que conferem resistência a polimixina, foi realizada com volume final de 50 µl contendo solução tampão de PCR 1x (100 mM Tris-HCl pH 8,3, HCl 500 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>), 0,2 µM dNTPs, 0,3 µM de cada primer, 100 ng de DNA; 0,625U de Taq DNA polimerase (Sigma-Aldrich,) e água ultrapura autoclavada. As condições foram nas seguintes condições: desnaturação inicial 94 °C por 2 minutos; 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto; anelamento de 55 °C por 30 segundos, extensão de 72 °C por 1 minuto e

extensão final de 72 °C por 10 minutos. O produto amplificado foi corado com Hydragreen™ (Sinapse Inc), adicionado BlueJuice™ Gel Loading Buffer (Invitrogen), e verificado em gel de agarose 1% contendo tampão TAE 1X a 90 V por 40 minutos usando os mesmos equipamentos descritos. As bandas obtidas foram comparadas com o peso molecular 100 pb (New england (*BioLabs*®*Inc*)). O gel foi visualizado no fotodocumentador ChemiDoc XRS™ (Bio-Rad Laboratories), utilizando o programa ImageLab.

**Tabela 3** - Sequências de primers utilizados para amplificação do novo ambiente genético que abriga o gene *bla*<sub>KPC-2</sub> no plasmídeo pAMKP10.

Genes	Sequência (5´-3´) F/R	Fragmentos (pb)	Referências
<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	GGAATAGAGTGGCTTAAAYTCTC GGTTTAAAYAAAACAACCACC	232	(POIREL, L <i>et al.</i> ,2011); (Hong <i>et al.</i> ,2015)
<i>bla</i> <sub>SPM</sub>	AAAATCTGGGTACGCAAACG ACATTATCCGCTGGAACAGG	271	(POIREL, L <i>et al.</i> ,2011); (Toleman <i>et al.</i> ,2002)
<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	GATGGTGTGGTTCGCATA CGAATGCGCAGCACCAG	390	(POIREL, L <i>et al.</i> ,2011); (Hong <i>et al.</i> ,2015)
<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC CGGAATGGCTCATCACGATC	621	(POIREL, L <i>et al.</i> ,2011); (Yong <i>et al.</i> ,2009)
<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG CTTGTCATCCTTGTTAGGCG 232	798	(POIREL, L <i>et al.</i> ,2011); (YIGIT H <i>et al.</i> ,2001)
<i>bla</i> <sub>OXA</sub>	GCGTGGTTAAGGATGAACAC CATCAAGTTCAACCCAACCG	438	(POIREL, L <i>et al.</i> ,2011); (Andrade <i>et al.</i> ,2010)
<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	ATGCGTTATATTCGCCTGTG TGCTTTGTTATTCGGGCCAA	747	(MONSTEIN <i>et al.</i> ,2007)
<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	TCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGA ACGCTCACCGGCTCCAGATTTAT	445	(MONSTEIN <i>et al.</i> ,2007)
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC TGGGTRAARTARGTSACCAGAAYCAGCGG	593	(MONSTEIN <i>et al.</i> ,2007)
<i>mcr</i> -1	CGGTCAGTCCGTTTGTTTC CTTGGTCGGTCTGTAGGG	309	(LIU <i>et al.</i> ,2016)
<i>mcr</i> -2	TGGTACAGCCCCTTTATT TGTTGCTTGTGCCGATTGGA	567pb	Esse estudo
<i>MgrB</i>	GGATAGCACGGCCTTCTTAA AAGGCGTTCATTCTACCACC	253	(POIREL, L <i>et al.</i> ,2015)

Fonte: elaborada pela autora



**Tabela 4** - Linhagens utilizadas como controle positivo nas reações de PCR.

Linhagens controles	Gene	Classe molecular	Referências
<i>K. pneumoniae</i> ATCC® BAA-1705 <sup>4</sup>	<i>bla<sub>KPC</sub></i>	A	*CDC, 2009
<i>K. pneumoniae</i> 462 <sup>1</sup>	<i>bla<sub>NDM-1</sub></i>	B	(YONG D. et al.,2009);
<i>P. aeruginosa</i> 179 <sup>1</sup>	<i>bla<sub>VIM-1</sub></i>	B	(LAURETTI L, et al.,1990)
<i>P. aeruginosa</i> 168 <sup>1</sup>	<i>bla<sub>IMP-1</sub></i>	B	(WATANABE, et al.,1991);
<i>P. aeruginosa</i> 530 <sup>1</sup>	<i>bla<sub>SPM-1</sub></i>	A	(TOLEMAN MA, et al.,2002)
<i>K. pneumoniae</i> JF06 <sup>2</sup>	<i>bla<sub>SHV-5</sub></i>	A	(MINARINI, et al.,2009)
<i>K. pneumoniae</i> 110 <sup>2</sup>	<i>bla<sub>TEM/SHV</sub></i>	A	(MINARINI, et al.,2008)
<i>E. coli</i> IAL45 <sup>2</sup>	<i>bla<sub>CTX-M2</sub></i>	A	(ANDRADE, et al.,2010)
<i>K. pneumoniae</i> 283 <sup>1</sup>	<i>bla<sub>OXA-48</sub></i>	D	(POIREL, L et al.,2004)
<i>E. coli</i> 72H <sup>3</sup>	<i>mcr-1</i>	-	(LIU, YY et al. 2016)
<i>E. coli</i> DH5α	<i>mcr-2</i>	-	Este estudo

<sup>1</sup>Profª Drª. Ana C. Gales do Laboratório Especial de Microbiologia Clínica (LEMC), da Escola Paulista de Medicina-EPM da Universidade Federal de São Paulo-UNIFESP

<sup>2</sup>Profª Drª. Ana Lúcia da Costa Darini da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP

<sup>3</sup>Profº. Nilton Erbet Lincopan Huenuma do Instituto de Ciências Biomédicas/USP

<sup>4</sup>Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde-INCQS da Fundação Oswaldo Cruz-FIOCRUZ

Fonte: elaborada pela autora

### 3.6 Amplificação e sequenciamento do gene *mgrB*

O gene *mgrB* foi amplificado por PCR com *primers* descritos por POIREL, L et al. (2015), no termociclador S1000 Thermal Cycler da (Bio-Rad Laboratories). Foi utilizada reação com volume final de 50 µl contendo as concentrações finais de 1x solução tampão de PCR, cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>) a 1,5 mM, dNTPs a 200 µM de cada, 0,2 µM de cada primer, 100 ng de DNA; 2 U de Taq DNA Polymerase de *Thermus aquaticus* recombinante, expressa em *Escherichia coli* (Sigma-Aldrich), e água ultrapura autoclavada. O DNA genômico da linhagem *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705 foi utilizado como controle positivo para o gene intacto, e como controle negativo foi utilizada água. As condições da reação inseridas foram: desnaturação inicial 94 °C por 2 minutos, incluindo 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos; anelamento de 55 °C por 30 segundos, extensão 72 °C por 2 segundos e

extensão final de 72 °C por 10 minutos. O produto amplificado foi verificado em gel de agarose 1% (Sigma-Aldrich) corado com o corante *SyberSafe* (Invitrogen, Brasil) em TAE 1X, após eletroforese a 90 V por 45 minutos, utilizando como controle de peso molecular o marcador 100 pb DNA Ladder (New England *BioLabs*). O gel foi visualizado no equipamento fotodocumentador ChemiDoc XRS (Bio-Rad Laboratories), utilizando o programa ImageLab. O produto de PCR foi purificado utilizando o Kit *GeneJET purification* (Thermo-Scientific, Waltham, EUA) de acordo com protocolo descrito pelo fabricante, e quantificado no espectrofotômetro NanoDrop ND-2000c (Nanodrop Technologies). Reação com concentração final de 3,2 µM de cada primer, 20 ng de DNA purificado e água ultrapura autoclavada foi encaminhada para sequenciamento pelo método de Sanger no equipamento *Applied Biosystems® 3130 Genetic analyzer* (Life *Tecnhnologies*, Carlsbad, EUA) realizado no Laboratório de Biofísica Molecular “Sérgio Mascarenhas” do Instituto de Física de São Carlos (IFSC-USP). As sequências foram analisadas no programa *Vector NTI Advance 11.0* (Life *Tecnhnologies* Carlsbad EUA).

### **3.7 Tipagem por macrorrestrição do DNA seguida de eletroforese em gel com campos pulsados (PFGE)**

Para verificação da similaridade genética dos 40 isolados clínicos foi utilizada a metodologia de macrorrestrição do DNA genômico separado por e PFGE e preconizada pelo *CDC* (<https://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/pfge.html>). A endonuclease de restrição *XbaI* (New England *BioLabs*, Ipswich, Massachusetts, EUA) foi utilizada para a macrorrestrição do DNA e eletroforese foi realizada no equipamento *Chef Mapper™* (Bio-Rad Laboratories, California, EUA). Os géis foram corados com *SyberSafe* (Invitrogen) 0,1% por 60 minutos e posteriormente revelados no fotodocumentador ChemiDoc XRS™ (Bio-Rad Laboratories). A similaridade genética foi analisada no *software BioNumerics* versão 7.6 (Applied Maths NV, Bélgica) adotando o coeficiente de *Dice* com otimização de 0,5% e tolerância de 1,25%, pelo método de *Unweighted Pair-Group Method Arithmetic Averages* (UPGMA), que consiste na utilização de médias não ponderadas das medidas de

dissimilaridade. Os fragmentos gerados pela restrição que apresentaram até 80% de similaridade foram considerados do mesmo pulstotipo baseado em TENOVER et. al. (1995).

### **3.8 Determinação das linhagens bacterianas por *Multilocus Sequence Typing* (MLST)**

Representantes do pulstotipo prevalente e outros escolhidos aleatoriamente, totalizando 11 isolados, foram submetidos a tipagem por MLST para identificar as linhagens presentes neste hospital e determinação de seus complexos clonais (CCs). A técnica de MLST consiste em análise do sequenciamento dos fragmentos de 7 genes *housekeeping* de *K. pneumoniae* (*rpoB* (*beta-subunit of RNA polymerase*), *gapA* (*glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*), *mdh* (*malate dehydrogenase*), *pgi* (*phosphoglucose isomerase*); *phoE* (*phosphorine E*), *infB* (*translation initiation factor 2*) e *tonB* (*periplasmic energy transducer*)) segundo DIANCOURT et al. (2005). Os genes foram amplificados por PCR e como controle positivo foi utilizado o DNA genômico da linhagem *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705 e controle negativo, água. A reação final de 50 µl continha solução de tampão 1X para PCR, 0,2 mM de cada dNTP; 0,2 µM de cada primer (Tabela 1); 100 ng de DNA; 2,5 U de TransStart® FastPfu DNA Polymerase (Transgen Biotech, Beijing, China) e água ultrapura autoclavada. As seguintes condições foram usadas no termociclador S1000TM *Thermal Cycle* (Bio-Rad Laboratories): desnaturação inicial 95 °C por 2 minutos; seguido de 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 1 minuto; anelamento de 60 °C por 1 minuto, extensão de 72 °C por 1 minuto e extensão final de 72 °C por 5 minutos.

O produto amplificado foi verificado em gel de agarose 1,5% (Sigma-Aldrich, Co., St Louis, USA), corado com o corante *SyberSafe* (Invitrogen) em TAE 1X, após eletroforese a 110 V por 50 minutos contendo como controle de peso molecular 100 pb DNA Ladder (New England *BioLabs*). O gel foi visualizado no equipamento fotodocumentador ChemiDoc XRS (Bio-Rad *Laboratories*), utilizando o programa ImageLab. O produto de PCR foi purificado utilizando o Kit *GeneJET purification* (Thermo-Scientific, EUA) de acordo com protocolo descrito pelo fabricante, e quantificado no espectrofotômetro NanoDrop ND-2000c (Nanodrop *Technologies*). Uma alíquota de 3,2 µM de cada primer, 20 ng de DNA purificado e água ultrapura

autoclavada foi encaminhada para sequenciamento pelo método de Sanger no equipamento *Applied Biosystems*® 3130 *Genetic analyzer* (*Life Technologies*, Carlsbad, EUA) realizado no Laboratório de Biofísica Molecular “Sérgio Mascarenhas” do Instituto de Física de São Carlos (IFSC-USP). As sequências foram analisadas no programa *Vector NTI Advance* 11.0 (*Life Technologies* Carlsbad, EUA) e posteriormente foram comparadas com as sequências de *K. pneumoniae* disponíveis no banco de dados do Instituto Pasteur (<http://pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>), a partir do qual obteve-se o perfil alélico de cada linhagem, definindo seus ST's. O conjunto dos ST's obtidos foi analisado juntamente com todos registrados no banco de dados pelo programa eBURST version V3 (<http://eburst.mlst.net/>), que permitiu definir o CC de cada linhagem.

