

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

CAMILA MARIA DOS SANTOS BORALLI

Plasmídeos e ambientes genéticos envolvidos na transferência do gene  
*bla<sub>KPC</sub>* em bactérias gram-negativas de origem clínica

São Carlos

2023



CAMILA MARIA DOS SANTOS BORALLI

Plasmídeos e ambientes genéticos envolvidos na transferência do gene  
*bla<sub>KPC</sub>* em bactérias gram-negativas de origem clínica

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada  
Opção: Física Biomolecular  
Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Ilana Lopes Baratella da Cunha Camargo

Versão corrigida

(versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos

2023

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Boralli, Camila

Plasmídeos e ambientes genéticos envolvidos na transferência do gene blaKPC em bactérias gram-negativas de origem clínica / Camila Boralli; orientadora Ilana Camargo - versão corrigida -- São Carlos, 2023.

123 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Física Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2023.

1. blaKPC. 2. Tn4401. 3. NTEKPC. 4. plasmídeos. 5. blaNDM. I. Camargo, Ilana, orient. II. Título.

Ao Guto, que foi namorado, noivo e agora é marido, às minhas irmãs e aos meus pais,  
com amor e gratidão por todo apoio ao longo da realização desse trabalho.



## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof. Dra. Ilana L. B. C. Camargo, por acreditar em mim desde o princípio, pela orientação, pela confiança, compreensão, auxílio, presença e companheirismo, imprescindíveis para a realização desse trabalho.

À CAPES pelo apoio financeiro. O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) Código de financiamento 001.

Ao Hospital Risoleta Tolentino Neves, Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, Hospital João Lúcio Pereira Machado e ao Laboratório Maricondi, pela doação dos isolados estudados nesse trabalho.

À Dra. Fernanda Paganelli e ao Dr. Rob Willem por se disponibilizarem a realizar os sequenciamentos dos genomas dos isolados desse trabalho, sem os quais não seria possível dar continuidade no projeto.

Aos colegas Dr. Julian Paganini e Rodrigo Meneses pela parceria, colaboração e auxílio nas análises bioinformáticas

Às Dras. Anita Schürch, Camila da Mata, Edna Leite pela colaboração no trabalho já publicado descrito como parte dessa tese.

À Geovana, Ana Luisa e Pamela pela ajuda e dedicação na realização de parte dos experimentos desse trabalho.

Ao Instituto de Física de São Carlos e a Universidade de São Paulo pela oportunidade de realização deste projeto de pesquisa de doutorado.

Ao Grupo Cristalografia pela oportunidade de realização desse trabalho.

Às funcionárias do serviço de Biblioteca e Informação do IFSC-USP por todo auxílio e prestatividade.

Aos membros e ex-membros do LEMiMo, em especial, à Gabriela, Luciana, Pamela, Fábio, Giovanna, Ana Flávia e Letícia, por toda ajuda, companheirismo, parceria, risadas e aniversários comemorados.

Aos meus amigos de graduação que ainda são presentes na minha vida, Marina, Guilherme e Nicolau, em nome de quem agradeço a todos os outros que fizeram parte dos meus quatro anos de Biomol. Obrigada pela amizade e por contribuírem para a vida ser mais feliz em São Carlos.

Ao Túlio, Ivan, Natalia, Ana Laura e Guilherme, que foram presentes durante meus primeiros anos na carreira científica, durante minha Iniciação Científica e meu mestrado, e contribuíram para a profissional que me tornei.

Ao Vôlei CAASO por todos os momentos que me proporcionou viver, pelas aprendizagens de vida, por ser refúgio e por ter trazido amigos que seguem comigo.

À minha grande amiga Marina por ser minha parceira de vida, pela amizade e apoio incondicionais.

À minha amiga Luciana por ter sido companhia, refugio, amizade e alegria nestes últimos anos.

À Ana Laura, Paulinha, Yara, Cris, Marília, Ana Luiza e Talita pela amizade, parceria, companheirismo, pela vida compartilhada e acima de tudo serem minha família em São Carlos.

À minha vó Vetti, que é exemplo de luta, persistência e amor.

Aos meus pais, por me proporcionarem alcançar meus objetivos. Obrigada pelo amor e força imensuráveis.