### 3.9 Sequenciamento completo do genoma

Os isolados *K. pneumoniae* AMKP5 e AMKP10 foram selecionados para o sequenciamento genômico utilizando a plataforma MiSeq (Illumina, EUA). AMKP10 foi escolhido por possuir o gene *bla<sub>KPC</sub>* em outro elemento genético que não o Tn4401. AMKP5 foi sequenciada por apresentar resistência aos carbapenêmicos e não apresentar os genes de resistência. DNA genômico foi extraído utilizando o Kit DNeasy® Blood & Tissue (Qiagen, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante, exceto por ter sido eluído em água no final. A qualidade do DNA foi verificada em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X, a 90 V por 40 minutos. A razão de absorvância 260/280 nm foi quantificada em NanoDrop 2000c (*Nanodrop Technologies*) e no equipamento Qubit (Thermo-Fisher *Scientific*, EUA). Amostras de DNA total foram encaminhadas ao Centro de Genômica Funcional da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" ESALQ/USP para o preparado das bibliotecas utilizando o Kit Nextera XT (Illumina, EUA) e sequenciamento. Os *reads* obtidos foram alinhados para formação dos *contigs* no programa *CLC Genomics Workbench* v.10.1.1 (Qiagen, Dinamarca) e a anotação foi feita no *NBCI Prokaryotic Annotation Pipeline* (PGAP) ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation\\_prok/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_prok/)). Os genes de resistência foram investigados utilizando Resfinder 3.0 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>) e os grupos de incompatibilidade pelo PlasmidFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>).

### 3.10 Caracterização do ambiente genético do gene *bla<sub>KPC-2</sub>*

Primeiramente, foi investigado o ambiente genético Tn4401 do gene *bla<sub>KPC</sub>* nas seis amostras clínicas resistentes aos carbapenêmicos por PCR, como descrito por NAAS et al. (2008). Uma vez que o ambiente genético encontrado foi diferente do Tn4401 (NTE<sub>KPC</sub>), o genoma da AMKP10 foi sequenciado e, a partir da sequência do NTE<sub>KPC</sub> encontrado desenhou-se *primers* (Tabela 5) para investigar a sua presença por PCR nas outras amostras clínicas. O DNA genômico do isolado clínico *K. pneumoniae* AMKP10 foi usado como controle positivo nas reações de PCR. A reação continha um volume final de 25 µl contendo 1x solução tampão de PCR (MgCl<sub>2</sub>+free), dNTPs a 0,2 mM cada, 1,5 mM de Mg<sup>2+</sup> 0,4 µM de cada primer, 100 ng de DNA; 0,25 U de DNA polimerase Taq (Sinapse Inc., Brasil) e água ultrapura autoclavada. As reações foram submetidas às seguintes condições no termociclador modelo S1000TM Thermal Cycler da (Bio-Rad Laboratories): desnaturação inicial a 94 °C por 3 minutos; seguida por 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento de 60 °C por 30 segundos, extensão de 72 °C por 1 minuto e uma extensão final de 72 °C por 10 minutos. Os produtos amplificados foram verificados em gel de agarose 1% (Sigma-Aldrich) corado com SyberSafe (Invitrogen), utilizado e BlueJuice™ Gel Loading Buffer 6x (Invitrogen) como tampão de carregamento das amostras. A eletroforese foi realizada em cuba Sub-Cell GT (Bio-Rad Laboratories) e fonte de eletroforese PowerPac™ HC contendo tampão TAE 1X, a 110 V, por 50 minutos. Foi utilizado como padrão de peso molecular Long Range DNA Ladder (Jena Bioscience, Alemanha).

**Tabela 5** - Sequências de primers utilizados para amplificação do novo ambiente genético que abriga o gene *bla<sub>KPC-2</sub>* no plasmídeo pAMKP10.

<i>Primers</i>	Sequência (5´-3´)	Temperatura (°C)	Fragmentos (pb)	Posição
P1	GCT GAC CGG GAT TGA AAC CAT GAC	60,3	187	11202 - 11225
P2	AAT GCA ATT CGT CCT CGG CCG			11369.-11389
P3	GAG GCG AAT GGC GTA TCT GTG AG	60,1	285	12180.-12202
P4	GTC AAC GGG CAG TAA GGC TCT G			12444.-.12465
P5	CTA GAC GGC GAT ACA GTG ACA TCA ACG	60,4	322	13311.-.13337
P6	ACCAGCCGGGTCTTGACATATAGG	60	167	13610 - .13633
P7	GCT GTG CAG TGC CTG GG			14571.-.14587
P8	TCT TGA AGA CGA AAG GGC CTC GT	60,4	209	14716..14738
P9	CCC GCG CAT AAC CAA AAA TTC GCA TA			14716.-.14738
P10	GTG GTC AGA AAA TCG ACG GGC AT	59,7	283	15247.-.15272
P11	GCA CTG GGC CTG GTC ACT AA			15434.-.15456
P12	TGA TAG TTC TCG GGG TTT GAG GGC	60,7	1151	18203.-.18222
P13	CGG CAC GAC AGC AAA CTT ATG TAG CAT AA			19462.-.19490
P14	TAT GTT CGA GCT GGC CGA CAA C	60,4	191	20592.-.20613
P15	TCATTTGTTCTGATGGTGTAATGCCCCAT			20592.-.20613
P16	CCG GGC TGA ATA TCC ATT GCG G	62,6	5923	20592.-.20613
P17	GTGGCTCTGGTCATTATCAGGACTC			21756.-.21780
P18	GTGGGAATGGCGGCATAGTAAATAAAG	62,6	7044	27653.-.27679
P19	GCCGAGTAAACACTGAGGCAAC			28358.-.28379
P20	CCAGTTAATCCCACTCTACTTTCTCACTC	63,5	5208	35374.-.35402
P21	CCTCAGTTCATTTTCATAGCTCTGCTGATC			36805.-.36833
P22	ATCCGAGTCGAGAGAGCGCATG	62,5	4868	41992.-.42013)
P23	GAGGATTTACGTTTGACCCGGTATTC			43448.-.43473
P24	CGCACGCCTTGATGACTTCACATAC	64, 04	4052	48292.-.48316
P25	CTCTGGCTCAACTTCCATTGGCA			71.-.93
P26	AAGACGGTGTAATCAAACGTAAAGCC			4097.-.4123
c42_início	GCT GGA GGT GCT GGA ACT GC	60,5	1817	6464.-.6483
c42_final2	TTC TAG GGG AGC CCG CAG AAT			4666.-.4686
c42_Tn3_i1	AAACCAAGCTGTACGTGCCGC	63,5	718	5309.-.5329
c42_Tn3_i2	CATCCAGCGGGGTGATTTTCAGC			6005.-.6027
c42_Tn3_e1	CGCCCTTATCTGAAACCACCAG	62,2	4694	3888.-.3909
c42_Tn3_e2	AAGGTCTGAAAAGCCCCGC			8562.-.8582
<i>bla<sub>KPC</sub></i>	CGT CTA GTT CTG CTG TCTT CTT GTC ATC CTT GTT AGG CG	55	798	Poirel, <i>et al.</i> 2011

Fonte: elaborada pela autora

### 3.11 Experimento de conjugação

A capacidade de transferência dos plasmídeos contendo *bla*<sub>KPC-2</sub> presentes nas linhagens resistentes aos carbapenêmicos (AMKP1, AMKP3, AMKP4, AMKP7 e AMKP10) foi verificada por conjugação em caldo descrito por (WOODALL, 2003) utilizando *E. coli* J53 resistente a azida sódica. Os transconjugantes foram selecionados em ágar LB contendo 62,5 mg/L de azida sódica e 4 mg/L de imipenem. Nos casos onde o processo de conjugação não foi bem-sucedido, optou-se por realizar a transformação de seus plasmídeos contendo o gene *bla*<sub>KPC-2</sub> em células *E. coli* DH5 $\alpha$  quimicompetentes. Os transformantes foram selecionados em ágar LB contendo 4 mg/L de imipenem.

### 3.12 Preparo da células competentes

A linhagem *E. coli* DH5 $\alpha$  foi inoculada em caldo LB e incubada por 18 h. Posteriormente, uma alíquota de 2,5 ml do pré-inóculo foi adicionada 250 ml de caldo LB e incubado a 37 °C em banho-maria com agitação até atingir a DO<sub>600</sub> = 0,5. Em seguida, o volume foi resfriado em gelo por 30 minutos, centrifugado e as células foram suspensas em solução 100 mM de CaCl<sub>2</sub> com 10% de glicerol. Os tubos foram incubados em gelo por 30 minutos e homogeneizado a cada 5 minutos. Após o período de incubação as células foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 2,5 mL de solução de CaCl<sub>2</sub> 100 mM com 10 % de glicerol. As células foram armazenadas em microtubos no freezer a -80 °C.

### 3.13 Transformação por choque térmico

A transformação das células foi realizada por choque térmico. Após descongelar as células em gelo os plasmídeos da AMKP7 e AMKP9 foram adicionados em células competentes e misturados gentilmente. Incubou-se em gelo por 15 minutos, seguido de aquecimento a 42 °C por 2 minutos e novamente mantido em gelo por mais 2 minutos. Posteriormente, o conteúdo foi adicionado ao caldo BHI e

foi incubado com agitação em banho-maria a 37 °C por 45 minutos. Após período de incubação, uma alíquota foi inoculada em placa contendo LB e imipenem 4 mg/L.

### 3.14 Sequenciamento do plasmídeo

Após o sequenciamento do genoma completo de *K. pneumoniae* AMKP10 verificou-se que um dos *contigs* (Contig 42) apresentava a sequência do plasmídeo contendo o gene *bla*<sub>KPC-2</sub>, porém a sequência não estava completa, impossibilitando sua circularização. Portanto, primers foram desenhados a partir das sequências que flanqueavam o Contig 42 para tentar identificar a sequência faltante utilizando sequenciamento Sanger.

Plasmídeos do transconjugante pAMKP10 foram extraídos utilizando o kit Fast-n-Easy Plasmid Mini-Prep Kit (Cellco Biotec, Brasil). O DNA extraído foi quantificado e sua pureza verificada através da razão de absorbância a 260 e 280 nm confirmada no espectrofotômetro NanoDrop 2000c (Nanodrop Technologies). O produto de PCR foi purificado utilizando o Gene JET Purification Kit (Thermo-Scientific) de acordo com protocolo descrito pelo fabricante, e quantificado no espectrofotômetro NanoDrop 2000c (Nanodrop *Technologies*, país). Uma alíquota de 3,2 µM de cada primer (c42\_início e c42\_final) descrito na Tabela 3, 20 ng de DNA purificado e água ultrapura autoclavada foi encaminhada para sequenciamento pelo método de Sanger no equipamento Applied Biosystems® 3130 Genetic Analyzer (Life Technologies, EUA) disponível no Laboratório de Biofísica Molecular “Sérgio Mascarenhas” do Instituto de Física de São Carlos (IFSC-USP). As sequências foram analisadas nos programas Vector NTI Advance 11.0 (Life Technologies Carlsbad, EUA) e CLC *Genomics* Workbench v.10.1.1 (Qiagen, Dinamarca).

Como mesmo após sequenciamento Sanger não foi possível ter a sequência completa do plasmídeo contendo o gene *bla*<sub>KPC-2</sub> na amostra *K. pneumoniae* AMKP10, optou-se por sequenciar somente os plasmídeos obtidos por miniprep deste isolado clínico através da tecnologia Illumina em equipamento MiSeq.

Para o sequenciamento pelo método Illumina, a qualidade do DNA foi verificada em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X, contendo tampão TAE 1X a 90



V, por 40 minutos e sua quantidade e pureza confirmada no espectrofotômetro NanoDrop 2000c (Nanodrop *Technologies*). Amostra de DNA total (1 ng) foi encaminhada ao Centro de Genômica Funcional da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - ESALQ/USP para o preparado das bibliotecas utilizando o Kit Nextera XT (Illumina, EUA) e sequenciamento. Os *reads* obtidos foram alinhados para formação dos *contigs* no programa CLC Genomics Workbench v.10.1.1 (Qiagen, Dinamarca) e a anotação foi feita no RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Características fenotípicas

#### 4.1.1 Perfil de sensibilidade dos isolados

Todas as 40 amostras de *K. pneumoniae* isoladas de diversos sítios de infecções de pacientes internados foram caracterizadas. Todos os isolados apresentaram resistência a pelo menos um antibiótico de três classes diferentes. Por isso, todas as amostras foram classificadas como multirresistentes (MDR, do inglês *multi-drug resistant*), de acordo com (MAGIORAKOS et al., 2012), (Figura 4). Entre os antibióticos não-beta-lactâmicos testados, três amostras (7,5%) apresentaram resistências às polimixinas, vinte e sete (70%) com resistências à fluoroquinolona, vinte e um (52,5%) aos aminoglicosídeos e trinta e quatro (85%) à fosfomicina. Todos estes são antibióticos usados na terapia combinada no tratamento de infecções causadas por enterobacteriaceae (CHEW et al., 2017).

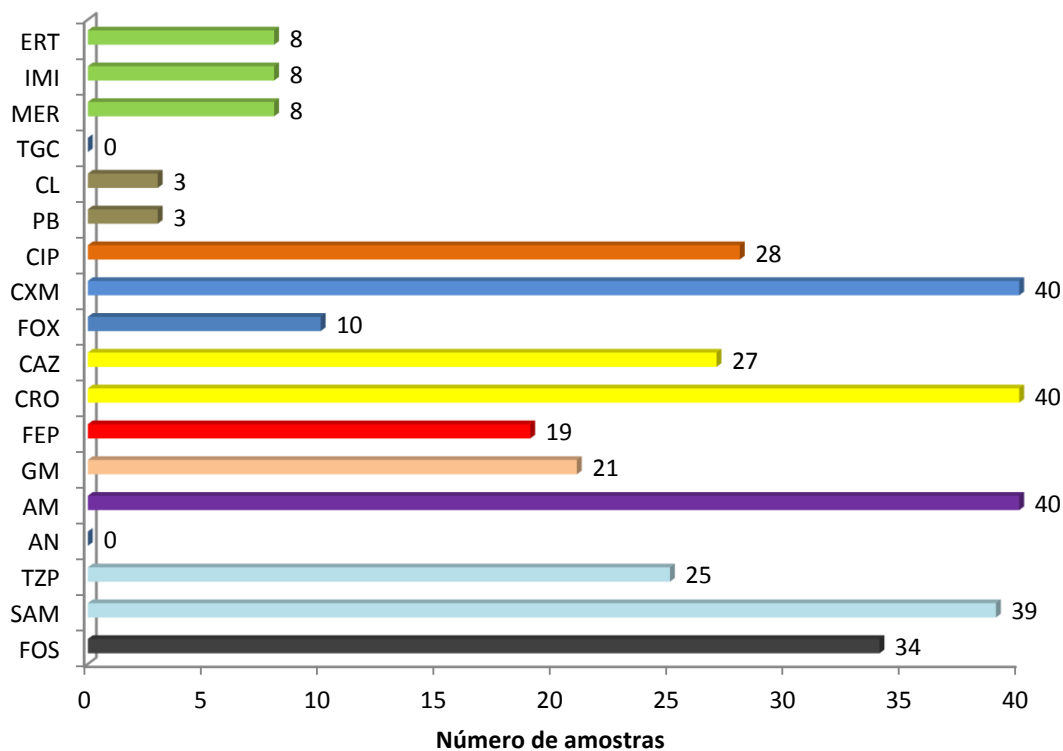
Para as classes dos beta-lactâmicos observa-se um perfil de resistência às cefalosporinas de 2ª geração (100% cefuroxima/25% ceftazidima), cefalosporinas de 3ª geração (100% ceftriaxona/67,5% ceftazidima), às cefalosporinas de 4ª geração (47,5% cefepima), à penicilina (62,5% piperacilina/tazobactam e (97,5%) ampicilina sulbactam), sendo os dois últimos beta-lactâmicos com inibidores de beta-lactamases.

A aquisição de *K. pneumoniae* multirresistentes adquiridas em ambiente hospitalar tem sido uma ameaça para a clínica e o teste de sensibilidade é o passo inicial para a implementação do tratamento adequado (YASIN et al., 2017).

Dos 40 isolados de *K. pneumoniae*, oito (20%) apresentaram resistência a carbapenêmicos pelo método automatizado. Somente o isolado AMKP6 não se

demonstrou resistente aos carbapenêmicos pelo método de microdiluição em quando comparado com resultado do método alto automatizado. A resistência dos isolados AMKP4 e AMKP10 às polimixinas foi comprovada pelo método da microdiluição em caldo.

As *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos têm sido relatadas em outros estudos nos hospitais de algumas regiões do Brasil, que demonstram elevada frequências do perfil de resistência dessa espécie (BIBERG et al., 2015; DALMOLIN et al., 2017). Em estudos anteriores, frequência de até 50 % de *K. pneumoniae* com resistência aos carbapenêmicos é relatada (ROSSI, 2009; PEREIRA et al., 2013). No entanto, este número pode ser subestimado devido à falta de estudos epidemiológicos na região, podendo a incidência de casos ser maior.



**Figura 4** - Número de amostras resistentes a todos os antibióticos testados cada cor representa uma classe de antibióticos. ERT = Ertapenem; IMI = Imipenem; MEM = Meropenem; TGC = Tigeciclina; CL = Colistina; PB = Polimixina B; CIP = Ciprofloxacina; FOX = Cefoxitina; CAZ = Ceftazidima; CRO Ceftriaxona; FEP = Cefepima; GM = Gentamicina; AM = Ampicilina; AN = Amicacina; TZP = Piperacilina/Tazobactam; SAM = Ampicilina/Sulbactam; FOS = Fosfomicina. **Fonte: elaborada pela autora**

## 4.2 Características genotípicas

### 4.2.1 Detecções dos genes que codificam carbapenemases e outras beta-lactamases

Dentre os genes que conferem resistência aos carbapenêmicos, o gene *bla*<sub>KPC-2</sub> foi detectado em 6 (15%) dos 40 isolados estudados (AMKP1, AMKP3, AMKP4, AMKP7, AMKP9 e AMKP10). AMKP2 e AMKP5 não apresentaram nenhum dos genes de resistência aos carbapenêmicos pesquisados. A incidência de *K. pneumoniae* que carregam o gene que codifica a enzima KPC vem aumentando cada vez mais nos grandes centros de saúde do Brasil (GONCALVES et al., 2017).

O surgimento da resistência aos carbapenêmicos, principalmente entre *K. pneumoniae*, é um desafio para a saúde em todo o mundo, devido a ampla disseminação da resistência mediada por plasmídeos carregando o gene *bla*<sub>KPC</sub> (ROJAS et al., 2017). A enzima KPC tornou-se endêmica no Brasil, em vista disso, faz-se necessário o monitoramento da evolução epidemiológica da variabilidade genética dos clones circulando no país, com finalidade de auxiliar no controle e diminuição da disseminação de bactérias carregando o gene *bla*<sub>KPC</sub> no território nacional.

Os genes *bla*<sub>TEM</sub> e *bla*<sub>CTX-M</sub>, que codificam as beta-lactamases TEM e CTX, respectivamente, foram encontrados simultaneamente em 24 (60%) dos isolados. As enzimas beta-lactamases de espectro estendido (ESBL), as quais estão incluídas as famílias CTX-M, TEM e SHV, apresentam a capacidade de inativar os antibióticos cefalosporinas (terceira e quarta geração), penicilinas e os monobactâmicos e estão comumente associadas a surtos de IRAS (MONSTEIN et al., 2007; BAILEY et al., 2011; CANTÓN et al., 2012; ANDRADE et al., 2017).

Dentre os isolados resistentes à polimixina B e colistina, os genes *mcr-1* and *mcr-2* não estavam presentes. Atualmente, já se conhecem 8 variantes do gene *mcr* que transmite resistência as polimixinas através de plasmídeos (LIU et al., 2016; FERNANDES et al., 2016; XAVIER et al., 2016; BOROWIAK et al., 2017; WANG et al., 2018). No entanto, não pudemos testar todos neste estudo.

#### 4.2.2 Perfil de clonalidade das amostras e determinação das linhagens

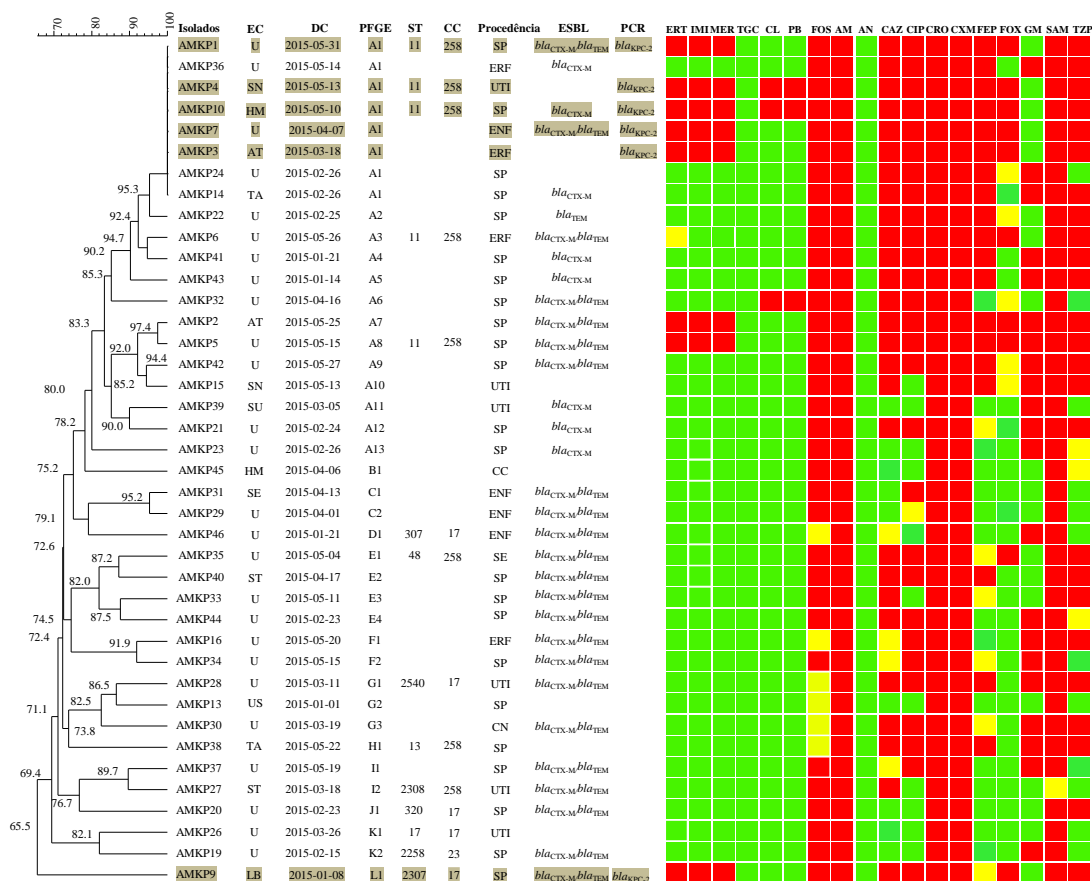
A tipagem molecular por PFGE agrupou os isolados em 12 pulsotipos (denominados de A a L). O pulsotipo A foi prevalente, contendo 20 (50%) isolados analisados, porém nem todos isolados de cada pulsotipo tinham 100% de similaridade e, por isso, pulsotipo foram subdivididos em subtipos. Por exemplo, o pulsotipo A foi dividido em 13 subtipos (A1 - A13). O subtipo A1 foi o predominante, demonstrando uma possível disseminação da linhagem entre os pacientes do hospital. Cinco isolados resistentes aos carbapenêmicos com gene *bla<sub>KPC-2</sub>* estão inseridos no subtipo A1 e um isolado no L1.

Isolados do pulsotipo A são do tipo de sequência (ST) ST11, do complexo clonal CC258, encontrado em hospitais de todo o mundo (CASTANHEIRA et al 2012; PITOUT et al 2015). O complexo clonal CC258 foi o prevalente, seguido pelo CC17 e CC23; o CC258 vem sendo relatado em outros estudos em hospitais no Brasil (ANDRADE et al 2011; BARTOLLETI et al 2016; SAMPAIO, J. L. e Gales, A. C. 2016; CASELLA et al 2018)

Neste presente estudo, quatro novos ST's foram identificados: ST2540, ST2308, ST2258 e ST2307 (Figura 5 e Tabela 6) e foram depositados no banco de dados do MLST de *K. pneumoniae* do Instituto Pasteur. ST11, ST307, ST48, ST13, ST320, ST17 pertencem ao CC258 que é considerado de alto risco (ANDRADE et al., 2011; GOMEZ et al., 2011; QI et al., 2011; PEREIRA et al., 2013).

**Tabela 6** - Perfil alélico e resultado do Tipo da Sequência das amostras analisadas pelo MLST dos clones da amostragem dos isolados bacterianos do hospital.

<b>Isolado</b>	<i>gapA</i>	<i>infB</i>	<i>mdh</i>	<i>pgi</i>	<i>PhoE</i>	<i>rpoB</i>	<i>tonB</i>	ST	CC
AMKP1	3	3	1	1	1	1	4	11	258
AMKP5	3	3	1	1	1	1	4	11	258
AMKP6	3	3	1	1	1	1	4	11	258
AMKP9	50	19	147	20	150	18	4	2307	17
AMKP10	3	3	1	1	1	1	4	11	258
AMKP19	4	1	11	1	9	10	9	2258	23
AMKP20	3	6	2	1	7	4	41	320	17
AMKP27	42	22	55	125	103	20	173	2308	258
AMKP35	2	5	2	2	7	1	10	48	258
AMKP38	2	3	1	1	10	106	19	13	258
AMKP46	3	1	2	52	1	1	7	307	17
AMKP26	2	1	1	1	4	4	4	17	17
AMKP28	3	1	1	5	4	4	6	2540	17



**Figura 5** - Dendrograma de similaridade genética e análises fenotípicas e genotípicas dos isolados de *K. pneumoniae*. U = Urina; SN = Secreção Nasal; HM = Hemocultura; AT = Aspirado Traqueal; ST = Secreção Traqueal; SE = Secreção de Empiema; SU, Secreções de úlcera de pressão; LB = Lavado brônquico coleta DC = Data da coleta; PFGE = pulsotipo; ST = Tipo de Sequência; CC = Complexo Clonal; SP = Sem Procedência; ERF = Enfermaria; UTI = Unidade de terapia intensiva; CC = Centro cirúrgico; SE = Sala de emergência; ERT = Ertapenem; IMI = Imipenem; MEM = Meropenem; TGC = Tigeciclina; CL = Colistina; PB = Polimixina B; FOS = Fosfomicina; AM = Ampicilina; AN = Amicacina, CAZ = Ceftazidima, CIP = Ciprofloxacina; CRO = Ceftriaxona; CXM = Cefuroxima; FEP = Cefepima; FOX = Cefoxitina; GM = Gentamicina; SAM = Ampicilina/Sulbactam; TZP = Piperacilina/Tazobactam; ERF = Enfermaria; U = Urina; SN = Secreção Nasal; HM = Hemocultura; AT = Aspirado Traqueal; ST = Secreção Traqueal; SE = Secreção de Empiema; SU, Secreções de úlcera de pressão; LB = Lavado brônquico. As cores em marrom-claro representa as linhagens com a presença do gene *bla<sub>KPC-2</sub>*, em vermelho resistente, amarelo intermediário e verde sensível. **Fonte: elaborada pela autora**

### 4.2.3 Análises dos genomas

A caracterização do ambiente genético do gene *bla<sub>KPC</sub>* foi realizada anteriormente por PCR como descrito por NAAS et al 2008. No entanto, um ambiente genético distinto carregando o gene *bla<sub>KPC-2</sub>* foi detectado e não era compatível com o *Tn4401*, tradicionalmente encontrado no Brasil e no mundo. Por isso, o genoma da amostra AMKP10 foi sequenciado, resultando em uma cobertura de 497,44x com total de 73 contigs depositado no NCBI (Número de acesso NGKQ00000000). AMKP5 e AMKP2 apresentam 97,4% de similaridade por PFGE e ambas são resistentes aos carbapenêmicos, mas não apresentavam os genes de resistência pesquisados. Por isso, o genoma da AMKP5 foi sequenciado e resultou em cobertura de 498,14x com total de 63 contigs (Número de acesso NCBI NGKP00000000). Genes que conferem resistências adquiridas a diversas classes de antibióticos, incluindo os beta-lactâmicos foram encontradas em ambas as amostras (Tabela 7 e Tabela 8).