Às minhas irmãs, pelo amor, carinho, apoio, por estarem comigo desde sempre e serem abrigo sempre que preciso.

Ao meu marido Guto, que torna qualquer agradecimento aqui insuficiente. Obrigada por todo amor, parceria, companheirismo, apoio, dedicação e por acreditar em mim quando nem eu mesma acredito.

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho.

Muito obrigada!



*If you can dream it, you can do it.*

**(Walt Disney)**



## RESUMO

BORALLI, C. M. S. **Plasmídeos e ambientes genéticos envolvidos na transferência do gene *bla*<sub>KPC</sub> em bactérias gram-negativas de origem clínica.** 2023. 123p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2023.

A transmissão dos genes que codificam as carbapenemases pode ser mediada por diferentes mecanismos moleculares, como elementos genéticos móveis e plasmídeos. O gene *bla*<sub>KPC</sub> está comumente no transposon Tn4401, porém, esse gene tem sido encontrado em outros ambientes genéticos referidos como NTE<sub>KPC</sub> (*non-Tn4401 element*) e o impacto da mudança de ambiente genético, bem como dos diferentes plasmídeos que o carrega, na estabilidade e disseminação desse gene de resistência ainda é desconhecido. Neste trabalho foram caracterizadas bactérias gram-negativas de diferentes espécies isoladas de hospitais do Brasil contendo o gene *bla*<sub>KPC</sub> em NTE<sub>KPC</sub> e bactérias portadoras dos genes *bla*<sub>KPC</sub> e *bla*<sub>NDM</sub> envolvidas em um surto, com foco em seus ambientes genéticos e plasmídeos. Vinte e nove isolados tiveram seus genomas sequenciados e apresentaram o gene *bla*<sub>KPC</sub> em NTE<sub>KPC</sub>-IId, sendo 27 em um plasmídeo IncQ1 e os outros dois em um plasmídeo IncX3, além de variadas populações de plasmídeos carregando diferentes genes de resistência. O plasmídeo IncX3 é conjugativo e de baixo número de cópias, diferente do plasmídeo IncQ1 que é pequeno, mobilizável e de alto número de cópias, principalmente em *K. pneumoniae*. Não foram observadas relações entre o número de cópias de plasmídeo (NCP) e os valores de concentração inibitória mínima (CIM) de carbapenêmicos para os isolados contendo NTE<sub>KPC</sub>, porém, o NCP parece estar diretamente ligado à espécie que abriga o plasmídeo em questão. O plasmídeo IncQ1 foi transferido para *E. coli* J53 juntamente com um plasmídeo conjugativo sem gerar alterações do *fitness* da bactéria, bem como mantendo valores próximos de CIM de carbapenêmicos, apesar do baixo NCP da transconjugante. Ressalta-se a preocupação de se ter encontrado o gene *mcr-9* em um plasmídeo conjugativo IncHI2/IncHI2A na linhagem *Enterobacter cloacae* BHKPC28, o qual pode ajudar na mobilidade do IncQ1 com o NTE<sub>KPC</sub>, disseminando dois determinantes de resistência a antibióticos de último recurso. Na segunda parte deste estudo, quatro isolados coprodutores de KPC e NDM selecionados pertenciam a um clone ST11 de *K. pneumoniae* extensivamente resistente, responsável por um surto durante a pandemia de COVID-19. O plasmídeo IncN conjugativo de ~56kpb que abrigava *bla*<sub>KPC</sub> em Tn4401 compartilhava uma alta identidade com outros plasmídeos da América Latina e já circulava em 2015 como um elemento maior no mesmo hospital. O gene *bla*<sub>NDM</sub> estava abrigado em um plasmídeo IncC conjugativo de ~102