**Tabela 7** - Genes adquiridos que conferem resistência a antibióticos encontrados pelo Resfinder no genoma da amostra *K. pneumoniae* AMPK10.

Genes de resistência	Identidade (%)	Atibióticos afetados	Número de acesso
<i>aph(3')</i> -1a	100	aminoglicosídeos	V00359
<i>aac(3)</i> -IIa	99,77	aminoglicosídeos	JQ364967
<i>bla<sub>CTX-M-8</sub></i>	100	betalactâmicos	AF189721
<i>bla<sub>CTX-M-15</sub></i>	100	betalactâmicos	DQ302097
<i>bla<sub>SHV-11</sub></i>	100	betalactâmicos	HM751098
<i>bla<sub>OXA-1</sub></i>	100	betalactâmicos	J02967
<i>bla<sub>LAP2</sub></i>	0	betalactâmicos	
		fluoroquinolonas e	
<i>aac(6)</i> lb-cr	100	aminoglicosídeos	DQ303918
<i>fosA</i>	97,14	fosfomicina	NZ_AFBO01000747
<i>mph(A)</i>	100	macrolídeos	D16251
<i>catB3</i>	99,84	cloranfenicol	AJ009818
<i>qnrS1</i>	100	quinolonas	AB187515
<i>oqxA</i>	100	quinolonas	EU370913
<i>oqxB</i>	100	quinolonas	EU370913
<i>sul1</i>	100	sulfonamide	AJ517790
<i>tet(A)</i>	100	tetraciclina	AJ517790
<i>dfrA12</i>	100	Trimetoprima	AB571791

Fonte: elaborada pela autora

**Tabela 8** - Genes que conferem resistência adquiridas aos antibióticos encontrados pelo Resfinder no genoma da amostra *K. pneumoniae* AMPK5.

Genes de resistência	Identidade		Número de acesso
	(%)	Antibióticos afetados	
<i>aph(3')-Ia</i>	100	aminoglicosídeos	V00359
<i>aac(3)-IIa</i>	99,77	aminoglicosídeos	X51534
<i>bla<sub>CTX-M-15</sub></i>	100	betalactâmicos	DQ302097
<i>bla<sub>SHV-11</sub></i>	100	betalactâmicos	HM751098
<i>bla<sub>OXA-1</sub></i>	100	betalactâmicos	J02967
<i>bla<sub>TEM-1B</sub></i>	100	betalactâmicos	JF910132
<i>aac(6')Ib-cr</i>	100	fluoroquinolonas e	EF636461
		aminoglicosídeos	
<i>FosA</i>	97,14	fosfomicina	NZ_AFBO01000747
<i>mph(A)</i>	100	macrolídeos	D16251
<i>catB3</i>	99,84	Cloranfenicol	AJ009818
<i>qnrB19</i>	100	quinolonas	HM146784
<i>OqxA</i>	100	quinolonas	EU370913
<i>OqxB</i>	100	quinolonas	EU370913
<i>ARR-3</i>	100	rifampicina	JF806499
<i>sul1</i>	100	Sulfonamide	AY224185
<i>sul2</i>	100	Sulfonamide	GQ421466
<i>dfrA26</i>	100	Trimetoprima	AM40315

**Fonte:** elaborada pela autora

As beta-lactamases de classe A (TEM-1, SHV-1, CTX-M, SME e KPC), tiveram um sucesso epidemiológico particular devido a propagação das linhagens clonais que carregam plasmídeos epidêmicos os quais, são bastante comuns em países desenvolvidos e em desenvolvimento (BEVAN et al., 2017; WOERTHER et al., 2012). Seus reservatórios são seres humanos, animais e alimentos. Nos quais, são encontrados diversos genes de resistência aos antibióticos, incluindo os beta-lactâmicos (BEVAN et al., 2017).

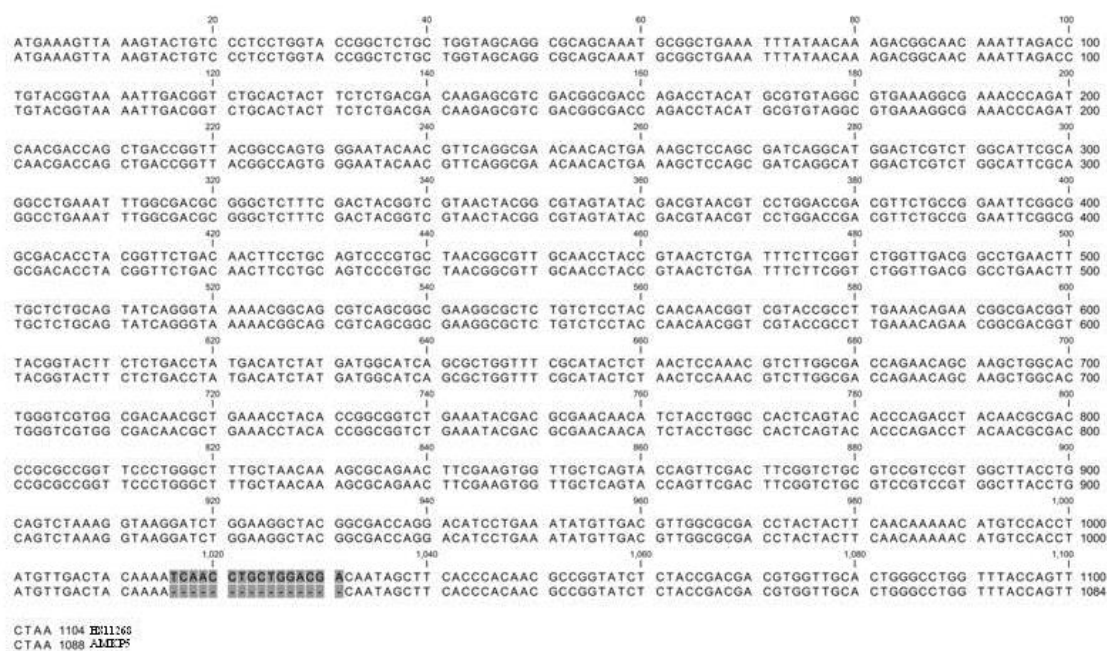
A presença dos genes *bla<sub>CTX-M-15</sub>*, *bla<sub>SHV-11</sub>*, *bla<sub>OXA-1</sub>* e *bla<sub>TEM-1B</sub>* corrobora com os resultados fenotípicos que caracterizam resistências aos beta-lactâmicos de amplo espectro em ambas as amostras. As grupo da enzima CTX-M é disseminado em todo os



continentes, sendo que a variante é predominante é *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, seguida de *bla*<sub>CTX-M-14</sub> e *bla*<sub>CTX-M-2</sub> (BEVAN et al.,2017).

A presença dos genes *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>SHV-11</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub> e *bla*<sub>TEM-1B</sub> corrobora com os resultados fenotípicos que caracterizam resistências aos beta-lactâmicos de amplo espectro em ambas as amostras. As grupo da enzima CTX-M é disseminado em todo os continentes, sendo que a variante predominante é *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, seguida de *bla*<sub>CTX-M-14</sub> e *bla*<sub>CTX-M-2</sub> (BEVAN et al 2017). A presença das enzimas beta-lactamases nas bactérias dos ambientes hospitalares no Brasil vem sendo descrita desde o ano de 2000 (BONNET et al 2000). Linhagem com perfil de resistência aos beta-lactâmicos tem sido descrita com elevada taxa, tanto em ambiente hospitalar como na comunidade (SILVA et al 2012; SAMPAIO e GALES, 2016; DROPA et al 2016; SAMPAIO et al 2016; Casella *et al* 2018). Frequentemente uma diversidade de genes de resistência aos antibióticos podem ser propagados por disseminação de clones de alto risco e por elementos genéticos móveis, provocando surtos nos ambientes hospitalares em muitos países (MATHERS, PEIRANO, et al 2015) (NAVON-VENEZIA et al 2018). Os genes que codificam as ESBLs constantemente estão sendo descritos no Brasil em associação a linhagens produtoras de KPC apresentando um perfil genético de resistência a diversos antibióticos, ressaltando a necessidade de combinações terapêuticas (CASELLA et al 2018; AIRES et al 2017).

Nenhum gene que confere resistência aos carbapenêmicos foi detectado na amostra AMKP5 por PCR nem pelo sequenciamento do genoma. No entanto, uma deleção de uma região de 15 pb foi encontrada na região final da ORF, próxima à região 3' da sequência de nucleotídeos do gene *ompK36*, que codifica uma porina da AMKP5 quando comparada com sequências da linhagem referência *K. pneumoniae* HS11286 (número de acesso CP0032001), que codifica uma porina (Figura 6). A produção de carbapenemases, assim como deleções nas porinas de membrana externa (OMPs) codificadas pelos genes *ompK* são comumente associadas em linhagens de Enterobacteriaceae resistentes aos carbapenêmicos (YAFEI YE et al, 2018). As porinas OmpK35 e OmpK36 permitem a entrada destes antibióticos na célula e por isso, mutações nestas porinas estão relacionadas com resistência aos carbapenêmicos em *K. pneumoniae* (SUGAWARA et al.,2016; HAMZAOUI et al.,2018; YE et al.,2018).



**Figura 6** - Alinhamento das sequências de nucleotídeos que codificam a porina OmpK36 do isolado *K. pneumoniae* AMKP5 com o da linhagem referência *K. pneumoniae* HS11286. Em cinza, observa-se a região onde houve uma deleção na AMKP5. **Fonte: elaborada pela autora**

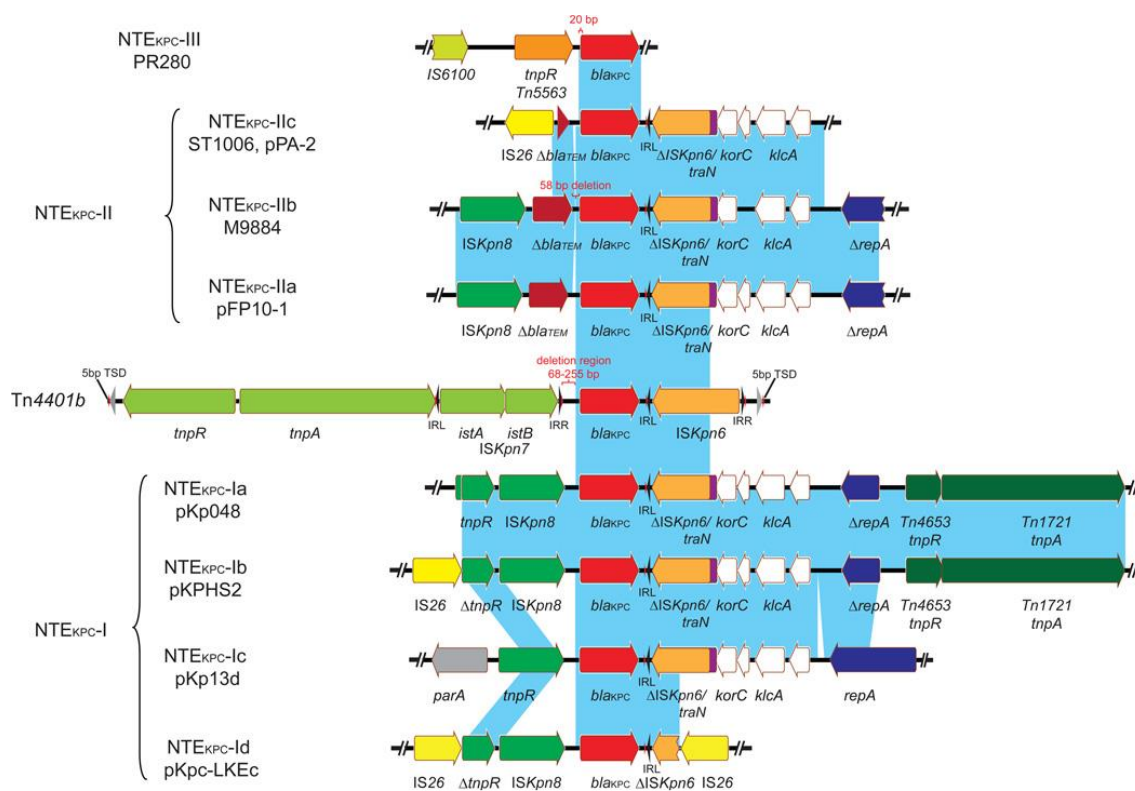
Com relação a resistência às polimixinas observada no isolado AMKP10 detectou-se a inserção de um elemento de inserção (IS) da família IS5 interrompendo o gene *mgrB*.

*MgrB* é um repressor do sistema de dois componentes *phoP/phoQ*, responsável por regular genes que modificam o lipopolissacarídeo (LPS), que tem a função de manter a integridade da membrana celular bacteriana. Alterações no LPS consistem em adição de fosfoetanolamina, deacilação do lipídeo A, ativação de outro sistema de dois componentes (*PmrB/PmrA*) e tudo isso resulta em alteração da carga da membrana, deixando-a menos negativa o que leva resistência às polimixinas (CANNATELLI et al., 2013; OLAITAN et al., 2014). A inserção encontrada no *mgrB* em AMKP10 explica sua resistência à PB e CL. A amplificação do gene *mgrB* das amostras AMKP4 e AMKP32 mostra que apenas o gene da AMKP4 apresentou tamanho aumentado cujo sequenciamento indicou a mesma inserção. O mecanismo de resistência às polimixinas da amostra AMKP32 ainda precisa ser identificado visto que, atualmente o número de casos de resistência as polimixinas vem aumentando no ambiente hospitalar.

#### 4.2.4 Análise do ambiente genético do gene *bla<sub>KPC</sub>*

O gene *bla<sub>KPC-2</sub>* da AMKP10 foi encontrado em um NTE<sub>KPC</sub> contendo:  $\Delta$ ISKpn6/*bla<sub>KPC-2</sub>*/*tnpA*-ISKpn27/*tnpR*-Tn3/*tnpA*-ISEc63-like associado ao Tn1722. A partir de primers desenhados baseados nesta sequência, detectou-se o mesmo ambiente genético em todas as amostras resistentes aos carbapenêmicos deste estudo.

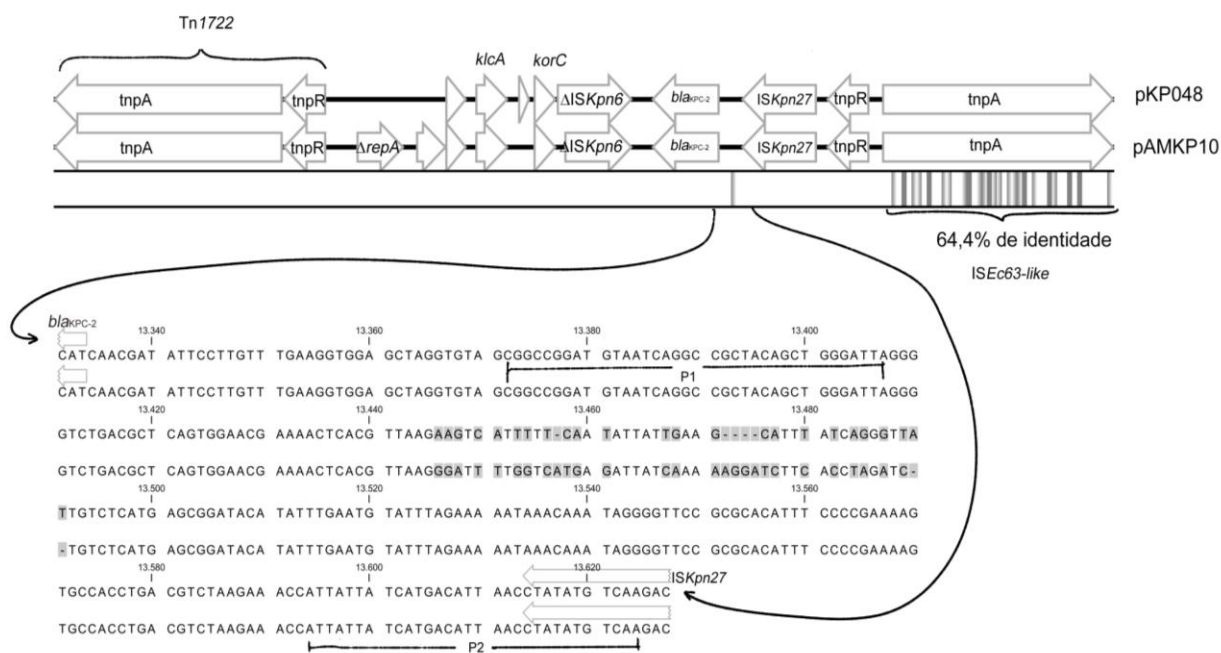
Este ambiente genético e algumas variações do mesmo já foram descritos anteriormente em plasmídeos isolados na China (SHEN et al., 2009; CHEN et al., 2014; WANG et al. 2015; SHEN et al. 2016; CHEN et al., 2014) que classificaram os NTE<sub>KPC</sub> em 3 grupos (NTE<sub>KPC</sub> I, II e III) (Figura 7).



**Figura 7** - Estrutura esquemática do ambiente genético do gene *bla<sub>KPC</sub>* em estudos anteriores realizados para comparar em linhagens analisadas. **Fonte: CHEN et al., 2014**

O ambiente genético encontrado na amostra AMKP10 é muito parecido com aquele no plasmídeo pKP048 que foi classificado como NTE<sub>KPC</sub>-Ia (Figura 7). Existem duas diferenças entre o ambiente genético encontrado na AMKP10 daquele presente no pKP048: 1) a transposase da família Tn2 encontrada no pKP048 apresenta uma identidade de 64,4 % com aquela no isolado AMKP10, identificada como ISEc63-like pelo ISFinder; 2) mutações foram identificadas na região intergênica entre o *bla*<sub>KPC-2</sub> e *ISKpn27*, porém elas não afetam as regiões promotoras P1 e P2 descritas no ambiente genético baseado no Tn1722 do plasmídeo pKP048 (SHEN et al., 2009; WANG et al., 2015), número de acesso: FJ628167.2 (Figura 8).

Recentemente, CERDEIRA et al. (2017) identificaram um ambiente genético parecido com NTE<sub>KPC</sub> Ic, que inclusive, já havia sido encontrado em um isolado do Sudeste do Brasil (RAMOS et al., 2014; CHEN et al., 2014). O gene *repA* está intacto no NTE<sub>KPC</sub>-Ic e encontra-se interrompido na AMKP10. Com isso, demonstra-se que os ambientes genéticos encontrados nestas amostras brasileiras não são uma variação um do outro seguidos de disseminação recente, mas provavelmente são frutos de variações a partir de um ancestral comum mais distante, mesmo elas sendo de linhagens do mesmo CC17.

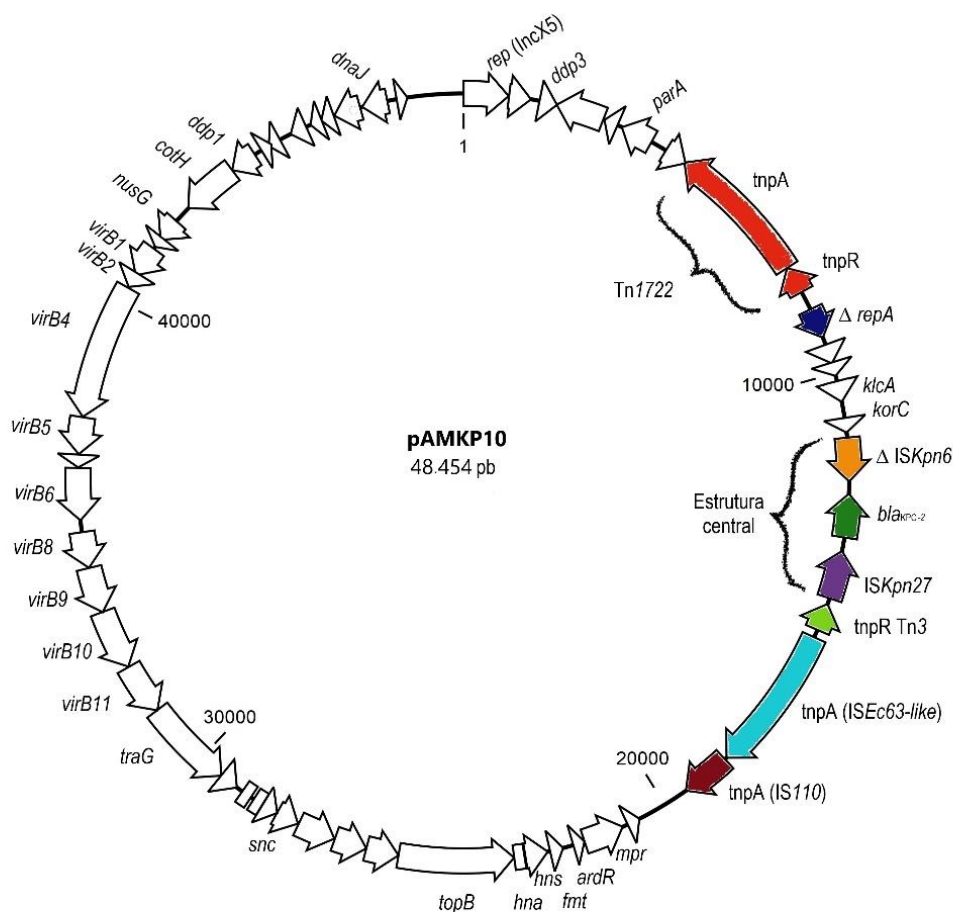


**Figura 8** - Alinhamento dos ambientes genéticos do gene *bla*<sub>KPC-2</sub> do plasmídeo pKP048 (número de acesso: FJ628167.2) e do plasmídeo pAMKP10. (número de acesso: NGKQ00000000) as setas brancas representam seqüências de codificação (CDS), e sua direção é compatível com a da transcrição. A fita consenso foi suprimida e abaixo das CDSs, as barras em tons de cinza mostram onde há mutações e em branco onde as bases são 100% conservadas. O alinhamento da região intergêncica está destacado mostrando as diferenças nas bases de pKP048 e pAMKP10 e a posição das regiões promotoras P1 e P2.

#### 4.2.5 Caracterização do plasmídeo da amostra AMKP10

O plasmídeo que contém o gene *bla*<sub>KPC-2</sub> foi identificado e denominado pAMKP10. Ele tem um tamanho de 48,454 pb e apresenta genes *rep* pertencentes ao grupo de incompatibilidade IncX5 (Figura 9). Os plasmídeos IncX apresentam características morfológicas intrínsecas que facilitam sua habilidade de propagação e manutenção em outras células, além de perfil de resistência aos antibióticos de último recurso disponíveis na clínica entre as Enterobacteriaceae (JOHNSON et al., 2012); (BUSTAMANTE e IREDELL, 2017). Assim, pelo sequenciamento do genoma foi possível identificá-lo e se verificou a presença de genes úteis para a conjugação como genes *tra* e *virB*. A capacidade de conjugação foi avaliada através de experimentos de conjugação *in vitro*.

Com os primers desenhados a partir da sequência do pAMKP10, verificou-se que todas as outras amostras apresentaram o mesmo plasmídeo. Como ele foi detectado em 2 linhagens diferentes, ST11 e ST2307, observa-se que houve disseminação do NTE<sub>KPC</sub> tanto por plasmídeo através do pAMKP10, como clonal através da linhagem ST11. A linhagem ST11 é uma das linhagens mais bem adaptadas ao ambiente hospitalar em todo mundo e a inserção do plasmídeo IncX5 nesta linhagem representou uma importante complementação



**Figura 9** - Esquema da estrutura do plasmídeo conjugativo pAMKP10. As cores são baseadas na classificação de acordo com suas funções: genes de adaptação em vermelho, replicação em verde, propagação em azul e estabilidade em rosa. **Fonte: elaborada pela autora**

A transferência dos plasmídeos carregando o gene *bla*<sub>KPC-2</sub> nos isolados AMKP1, AMKP3, AMKP4 e AMKP10 por conjugação para *E. coli* J53 ocorreu nas frequências de  $2,3 \times 10^{-8}$ ,  $6,43 \times 10^{-8}$ ,  $1,31 \times 10^{-7}$  e  $8,23 \times 10^{-12}$ , respectivamente. Essas frequências são baixas e similares as descritas por (CAMPOS, 2013). A baixa frequência em *E. coli* pode ocorrer por várias características inerentes da linhagem, tais como, fatores físicos e químicos do meio de crescimento e características conjugativas do plasmídeo (GRIFFITHS et al.,2000). Além disso, os plasmídeos que abrigam o gene *bla*<sub>KPC-2</sub> dos isolados AMKP7, AMKP9 e AMKP10 também foram transformados em *E. coli* DH5- $\alpha$ . Todas as linhagens de *E. coli* conjugadas ou transformadas tornaram-se resistentes aos principais carbapenêmicos testados caracterizando um potencial de resistência mediado pelo plasmídeo pAMKP10 carregando o gene *bla*<sub>KPC-2</sub> (Tabela 9).