kpb com outros cinco genes de resistência. O maior número de cópias do plasmídeo *bla*<sub>KPC</sub> pode ter contribuído para a conjugação de somente este gene para *E. coli*, sem alterações de *fitness*. Houve um aumento substancial dos valores de CIM de carbapenêmicos nos transconjugantes em relação a linhagem *E. coli* J53 sem plasmídeo, apesar do fenótipo de sensibilidade. A sensibilidade de *E. coli* a meropenem e imipenem pode ser devido ao baixo número de cópias do plasmídeo que abriga *bla*<sub>KPC</sub> nesta espécie. Como conclusão do nosso estudo não foi encontrada uma diversidade de NTE<sub>KPC</sub>, apenas o NTE<sub>KPC</sub>-IId, na maioria em plasmídeo mobilizável IncQ1, que se apresenta com maior NCP em *Klebsiella pneumoniae*, mas cujo número de cópias não influenciou a CIM dos carbapenêmicos. Já o surto de coprodutoras KPC e NDM se deu devido a disseminação clonal de *K. pneumoniae* ST11 extensivamente resistente com *bla*<sub>KPC</sub> (em Tn4401 em IncN) e *bla*<sub>NDM</sub> em plasmídeos distintos.

Palavras chave: *bla*<sub>KPC</sub>. Tn4401. NTE<sub>KPC</sub>. Plasmídeos. *bla*<sub>NDM</sub>

## ABSTRACT

BORALLI, C. M. S. **Plasmids and genetic environments involved in *bla*<sub>KPC</sub> gene transfer in gram-negative bacteria of clinical origin.** 2023. 123p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2023.

The transmission of genes encoding carbapenemases can be mediated by different molecular mechanisms, such as mobile genetic elements and plasmids. The *bla*<sub>KPC</sub> gene is commonly found in the *Tn4401* transposon, however, this gene has been found in other genetic environments referred to as *NTE*<sub>KPC</sub> (*non-Tn4401 element*) and the impact of changing the genetic environment, as well as the different plasmids that carry them, on the stability and dissemination of this resistance gene is still unknown. In this work, gram-negative bacteria from different species isolated from hospitals in Brazil containing the *bla*<sub>KPC</sub> gene in *NTE*<sub>KPC</sub> and bacteria carrying the *bla*<sub>KPC</sub> and *bla*<sub>NDM</sub> genes involved in an outbreak were characterized, focusing on their genetic environments and plasmids. Twenty-nine isolates had their genomes sequenced and presented the *bla*<sub>KPC</sub> gene in *NTE*<sub>KPC</sub>-IId, 27 in an IncQ1 plasmid and the other two in an IncX3 plasmid, in addition to varied populations of plasmids carrying different resistance genes. The IncX3 plasmid is conjugative and has a low copy number, unlike the IncQ1 plasmid, which is small, mobilized and has a high copy number, mainly in *K. pneumoniae*. No relations were observed between the number of plasmid copies (PCN) and the MIC values of carbapenems for the isolates containing *NTE*<sub>KPC</sub>, however, the PCN seems to be directly linked to the species. The IncQ1 plasmid was transferred to *E. coli* J53 together with a conjugative plasmid without fitness changes, as well as maintaining MIC values to carbapenems, despite the low transconjugant PCN. The concern of having found the *mcr-9* gene in an IncHI2/IncHI2A conjugative plasmid in the *Enterobacter cloacae* BHKPC28 strain is highlighted, which may help in the mobility of IncQ1 with *NTE*<sub>KPC</sub>, disseminating two determinants of resistance to last resort antibiotics. In the second part of this study, four KPC and NDM co-producer isolates belonged to an extensively resistant *K. pneumoniae* ST11 clone responsible for an outbreak during the COVID-19 pandemic. The ~56kpb conjugative IncN plasmid that harbored *bla*<sub>KPC</sub> in *Tn4401* shared a high identity with other plasmids from Latin America and was already circulating in 2015 as a larger element in the same hospital. The *bla*<sub>NDM</sub> gene was in a ~102 kbp conjugative IncC plasmid with five other resistance genes. *bla*<sub>KPC</sub> plasmid PCN may have contributed to the conjugation of only this gene to *E. coli*, without fitness changes. There was a substantial increase in the MIC values of carbapenems in

the transconjugants compared to the plasmid-free *E. coli* J53. strain, despite the sensitivity phenotype. The *E. coli* meropenem and imipenem sensitivity may be due to the low PCN of the plasmid that harbors *bla*<sub>KPC</sub> in this species. As a conclusion of our study, we did not find a diversity of NTE<sub>KPC</sub>, only NTE<sub>KPC</sub>-IId, mostly on the mobilisable plasmid IncQ1, which presents a higher PCN in *Klebsiella pneumoniae*, but whose PCN did not influence the MIC of the carbapenems. The outbreak of KPC and NDM co-producers was due to clonal dissemination of extremely resistant *K. pneumoniae* ST11 with *bla*<sub>KPC</sub> (in Tn4401 in IncN) and *bla*<sub>NDM</sub> in different plasmids.