**Tabela 9** - Valores da CIM das *E. coli* transconjugantes e transformantes para os três carbapenêmicos demonstrando a elevada capacidade de transferência do plasmídeo carregando o gene *bla*<sub>KPC-2</sub>

Isolados	CIM (mg/L)		
	Ertapenem	Imipenem	Meropenem
AMKP1	>512	>512	512
AMKP3	>512	>512	>512
AMKP4	>512	>512	>512
AMKP7	>512	>512	512
AMKP9	64	64	32
AMKP10	512	512	512

Transconjugantes e Transformantes	Ertapenem	Imipenem	Meropenem
<i>E. coli</i> J53	0,125	1	0,125
<i>E. coli</i> DH5- $\alpha$	0,06	0,5	0,06
<i>E. coli</i> J53 (pAMKP1)	>512	>512	>512
<i>E. coli</i> J53 (pAMKP3)	512	64	512
<i>E. coli</i> J53 (pAMKP4)	512	512	>512
<i>E. coli</i> DH5- $\alpha$ (pAMKP7)	>512	>512	>512
<i>E. coli</i> DH5- $\alpha$ (pAMKP9)	16	8	>512
<i>E. coli</i> J53 (pAMKP10)	>512	512	>512

Fonte: elaborada pela autora

## 5. CONCLUSÕES

- ✓ O subtipo A1, relacionado com ST11 (CC258), foi o predominante entre os subtipos do pulsotipo A. Inclusive, houve uma disseminação do subtipo A1 entre 8 pacientes caracterizando um possível surto no hospital nesse período;
- ✓ Quatro novos STs foram identificados neste estudo: ST2540, ST2308, ST2258 e ST2307;
- ✓ Nenhuma amostra era resistente à tigeciclina, apesar de algumas terem sido classificadas como resistentes pelo método automatizado havendo discordância com os resultados realizados no laboratório;
- ✓ Todas as amostras foram resistentes ou apresentaram resistência intermediária à fosfomicina;
- ✓ Apenas 3 isolados (7,5%) apresentaram resistência à polimixina B e colistina, mas não tinham os genes *mcr-1* ou *mcr-2*. Isolados AMKP10 e AMKP4 apresentaram inserção de IS5 no gene *mgrB*;
- ✓ *bla*<sub>TEM</sub> e *bla*<sub>CTX-M</sub> foram detectados na maioria das amostras. Dentre os genes que codificam as principais carbapenemases, apenas *bla*<sub>KPC-2</sub> foi encontrado.
- ✓ Um novo NTE<sub>KPC</sub> foi identificado contendo a seguinte estrutura em um plasmídeo IncX5:  $\Delta$ ISKpn6/*bla*<sub>KPC-2</sub>/*tnpA*-ISKpn27/*tnpR*-Tn3/*tnpA*-ISEc63-like em associação com Tn1722;
- ✓ O mesmo plasmídeo foi encontrado em todas as amostras em que *bla*<sub>KPC</sub> foi detectado;
- ✓ Plasmídeos carreando este novo NTE<sub>KPC</sub> conjugaram apenas a partir de isolados da linhagem ST11 e em baixas frequências para *E. coli* J53, tornando-as resistentes aos carbapenêmicos.
- ✓ A presença de *bla*<sub>KPC-2</sub> nas amostras deste estudo corrobora com o fato de que a variante *bla*<sub>KPC-2</sub> é ainda a mais encontrada no país. No entanto, agora *bla*<sub>KPC</sub> tem sido encontrado em outros elementos genéticos e em plasmídeos de diferentes grupos de incompatibilidade, cujos papéis na disseminação da resistência permanece a ser esclarecido



## 6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ANDRADE, LN 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. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 55, n 7, p. 3579-83, 2011.

ANDRADE LN, et al. Determinants of beta-lactam resistance in meningitis-causing Enterobacteriaceae in Brazil. **Canadian Journal Microbiology**, v. 56, n. 5, p. 399-407, 2010.

ANDRADE LN e Darinit ALC. Bacilos gram-negativos produtores de beta-lactamases: que *bla bla bla* é esse? **Journal of Infection Control**. v. 6, n.1, 16-25, 2017.

ADEOLU, M. et al. Genome-based phylogeny and taxonomy of the ‘Enterobacteriales’: proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 66, p.5575-5599, 2016.

AIRES, C. A. M. et al. Genomic characterization of an extensively drug-resistant KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST855 (CC258) only susceptible to ceftazidime-avibactam isolated in Brazil. **Diagnostic Microbiology Infectious Disease**, v.89, n. 4, p. 324-327, 2017.

ARAÚJO, B. F. et al. Insights into a novel *Tn4401* deletion (*Tn4401i*) in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical strain belonging to the high-risk Clonal Group 258 producing KPC-2. **International Journal Antimicrobial Agents**, v.52, n.4, p. 525-527, 2018.

BAGLEY, S. T. Habitat association of *Klebsiella* species. **Infection Control**, v. 6, n. 2, p. 52-8, 1995.

BAILEY, J. K. et al. Distribution of the *bla*<sub>TEM</sub> gene and *bla*<sub>TEM</sub>-containing transposons in commensal *Escherichia coli*. **Journal Antimicrobial and Chemotherapy**, v. 66, n. 4, p. 745-51, 2011.

BARTOLLETI, F. et al. Polymyxin B Resistance in Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*, São Paulo, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n.10, p. 1849-1851, 2016.

BEVAN ER.; et al. Global epidemiology of CTX-M  $\beta$ -lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**. v. 1, 72, n.8, p. 2145-2155, 2017.

BIBERG, C. A. et al. KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in a hospital in the Midwest region of Brazil. **Brazilian Journal Microbiology**. v.46, n.2, p.501-4, 2015.

BONNET, R. et al. A novel CTX-M beta-lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant Enterobacteriaceae isolated in Brazil. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 44, n. 7, p. 1936-42, 2000.

BRYANT, K. A. et al. KPC-4 Is encoded within a truncated *Tn4401* in an IncL/M plasmid, pNE1280, isolated from *Enterobacter cloacae* and *Serratia marcescens*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 37-41, 2013.

BUSTAMANTE, P.; IREDELL, J. R. Carriage of type II toxin-antitoxin systems by the growing group of IncX plasmids. **Plasmid**, v. 91, p. 19-27, 2017.

BOROWIAK, M. et al. Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, *mcr-5*, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Paratyphi* **Journal Antimicrobial and Chemotherapy**, v.72, n.12, p.3317-3324, 2017.

BARANIAK, A. et al. KPC-Like Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae Colonizing Patients in Europe and Israel **American Society for Microbiology Journals**, v.60. n.3, p. 1912-1917, 2016.

CANNATELLI, A. 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 Chemotherapy** v.57, n.11 p.5521-6, 2013.

CAMPOS, J. C. Caracterização fenotípica e genotípica da Resistência a Antimicrobiano em Micobactérias de Crescimento Rápido. Dissertação de mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas da **Universidade de São Paulo**, São Paulo, p. 87. 2013.

CANTÓN, R et al. CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. **Frontiers in Microbiology**, v.3, n. 110, p. 1-19, 2012.

CASELLA, T. et al., (2018). Draft genome sequence of a KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST340 carrying *bla*<sub>CTX-M-15</sub> and *bla*<sub>CTX-M-59</sub> genes: a rich genome of mobile genetic elements and genes encoding antibiotic resistance. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, 13, p. 35-36.

CASTANHEIRA, M. et al. Expansion of Clonal Complex 258 KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Latin American Hospitals: Report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. In: (Ed.). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, p.1668-1669, 2012.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-eighth Informational Supplement M100-S27. Wayne, PA, USA: **CLSI**, 2017.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, OFFICE OF INFECTIOUS DISEASE. Antibiotic resistance threats in the United States, April 2013. Disponível em: [tp://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013](http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013). Acesso em: Junho 14, 2018.

CERDEIRA, L. T. et al. IncX3 plasmid harboring a non-*Tn4401* genetic element (NTEKPC) in a hospital-associated clone of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST340/CG258. **Diagnostic Microbiology Infectious Disease**, v. 89, n. 2, p. 164-167, 2017.

CHEN, L. et al. Partial Excision of *bla*<sub>KPC</sub> from *Tn4401* in Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*. In: (Ed.). **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.56, n. 3, p. 1635–1638, 2012.

CHMELNITSKY, I. et al. Mix and match of KPC-2 encoding plasmids in Enterobacteriaceae-comparative genomics. **Diagnostic Microbiology Infectious Disease**, v.79, n.2, p. 255-60, 2014.

CHEW KL et al. Colistin and polymyxin B susceptibility testing for carbapenem-resistant and 2 mcr-positive Enterobacteriaceae: Comparison of Sensititre, Microscan, 3 Vitek 2, and Etest with broth microdilution. **Jurnal Clinical Microbiology**. v. 55, n.9, p 2609-2616, 2017.

CUZON, G. et al. Functional Characterization of *Tn4401*, a Tn3-Based Transposon Involved in *bla<sub>KPC</sub>* gene mobilization, **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 55, n. 11, p. 5370-3, 2011.

Nov;55(11):5370-3

DALMOLIN, T. V. et al. Detection and analysis of different interactions between resistance mechanisms and carbapenems in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. In: (Ed.). **Brazilian Journal Microbiology**, v.48, n.3, p. 493-8, 2017.

DIANCOURT, L. et al. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. **Journal Clinical Microbiology**, v. 43, n.8, p. 4178-82 2005.

DOI, Y.; PATERSON, D. L. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 36, n. 1, p. 74–84, 2015.

DORTET, L.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Worldwide dissemination of the NDM-Type carbapenemases in Gram-negative bacteria. **BioMed Research International**, v. 2014, p.1-12, 2014.

DROPA, M. 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**, v. 23 n.5, p. 4953-8, 2016.

EXNER, M. et al. Cox D. Antibiotic resistance: the race to stop the silent tsunami facing modern medicine. **The Guardian**. Disponível: <https://www.theguardian.com/society/blog/2015/aug>. Acesso em: 21/12/2018.

EDWARDS, J. R. et al. Carbapenems: the pinnacle of the  $\beta$ -lactam antibiotics or room for improvement? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 45, n.1, p. 1-4, 2018.

FERNANDES, M. R. et al. Silent dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli* in South America could contribute to the global spread of the mcr-1 gene. **Eurosurveillance**, v.21, n.17, p. 28, 2016.

FEHLBERG, L. C. C. et al. Emergence of *Klebsiella pneumoniae*-producing KPC-2 carbapenemase in Paraíba, Northeastern Brazil. **Brazilian Journal Microbiology**, v.16, n.6, p. 577-80, 2012.

GOMEZ, S. A. et al. Clonal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* ST258 harbouring KPC-2 in Argentina. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n.10, p. 1520-4, 2011.

GRIFFITHS, A. J. et al. Bacterial conjugation. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/> <Acesso em: 26/08/2018, 2000.

GONCALVES, G. B. et al. Spread of multidrug-resistant high-risk *Klebsiella pneumoniae* clones in a tertiary hospital from southern Brazil. **Infection genetics and evolution**, v. 56, p. 1-7, 2017.

GESUNDHEITSSCHUTZ B. Hygienemaßnahmen bei Infektionen oder Besiedlung mit multiresistentes gram negative Stäbchen. Empfehlung der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) beim Robert Koch-Institut (RKI) [Hygiene measures for infection or colonization with multidrug-resistant gram-negative bacilli. Commission recommendation for hospital hygiene and infection prevention (KRINKO) at the Robert Koch Institute (RKI)]. v. 55, n.10, p.1311–1354, 212.

HAMZAOU, Z. et al. An Outbreak of NDM-1-Producing *Klebsiella pneumoniae*, associated with OmpK35 and OmpK36 Porin Loss in Tunisia. **Microbial Drug Resistance**, v. 24, n. 8, p. 1137-1147, 2018.

HAWKEY, P. M.; LIVERMORE, D. M. Carbapenem antibiotics for serious infections. 2012. Disponível em:< <https://www.bmj.com/content/344/bmj.e>, 3236. Acesso em: 20/08/2019.

- HANES, M. et al. Structural and biochemical characterization of the interaction between KPC-2 beta-lactamase and beta-lactamase inhibitor protein. **Biochemistry**. v. 48, n. 39, p. 9185-9193, 2009.
- HONG, D. J. et al. Epidemiology and Characteristics of Metallo- $\beta$ -Lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa*. **Infection & Chemotherapy**, v.47, n. 2, p. 81-97, 2015.
- JEON, J. et al. Structural Basis for Carbapenem-Hydrolyzing Mechanisms of Carbapenemases Conferring Antibiotic Resistance. **International Journal of Molecular Sciences**, v.16, n. 5, p. 9654-9692, 2015.
- JOHNSON, T. J. et al. Expansion of the IncX plasmid family for improved identification and typing of novel plasmids in drug-resistant Enterobacteriaceae. **Plasmid**, v. 68, n. 1, p. 43-50, 2012.
- JIANG, L, et al. Nanodelivery strategies for the treatment of multidrug-resistant bacterial infections. **Journal of Interdisciplinary Nanomedicine**, v. 3, n. 3, p.111–121, 2018.
- JACOBY, G. A.; MD. Munoz-Price, L. S. The New  $\beta$ -Lactamases. The New **England Journal of Medicine**, v. 352 p.380-39, 2015.
- JACOBS, et al. Triple combination antibiotic therapy for carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: A systematic review. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**. v.16, n.1, p.76, 2017.
- BUSH, K. 2013. The ABCD's of  $\beta$ -lactamase nomenclature *Journal of Infection and Chemotherapy*, v.19, n.4, p.549 – 559, 2013.
- BUSH K, Jacoby GA, Medeiros A A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v. 39, n. 6, p.1211-33, 1995.
- KITCHEL, B. et al. Genetic factors associated with elevated carbapenem resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 54, n. 10, p. 4201-7, 2010.