Keywords: *bla*<sub>KPC</sub>. Tn4401. NTE<sub>KPC</sub>. Plasmids. *bla*<sub>NDM</sub>

## LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 - Mortes atribuíveis à RAM todos os anos em comparação a outras principais causas de morte. ....	25
Figura 2 - Estrutura dos antibióticos $\beta$ -lactâmicos.....	27
Figura 3 - Principais mecanismos de resistência aos antibióticos carbapenêmicos e aos $\beta$ -lactâmicos em geral. ....	29
Figura 4 - Classes de $\beta$ -lactamases e seus espectro de ação. ....	29
Figura 5 - Sistema de classificação de Ambler. ....	30
Figura 6 - Elementos genéticos abrigando o gene <i>bla</i> <sub>KPC</sub> (Tn4401 e NTE <sub>KPC</sub> ). ....	33
Figura 7 - Diversas estratégias de mobilização de elementos móveis. ....	37
Figura 8 - Esquema das etapas realizadas até a seleção das amostras bacterianas para sequenciamento de genoma.....	49
Figura 9 - Valores encontrados para presença ou ausência do gene <i>bla</i> <sub>KPC</sub> , separados por local de isolamento das linhagens.....	58
Figura 10 - Distribuição das amostras bacterianas que apresentam <i>bla</i> <sub>KPC</sub> em Tn4401 ou NTE <sub>KPC</sub> , separados por local de isolamento das linhagens.....	59
Figura 11 - Análise do perfil de bandas obtidos na PFGE dos isolados de <i>K. aerogenes</i> do HRTN. ....	61
Figura 12 - Análise do perfil de bandas obtidos na PFGE dos isolados de <i>E. coli</i> do HRTN. ....	61
Figura 13 - Análise do perfil de bandas obtidos na PFGE dos isolados de <i>K. pneumoniae</i> do HCRP. ....	61
Figura 14 - Análise do perfil de bandas obtidos na PFGE dos isolados de <i>K. pneumoniae</i> do HRTN. ....	62
Figura 15 - Mapa representando os plasmídeos IncQ1 carreando o gene <i>bla</i> <sub>KPC</sub> em 27 dos 29 isolados sequenciados. ....	66
Figura 16 - Mapa representando os plasmídeos IncX3 carreando o gene <i>bla</i> <sub>KPC</sub> em 2 dos 29 isolados sequenciados.....	66
Figura 17 - Esquema da comparação entre os plasmídeos IncQ1 dos 25 isolados que apresentavam o mesmo sem grandes modificações. ....	67
Figura 18 - Esquema da comparação entre os plasmídeos IncX3 de <i>K. pneumoniae</i> RPKP04 e <i>E. coli</i> RPECLO01. ....	68
Figura 19 - Gel de S1 nuclease – PFGE das linhagens <i>K. pneumoniae</i> BHKPC10 (A), <i>E. coli</i> J53 (B) e do transconjugante <i>E. coli</i> J53_pBHKPC10_2_3 (C).....	78
Figura 20 - Curvas de crescimento de <i>E. coli</i> J53 e linhagem transconjugante.....	79
Figura 21 - Mapa representando o plasmídeo pBHKPC28_5 carreando o gene <i>bla</i> <sub>KPC</sub> . ....	81