KITCHEL, B. et al. Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: clonal expansion of multilocus sequence type 258. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.53, n. 8, p. 3365-70, 2009.

KUNIN, C. M. et al. Report of a symposium on use and abuse of antibiotics worldwide. **Review of Infectious Diseases**, v.12, p12-19, 1990.

LAVAGNOLI, L. S. et al. Factors associated with acquisition of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 25, n. 2935, 2017.

LOGAN, L. K.; WEINSTEIN, R. A. The epidemiology of Carbapenem-resistant enterobacteriaceae: The impact and evolution of a global menace. **Journal of Infectious Diseases**, v. 215, n. Suppl 1, p. S28–S36, 2017.

LIU, Y. Y. et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. **Lancet Infectious Diseases**, v.16, n. 2, p. 161-8, 2016,

NASCIMENTO, et al. Disclaimer International high-risk clones of *Klebsiella pneumoniae* KPC-2/CC258 and *Escherichia coli* CTX-M-15/CC10 in urban Lake Waters. **Science of The Total Environment**, v.15, n.598 p.910-915, 2017.

MAGIORAKOS AP et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology Infection**. v.18. n. 3, p. 268-81, 2012.

MARTEVA-PROEVSKA Y, et al. Antibiotic combinations with colistin against carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* - in vitro assessment. **Journal of IMAB - Annual Proceeding**, v. 24, n. 4, p.2258-2266, 2018.

MAIDEN, M. C. Multilocus sequence typing of bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 60, p. 561-88, 2008.

SINGH, N. e Manchanda, V. Control of multidrug-resistant Gram-negative bacteria in low-and middle-income countries—high impact interventions without much resources. **Clinical Microbiology Infection**, v. 23, n. 4, p. 216–218, 2017.

- MATHERS, A. J. et al. The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 28, n. 3, p. 565-91, 2015.
- MATHERS, A. J. et al. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *K. pneumoniae* at a single institution: insights into endemicity from whole-genome sequencing. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 59, n. 3, p. 1656-63, 2015.
- MONSTEIN, H. J. et al. Multiplex PCR amplification assay for the detection of *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>* and *bla<sub>CTX-M</sub>* genes in Enterobacteriaceae. **Apmis**, v.115, n.12, p.1400-8, 2017.
- MONTEIRO, J. et al. First Report of KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strains in Brazil. v.53, n.1, p. 333–334, 2009.
- MARQUES, D. C. Zucchi, P. Pharmacy and therapeutics committees in Brazil: lagging behind international standards. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 19, n. 1, p. 58-63, 2006.
- MEVIUS, D.J et al. Conference ‘The Microbial Threat’. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.11, n. 2, p.101–5, 1999.
- MIRANDA, I. F. et al. *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase do tipo kpc : disseminação mundial e situação atual no brasil. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 25, n. 2, p. 113–119, 2019.
- MURRAY, P. R. Microbiologia Médica. 4ª ed. **Elsevier**, 2004.
- MUNITA JM E ARIAS CA. Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Microbiology Spectrum**, v.4, n.2, p. 1-37, 2016.
- NAAS, T. et al. Genetic Structures at the Origin of Acquisition of the  $\beta$ -Lactamase *bla<sub>KPC</sub>* Gene. In: (Ed.). **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.52, n. 4, p.1257-63, 2008.
- NAAS, T. et al. Role of ISK<sub>pn7</sub> and Deletions in *bla<sub>KPC</sub>* Gene Expression. In: (Ed.). **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.56, n. 9 p.4753-9, 2012.
- NASCIMENTO, T. et al. International high-risk clones of *Klebsiella pneumoniae* KPC-2/CC258 and *Escherichia coli* CTX-M-15/CC10 in urban lake waters. **Science of the Total Environment**, v. 15, v.598, p. 910-915, 2017.



NAVON-VENEZIA, S. et al. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, n. 3, p. 252-275, 2017.

NICOLETTI, A. G. et al. Characterization of BKC-1 class A carbapenemase from *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in Brazil. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.59, n. 9, p. 5159-64, 2015.

OLAITAN, A O et al. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 26, n. 5, p. 1-18, 2014.

OLIVEIRA, S. 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. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 3, p. 849–852, 2014.

PODSCHUN R, ULLMANN U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clinical Microbiology Reviews**, v.11, n. 4, p.589–603, 1998.

PAPP-WALLACE, K. M. et al. Carbapenems: Past, Present, and Future. In: (Ed.). **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.55, n. 11, p.4943-60, 2011.

PEREIRA, P. S. et al. Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: spread of clonal complex 11 (ST11, ST437 and ST340). **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v.68, n. 2, p. 312-6, 2013.

PITOUT, J.D.D. et al. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: a key pathogen set for global nosocomial dominance, **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.59, n.10, p5873-84, 2015.

POIREL, L. et al. The *mgrB* gene as a key target for acquired resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae*. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v.70, n.1, p. 75-80, 2015.

PALAZZO, I.C.V et al. Evaluation of clonality in enterococci isolated in Brazil carrying Tn1546-like elements associated with *vanA* plasmids. **FEMS Microbiology Letters**, v, 258, n.1, p. 29-36, 2006.

PEIRANO, G. et al. Carbapenem hydrolysing  $\beta$ -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil, **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, n. 2, p. 265-8, 2009.

QUEENAN, A. M. e Bush, K. Carbapenemases: the versatile  $\beta$ -lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n.3, p. 440-458, 2007.

POIREL L. ET AL. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.70, n.1, p.119-23, 2011.

MEHTA SC, et al. Natural Variants of the KPC-2 Carbapenemase have Evolved Increased Catalytic Efficiency for Ceftazidime Hydrolysis at the Cost of Enzyme Stability. **PLoS Pathogens**, v.11, n.6, 2015.

QI, Y. et al. ST11, the dominant clone of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in China. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 2, p. 307-12, 2011.

RAMOS, P. I. P. et al. Comparative analysis of the complete genome of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* Kp13 reveals remarkable genome plasticity and a wide repertoire of virulence and resistance mechanisms. In: (Ed.). **BMC Genomics**, v.15, n.54, p.1-16 2014.

ROJAS, L. J. et al. Analysis of the Epidemic of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Convergence of Two Evolutionary Mechanisms Creates the "Perfect Storm". **Journal of Infectious Diseases**, v.217, n.1, p. 82-92, 2017.

RUBIN, J.E.; Pitout, J.D.D. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase, carbapenemases and AmpC producing Enterobacteriaceae in companion animals. **Veterinary Microbiology**, v.170, n. 170, p. 108, 2014.

PEREZ, L. The Impact of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Type on Clinical Outcomes after the Recovery of This Organism from Urine of Critically Ill Patients. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v.37, n.10, p.1257-1258, 2016.

PAVEZ, MÓNICA et al. Early Dissemination of KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strains in Brazil. **JF Antimicrobial Agents and Chemotherapy Antimicrobial**, V. 53, n. 6, p. 3180, 2009.

SAMPAIO, J. L. M. e GALES, A. C. 2016. Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae in Brazil: focus on  $\beta$ -lactams and polymyxins. In: (Ed.). **Brazil Journal Microbiology**, v. 47, p. 31-37, 2016.

SEIBERT, G. et al. Nosocomial infections by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producing enterobacteria in a teaching hospital. **Einstein**, São Paulo, v.12, n.3, p. 282-286, 2014.

SHEN, P. et al. Novel genetic environment of the carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2 among Enterobacteriaceae in China. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.53, n.10, p. 4333-8, 2009.

DEGHAN, F. et al. Resistance of gram negative bacteria in hospital acquired pneumonia: A prospective study. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 20, n. 1, p. 113–114, 2016.

DOI, Y.; PATERSON, D. L. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. **Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 36, n. 1, p. 74–84, 2015.

DORTET, L.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Worldwide dissemination of the NDM-Type carbapenemases in Gram-negative bacteria. **BioMed Research International**, v. 2014, p. ID 249856, 12, 2014.

SANTAJIT, S.; INDRAWATTANA, N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 1–8, 5 maio 2016.

SINGH, N.; MANCHANDA, V. Control of multidrug-resistant Gram-negative bacteria in low- and middle-income countries—high impact interventions without much resources. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 23, n. 4, p. 216–218, 2017.

SORNETTE, D. et al. Endogenous versus Exogenous Origins of Diseases. **Journal of biological Systems**, v. 17, n. 2, p. 225-267, 2009.

SILVA, K. C. D. et al. Epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases in Brazil: clinical impact and implications for agribusiness. **Brazilian Journal of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 48, n. 2, p. 91-99, 2012.

- STOESSER, N. et al. Genomic epidemiology of global *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Escherichia coli*. In: (Ed.). **Sci Rep**, v.7, n. 5917, p.1-11, 2017.
- SUTARIA, D. S. et al., First Penicillin-Binding Protein Occupancy Patterns of beta-Lactams and beta-Lactamase Inhibitors in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 25 62, (6) 2018.
- SILHAVY TJ, e KAHNE D, Walker S. O envelope da célula bacteriana. **Perspectives Biology**, v. 2, n.5, 2010.
- SUGAWARA, E. et al. *Klebsiella pneumoniae* Major Porins OmpK35 and OmpK36 Allow More Efficient Diffusion of beta-Lactams than Their *Escherichia coli* Homologs OmpF and OmpC. **Journal Bacteriology**, v.198, n.23, p. 3200-3208, 2016.
- BERTOLDI, M. B. et al. Fatores de riscos associados á infecção do trato urinário nasocomial por betalactamases de espectro estendido. **Journal of infection control**, v.3, n. 2, p. 42-44, 2014.
- TRAVERS, K.; M. BARZA. Morbidity of infections caused by antimicrobial-resistant bacteria. **Clinical Infectious Diseases**, v.34, n. 3 p.131-134, 2002.
- TAVARES, C. P. et al. Molecular epidemiology of KPC-2–producing Enterobacteriaceae (non–*Klebsiella pneumoniae*) isolated from Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.82, n. 4, p. 326-330, 2015.
- TZOUVELEKIS, L. S. et al. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and Other Enterobacteriaceae: an Evolving Crisis of Global Dimensions. **Clinical Microbiology Reviews**. 25, n. 4, p. 682-707, 2012.
- OLEMAN, M. A. et al. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v.50, n. 5, p. 673-9, 2002.
- VADING M, et al. Invasive infection caused by *Klebsiella pneumoniae* is a disease-affecting patients with high comorbidity and associated with high long-term mortality. **PLoS ONE** v.13, n. 4, 2018.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Medidas de prevenção e controle de infecções por enterobactérias multirresistentes NOTA TÉCNICA Nº 01/2013. **Brasília**. Disponível: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/>. Acesso em: 04/03/2015. 2013.

WANG, X. et al. Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, *mcr-8*, in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Emerging Microbes and Infections**, v.4; 7, n. 1, p. 122, 2018.

WOODALL, C. A. DNA Transfer by Bacterial Conjugation. Totowa, NJ: **Humana Press**, v. 235, p. 61-67, 2003.

WALTER-RASMUSSEM, J. HOBIBY. Plasmídeo-borne AmpC  $\beta$ -lactamase. **Journal Microbiology**, v. 48, n. 6, p. 479-93, 2002.

WILLIAMS, J.D.  $\beta$ -lactamases and  $\beta$ -lactamase inhibitors. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.12, Supplement 1, p. S3-S7, 1999.

WOERTHER PL et al. Trends in human fecal carriage of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the community: toward the globalization of CTX-M. **Clinical Microbiology, Clinical Microbiology Reviews**, v. 26; n.4, p. 744-58, 2013.

XAVIER, B. B. et al. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, **Euro surveillance**, v. 21, n. 27, p. 1-6, 2016.

YE, Y. et al. Mechanism for carbapenem resistance of clinical Enterobacteriaceae isolates. In: (Ed.). **Experimental and therapeutic medicine**, v.15, n. 1, p.1143-1149, 2018.

YASIN, F. et al. Combination Therapy for Multidrug-Resistant *Klebsiella Pneumoniae* Urinary Tract Infection. **Cureus**, v.9, n.7, p. 1-8, 2017.

YULISTIANI et al. Prevalence of Antibiotic-resistance Enterobacteriaceae strains Isolated from Chicken Meat at Traditional Markets in Surabaya, Indonesia. **International Conference On Food Science and Engineering**, 193, 2017.

YONG, D. et al. 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. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.53, n.12, p. 5046-54, 2009.

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

ZENG, X. e LIN, J. Beta-lactamase induction and cell wall metabolism in Gram-negative bacteria. **Frontiers in microbiology**, v.4, n. 128, p. 2013.

ZAVASCKI AP, et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo- $\beta$ -lactamase. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 56, v.6, n. p. 1148-1151, 2005.

**APÊNDICE 1** Características genótípicas e perfil de sensibilidade de linhagens de *K. pneumoniae* isoladas do hospital em Manaus.