Figura 22 - Esquema do ambiente genético abrigando o gene <i>mcr-9</i> no plasmídeo pBHKPC28_1 .....	82
Figura 23 - Alta similaridade genômica dos quatro isolados coprodutores de KPC e NDM observada após digestão com XbaI (Thermo Scientific), eletroforese em gel de campo pulsado e análises usando o <i>software</i> <i>Bionumerics</i> v.7.1.....	85
Figura 24 - Esquema da comparação cromossômica utilizando BHKPC104 como referência e comparando BHKPC93 com a referência.....	86
Figura 25 - Informações gerais e comparação entre os plasmídeos de BHKPC93 e BHKPC104.....	91
Figura 26 - Esquema do plasmídeo pBHKPC93_3.....	92
Figura 27 - Esquema do plasmídeo pBHKPC104_3.....	93
Figura 28 - Esquema do plasmídeo pBHKPC93_5.....	94
Figura 29 - Esquema do plasmídeo pBHKPC104_5.....	94
Figura 30 - Esquema da comparação entre pBHKPC93_3 e pBHKPC104_3 com outros plasmídeos IncN abrigando <i>bla<sub>KPC</sub></i> já descritos.....	96
Figura 31 - Gel de S1 nuclease-PFGE dos isolados BHKPC93 (A), BHKPC104 (B), BHKPC107a (C) e BHKPC107b (D), and the transconjugants J53_pBHKPC93_3 (E) and J53_pBHKPC104_3 (F).....	97
Figura 32 - Curvas de crescimento de <i>E. coli</i> J53 e linhagens transconjugantes.....	98



## LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 - Modos de ação e mecanismos de resistência dos antibióticos comumente usados .....	25
Tabela 2 - Oligonucleotídeos utilizados para detecção do transposon Tn4401 <sup>55</sup> .....	46
Tabela 3 - Oligonucleotídeos utilizados para ensaios de qPCR .....	54
Tabela 4 - Distribuição do número de bactérias deste estudo de acordo com as espécies as quais pertencem e aos hospitais onde foram isoladas .....	57
Tabela 5 - Distribuição das amostras bacterianas portadoras do gene <i>bla</i> <sub>KPC</sub> e carreadoras desse gene em NTE <sub>KPC</sub> de acordo com as espécies as quais pertencem e aos hospitais onde foram isoladas.....	59
Tabela 6 - Distribuição das amostras bacterianas portadoras do gene <i>bla</i> <sub>KPC</sub> em NTE <sub>KPC</sub> de acordo com as espécies as quais pertencem e aos hospitais onde foram isoladas .....	60
Tabela 7 - Distribuição das amostras bacterianas portadoras do gene <i>bla</i> <sub>KPC</sub> em NTE <sub>KPC</sub> de acordo com as espécies as quais pertencem e aos hospitais onde foram isoladas. Os grupos destacados representam os isolados submetidos a análises de similaridade por PFGE.....	61
Tabela 8 - Distribuição dos representantes de cada população clonal das amostras bacterianas portadoras do gene <i>bla</i> <sub>KPC</sub> em NTE <sub>KPC</sub> de acordo com as espécies as quais pertencem e aos hospitais onde foram isoladas.....	62
Tabela 9 - Dados de qualidade do sequenciamento de genoma dos 30 isolados e os números de acessos dos genomas anotados .....	63
Tabela 10 - Dados de ST ao qual pertencem e do contexto genético do gene <i>bla</i> <sub>KPC</sub> nos isolados sequenciados .....	64
Tabela 11 - Dados de localização dos genes de resistência em cada isolado e de caracterização das populações de plasmídeos presentes em cada isolado de <i>K. pneumoniae</i> .....	69
Tabela 12 - Dados de localização dos genes de resistência em cada isolado e de caracterização das populações de plasmídeos presentes em cada isolado de <i>K. aerogenes</i> .....	72
Tabela 13 - Dados de localização dos genes de resistência em cada isolado e de caracterização das populações de plasmídeos presentes em cada isolado de <i>Enterobacter</i> spp. ....	73
Tabela 14 - Dados de localização dos genes de resistência em cada isolado e de caracterização das populações de plasmídeos presentes em cada isolado de <i>E. coli</i> .....	74
Tabela 15 - Dados de localização dos genes de resistência em cada isolado e de caracterização das populações de plasmídeos presentes em cada isolado de <i>P. stuartii</i> .....	75