Isolados	DC	EC	PFGE	ST	CC	Concentração inibitória mínima (CIM) pelo método de microdiluição em caldo (µg/ml)						Resultado do teste de sensibilidade do Vitek® 2 (µg/ml)												
						ERT	IPM	MEM	TGC	CL	PB	FOS	AM	AN	CAZ	CIP	CRO	CXM	FEP	FOX	GM	SAM	TZP	
AMKP1	31/05/2015	U	A1	11	258	≥512	≥512	512	2	0,25	0,01	>256	≥32	16	≥64	≥16	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64	≤1	≥32	≥128
AMKP36	14/05/2015	U	A1			≤0,5	≤0,25	≤0,25	2	≤0,5	0,03	>256	≥32	8	≥64	≥16	≥64	≥64	≥64	≥64	8	≥16	≥32	≥128
AMKP4	13/05/2015	SN	A1	11	258	≥512	≥512	≥512	0,5	>256	>256	>256	≥32	16	≥64	≥16	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64	≤1	≥32	≥128
AMKP10	10/05/2015	HM	A1	11	258	≥512	≥512	512	0,5	64	64	>256	≥32	16	≥64	≥16	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64	≤1	≥32	≥128
AMKP7	07/04/2015	U	A1			≥512	≥512	512	0,5	0,125	0,01	>256	≥32	16	≥64	≥16	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64	≤1	≥32	≥128
AMKP3	18/03/2015	AT	A1			≥512	≥512	≥512	0,5	0,03	0,01	>256	≥32	16	≥64	≥16	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64	≤1	≥32	≥128
AMKP24	26/02/2015	U	A1			≤0,5	≤0,25	≤0,25	0,5	0,01	0,01	>256	≥32	4	≥64	≥16	≥64	≥64	≥64	≥64	16	≥16	≥32	≥128
AMKP14	26/02/2015	ST	A1			≤0,5	≤0,25	≤0,25	0,5	0,01	0,06	>256	≥32	8	≥64	≥16	≥64	≥64	≥64	≥64	8	≥16	≥32	≥128
AMKP22	25/02/2015	U	A2			≤0,5	≤0,25	≤0,25	2	0,5	0,25	>256	≥32	8	≥64	≥16	≥8	≥64	16	16	≤1	≥32	≥128	
AMKP6	26/05/2015	U	A3	11	258	1	1	0,125	2	0,06	0,01	>256	≥32	4	≥64	≥16	≥64	≥64	≥64	≥64	32	≤1	≥64	≥128
AMKP41	21/01/2015	U	A4			≤0,5	≤0,25	≤0,25	1	0,06	0,06	>256	≥32	8	≥64	≥16	≥16	≥16	≥64	8	≥16	≥32	≥128	
AMKP43	14/01/2015	U	A5			≤0,5	≤0,25	≤0,25	0,5	0,5	1	>256	≥32	≤2	≥64	≥16	≥64	≥64	32	8	≥16	≥32	≥128	
AMKP32	16/04/2015	U	A6			≤0,5	≤0,25	≤0,25	0,03	8	≥32	>256	≥32	16	≥64	≥16	≥64	≥64	16	16	≤1	≥32	16	
AMKP2	25/05/2015	U	A7			64	8	32	1	0,06	0,01	>256	≥32	≤2	≥64	≥16	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64	≥16	≥32	≥128
AMKP5	15/05/2015	U	A8	11	258	128	4	8	2	0,5	0,25	>256	≥32	4	≥64	≥16	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64	≥16	≥32	≥128
AMKP42	27/05/2015	U	A9			≤0,5	≤0,25	≤0,25	1	0,25	0,03	>256	≥32	≤2	≥64	≥16	≥64	≥64	≥64	≥64	16	≥16	≥32	≥128
AMKP15	13/05/2015	SN	A10			≤0,5	≤0,25	≤0,25	0,03	0,5	0,06	>256	≥32	≤2	≥64	≥16	≥64	≥64	16	16	≥16	≥32	≥128	
AMKP39	05/03/2015	SU	A11			≤0,5	≤0,25	≤0,25	1	0,06	0,125	>256	≥32	4	4	1	≥64	≥64	2	≤4	≥16	≥32	16	
AMKP21	24/02/2015	U	A12			≤0,5	≤0,25	≤0,25	2	0,25	0,25	>256	≥32	4	2	≥16	≥8	≥64	8	≤4	≥16	≥32	≥128	
AMKP23	26/02/2015	U	A13			≤0,5	≤0,25	≤0,25	2	1	0,25	>256	≥32	≤2	2	≤0,25	≥16	≥16	2	≤4	≥16	≥32	32	
AMKP45	06/04/2015	HM	B1			≤0,5	≤0,25	≤0,25	1	0,125	0,125	>256	≥32	≤2	8	≤0,25	16	≥64	2	≤4	≤1	≥32	64	
AMKP31	13/04/2015	SE	C1			≤0,5	≤0,25	≤0,25	1	2	4	>256	≥32	≤2	4	2	16	≥64	2	≤04	≤1	≥32	8	
AMKP29	01/04/2015	U	C2			≤0,5	≤0,25	≤0,25	0,03	2	0,06	>256	≥32	≤2	4	2	16	≥64	2	≤4	≤1	≥32	8	
AMKP46	21/01/2015	U	D1	307	17	≤0,5	≤0,25	≤0,25	2	0,125	0,06	128	≥32	≤2	8	≥16	≥64	≥64	2	≤04	≥16	≥32	16	
AMKP35	04/05/2015	U	E1	48	258	≤0,5	≤0,25	≤0,25	0,03	0,25	0,125	>256	≥32	≤2	16	≥16	≥64	≥64	8	≥64	≤1	≥32	≥128	
AMKP40	17/04/2015	ST	E2			≤0,5	≤0,25	≤0,25	1	0,125	0,125	>256	≥32	16	16	≥16	≥64	≥64	≥64	≤4	≤1	≥32	≥128	
AMKP33	11/05/2015	U	E3			≤0,5	≤0,25	≤0,25	1	0,25	2	>256	≥32	≤2	≥64	1	≥64	≥64	4	≤4	≤1	≥32	≥128	
AMKP44	23/02/2015	U	E4			≤0,5	≤0,25	≤0,25	1	1	0,5	>256	≥32	4	16	≥16	≥64	≥64	2	≤04	≥16	≥32	32	
AMKP16	20/05/2015	U	F1			≤0,5	≤0,25	≤0,25	1	0,5	0,5	128	≥32	4	8	≥16	≥64	≥64	2	≤4	≥16	≥32	16	
AMKP34	15/05/2015	U	F2			≤0,5	≤0,25	≤0,25	1	0,25	0,01	>256	≥32	4	8	≥16	≥64	≥64	4	≤4	≥16	≥32	≥128	
AMKP28	11/03/2015	U	G1	2540	17	≤0,5	≤0,25	≤0,25	1	0,06	0,125	128	≥32	≤2	≥64	≥16	≥64	≥64	16	≤4	≥16	≥32	≥128	

Continua.

## Continuação

Isolados	DC	EC	PFGE	ST	CC	Concentração inibitória mínima (CIM) pelo método de microdiluição em caldo (µg/ml)										Resultado do teste de sensibilidade do Vitek® 2 (µg/ml)									
						ERT	IPM	MEM	TGC	CL	PB	FOS	AM	AN	CAZ	CIP	CRO	CXM	FEP	FOX	GM	SAM	TZP		
AMKP13	01/01/2015	U	G2			<=0,5	>=0,25	>=0,25	0,03	0,06	0,125	128	>=32	<=2	4	<=0,25	>=64	>=64	2	<=4	<=1	>=32	<=4		
AMKP30	19/03/2015	U	G3			<=0,5	<=0,25	<=0,25	1	2	0,125	128	>=32	4	>=64	>=4	>=64	>=64	8	<=4	>=16	>=32	>=128		
AMKP38	22/05/2015	ST	H1	13	258	<=0,5	<=0,25	<=0,25	0,5	0,06	0,06	128	>=32	<=2	>=64	>=4	>=16	>=64	32	<=4	>=16	>=32	>=128		
AMKP37	19/05/2015	U	I1			<=0,5	<=0,25	<=0,25	2	0,5	0,5	>256	>=32	4	8	>=4	>=64	>=64	2	<=4	>=16	>=32	16		
AMKP27	18/03/2015	ST	I2	2308	258	<=0,5	<=0,25	<=0,25	1	0,125	0,06	>256	>=32	<=2	>=64	0,5	16	16	<=1	<=4	<=1	8	<=4		
AMKP20	23/02/2015	U	J1	320	17	<=0,5	<=0,25	<=0,25	1	0,5	0,5	>256	>=32	<=2	2	<=0,25	16	>=64	2	<=4	<=1	>=32	<=128		
AMKP26	26/03/2015	U	K1	17	17	<=0,5	<=0,25	<=0,25	0,03	0,06	0,125	>256	>=32	<=2	<=1	1	16	>=64	2	<=4	<=1	>=32	8		
AMKP19	15/02/2015	U	K2	2258	23	<=0,5	<=0,25	<=0,25	1	4	2	>256	>=32	4	4	1	>=64	>=64	2	<=4	16	>=32	16		
AMKP9	08/01/2015	LB	L1	2307	17	64	64	32	0,5	0,01	0,01	>256	<=32	<=2	>=64	>=4	>=64	>=64	8	32	<=2	>=32	>=128		

DC = Data da coleta; EC = Espécime clínico; PFGE = pulstipo; ST = Tipo de Sequência; CC = Complexo Clonal; ERT = Ertapenem; IPM = Imipenem; MEM = Meropenem; TGC = Tigeciclina; CL = Colistina; PB = Polimixina B; FOS = Fosfomicina; AM = Ampicillina; AN = Amicacina, CAZ = Ceftazidima, CIP = Ciprofloxacina; CRO = Ceftriaxona; CXM = Cefuroxima; FEP = Cefepima; FOX = Cefoxitina; GM = Gentamicina; SAM = Ampicillina/Sulbactam; TZP = Piperacillina/Tazobactam; ERF = Enfermaria; U = Urina; SN = Secreção Nasal; HM = Hemocultura; AT = Aspirado Traqueal; ST = Secreção Traqueal; SE = Secreção de Epiema; SU, Secreções de úlcera de pressão; LB = Lavado brônquico coleta.

\* As cores em vermelho representa resistência, amarelo intermediário e verde sensível.

\* Pontos de cortes analisados pelo CLSI 2017.



## ANEXO 1. Parecer do comitê de ética

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SÃO CARLOS/UFSCAR

Continuação Parecer 1.406.500

**Recomendações:**

-

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

-

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PR_INFORMAÇÕES BÁSICAS DO PROJETO_432154.pdf	22/12/2015 13:39:13		Aceito
Folha de Rosto	Folhadurosto.pdf	22/12/2015 13:38:27	ROSINEIDE CARDOSO DE SOUZA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta.pdf	15/09/2015 19:23:42	ROSINEIDE CARDOSO DE SOUZA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investidor	Projeto.pdf	15/09/2015 19:22:36	ROSINEIDE CARDOSO DE SOUZA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TermoTCLE.pdf	15/09/2015 19:20:29	ROSINEIDE CARDOSO DE SOUZA	Aceito

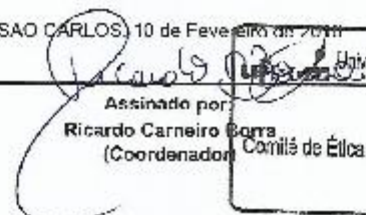
**Situação do Parecer:**

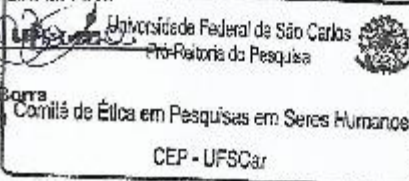
Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SAO CARLOS, 10 de Fevereiro de 2016

  
 Assinado por  
**Ricardo Carneiro Borra**  
 (Coordenador)



Endereço: WASHINGTON LUIZ KM 235

Bairro: JARDIM GUANABARA

UF: SP

Município: SÃO CARLOS

Telefone: (16)331-1883

CEP: 13.565-005

E-mail: cephumanos@ufscar.br

## ANEXO 2. Dados do parecer do comitê de ética

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SÃO CARLOS/UFSCAR



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** MECANISMOS DE RESISTÊNCIA EM LINHAGENS DE ESPÉCIES DE ENTEROBACTERIACEAE PRODUTORAS DE CARBAPENEMASES DE DUAS REGIÕES DO BRASIL

**Pesquisador:** ROSINEIDE CARDOSO DE SOUZA

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 49923215.5.0000.5504

**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE DE SAO PAULO

**Patrocinador Principal:** FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.379.397

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de doutorado vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular da UFSCar.

#### Objetivo da Pesquisa:

Do projeto: "Avaliar o mecanismo de resistência em linhagens de bactérias da família Enterobacteriaceae resistentes aos carbapenems isolados de diversos tipos de infecções de pacientes internados em unidades hospitalares dos estados de Amazonas e Minas Gerais."

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos e benefícios estão bem avaliados. Em especial destaca-se que o projeto não prevê qualquer contato com os participantes e nem a coleta de informações sobre estas pessoas. A justificativa para ausência de TCLE nos parece bem adequada.

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante em seu contexto.

#### Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os documentos obrigatórios estão presentes. Nota-se que a folha de rosto não indica o vínculo do projeto com qualquer instituição o que não parece adequado.

**Endereço:** WASHINGTON LUIZ KM 235

**Bairro:** JARDIM GUANABARA

**CEP:** 13.565-905

**UF:** SP

**Município:** SAO CARLOS

**Telefone:** (16)3351-9683

**E-mail:** cephumanos@ufscar.br