Tabela 16 - Valores de CIM de imipenem e meropenem e do NCP dos plasmídeos carreando <i>bla</i> <sub>KPC</sub> de cada isolado.....	76
Tabela 17 - Dados de tempos de duplicação e comparação de diferença estatística significativa entre linhagens receptoras e suas transconjugantes .....	79
Tabela 18 - Valores de CIM de imipenem e meropenem e do NCP do pBHKPC10_3 nas linhagens doadora, receptora e transconjugante.....	80
Tabela 19 - Dados de localização dos genes de resistência e de caracterização das populações de plasmídeos presentes no isolado <i>E. cloacae</i> BHKPC28.....	81
Tabela 20 - Valores de CIM de imipenem e meropenem e do NCP do pBHKPC10_3 nas linhagens doadora, receptora e transconjugante.....	82
Tabela 21 - Dados gerais e perfil de susceptibilidade dos isolados coprodutores de KPC e NDM .....	83
Tabela 22 - Descrição dos 15 e 11 genes encontrados exclusivamente em BHKPC93 e BHKPC104.....	87
Tabela 23 - Genes de resistência encontrados em BHKPC93 e BHKPC104.....	88
Tabela 24 - Dados de caracterização dos plasmídeos carreando <i>bla</i> <sub>KPC</sub> e <i>bla</i> <sub>NDM</sub> .....	98
Tabela 25 - Média das medidas dos halos obtidos em triplicatas dos ensaios de disco difusão para avaliação de efeito sinérgico entre CAZ-AVI e ATM.....	99

## LISTAS DE ABREVIATURAS

ADP – adenosina di-fosfato

ATM - aztreonam

BHI – do inglês, *Brain and Heart Infusion*

*bla*<sub>KPC</sub> –  $\beta$ -lactamase *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases

CAZ-AVI – ceftazidima-avibactam

CC – complexo clonal

CFDC - cefiderocol

CIM – concentração inibitória mínima

CRE – do inglês, *Carbapenem-Resistant Enterobacterales*

CSB – do inglês, *Cell Suspension Suffer*

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

ESBL – do inglês, *Extended-Spectrum Beta-Lactamases*

HCl – ácido clorídrico

HCRP – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP

HJLPM – Hospital João Lúcio Pereira Machado

HRTN – Hospital Risoleta Tolentino Neves

IRAS – infecções relacionadas à assistência à saúde

IS – do inglês, *Insertion Sequence*

KPC - *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

LB - do inglês, *Lysogeny Broth*

LM – Laboratório Maricondi

MDR – multidroga resistente

MHCA - Mueller Hinton Cátion Ajustado

MLST – do inglês, *Multilocus sequence typing*

NaCl – cloreto de sódio

NCP – número de cópias de plasmídeos

NDM – *New Delhi* Metalo-carbapenemase

NGS - *Next-Generation Sequencing*

NTE<sub>KPC</sub> - do inglês, *non-Tn4401 element carrying bla<sub>KPC</sub>*

PBP – do inglês, *Penicillin-Binding Proteins*

PCR – do inglês, *Polymerase Chain Reaction*

PES - Polietersulfona

PFGE – do inglês, *Pulse Field Gel Eletrophoresis*

qPCR – do inglês, *Quantitative Polymerase Chain Reaction*

RAM – resistência aos antimicrobianos

SDS - Dodecil sulfato de sódio

SNP – do inglês, *Single nucleotide polymorphism*

ST – do inglês, *Sequence Type*

T4CP – do inglês, *Type-IV Coupling Protein*

T4SS – do inglês, *Type-IV Secretion System*

TAE – Tris-Acetato-EDTA

TBE - Tris-Borato-EDTA

TE – tris-EDTA

TED – solução tamponante de extração de DNA

UFC – unidade formadora de colônia

UTI – do inglês, *Urinary tract infection*

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	23
1.1 Antibióticos .....	23
1.2 Resistência antimicrobiana.....	24
1.3 Antibióticos $\beta$ -lactâmicos.....	26
1.3.1 Carbapenêmicos.....	28
1.4 Carbapenemases .....	29
1.4.1 <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase .....	30
1.4.1.1 Disseminação do gene <i>bla</i> <sub>KPC</sub> .....	31
1.4.2 New Delhi carbapenemase .....	33
1.4.2.1 Disseminação do gene <i>bla</i> <sub>NDM</sub> .....	35
1.5 Plasmídeos.....	36
1.6 Coprodução de KPC e NDM na América Latina .....	38
1.7 Opções terapêuticas em casos de coprodução de KPC/NDM.....	39
2 OBJETIVOS.....	41
2.1 Objetivo geral .....	41
2.2 Objetivos específicos.....	41
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
3.1 Bactérias do estudo.....	43
3.1.1 Isolados bacterianos.....	43
3.1.2 Linhagens controle e receptora.....	43
3.2 Extração de DNA genômico.....	43
3.2.1 Para realização de PCR.....	43
3.2.2 Para sequenciamento do genoma.....	44
3.3 Detecção dos genes <i>bla</i> <sub>KPC</sub> e <i>bla</i> <sub>NDM</sub> .....	45
3.4 Detecção do transposon Tn4401.....	46
3.5 Eletroforese em gel de campo pulsado .....	46
3.6 Sequenciamento do genoma .....	48
3.6.1 Sequenciamento usando método da <i>Oxford Nanopore Technologies</i> .....	49
3.6.2 Sequenciamento de genoma usando método <i>Illumina</i> . .....	49
3.7 Análises bioinformáticas .....	50
3.8 Ensaio de conjugação.....	51

3.9 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) .....	52
3.10 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos por disco-difusão .....	53
3.11 Curva de crescimento e tempo de duplicação da população bacteriana .....	53
3.12 Ensaio de sinergismo entre ceftazidima/avibactam e aztreonam por disco difusão .....	54
3.13 Determinação do número de cópias dos plasmídeos .....	54
3.14 Determinação do fenótipo de mucosidade .....	55
3.15 Determinação do número e tamanho dos plasmídeos .....	56
3.16 Tipagem por sequenciamento de multilocus .....	56
4 RESULTADOS .....	57
4.1 Análise da diversidade e impacto de NTE <sub>KPC</sub> e seus plasmídeos na disseminação do gene <i>bla</i> <sub>KPC</sub> em diferentes espécies .....	57
4.1.1 Seleção dos isolados .....	57
4.1.2 Seleção de isolados carreadores do gene <i>bla</i> <sub>KPC</sub> em NTE <sub>KPC</sub> .....	57
4.1.3 Seleção de representantes clonais .....	60
4.1.4 Sequenciamento do genoma .....	62
4.1.5 Análises iniciais dos sequenciamentos de genoma .....	63
4.1.6 Disseminação do gene <i>bla</i> <sub>KPC</sub> dentre os isolados sequenciados .....	64
4.1.7 Isolados apresentaram diferentes populações de plasmídeos .....	68
4.1.8 Análise comparativa dos valores de CIM de carbapenêmicos e NCP dos plasmídeos carregando <i>bla</i> <sub>KPC</sub> .....	75
4.1.9 Análise da transferência dos plasmídeos carregando <i>bla</i> <sub>KPC</sub> .....	77
4.1.10 Caracterização da linhagem transconjugante .....	79
4.1.11 Descrição de linhagem carregando <i>bla</i> <sub>KPC</sub> e <i>mcr-9</i> .....	80
4.2 Caracterização de plasmídeos carregando <i>bla</i> <sub>KPC-2</sub> e <i>bla</i> <sub>NDM-1</sub> de uma disseminação clonal de <i>K. pneumoniae</i> do ST11 .....	82
4.2.1 Disseminação de um clone de <i>K. pneumoniae</i> durante a pandemia de COVID-19 .....	83
4.2.2 Os isolados de <i>K. pneumoniae</i> possuem 16 genes de resistência distribuídos em quatro dos seus seis plasmídeos .....	90
4.2.3 Uma busca retrospectiva por plasmídeos <i>bla</i> <sub>KPC</sub> .....	95
4.2.4 O impacto da presença do plasmídeo carregando <i>bla</i> <sub>KPC</sub> em <i>E. coli</i> J53 .....	96
4.2.5 Efeito sinérgico entre CAZ-AVI e ATM possibilita tratamento de infecções causadas pelas linhagens do estudo .....	98
5 DISCUSSÃO .....	101

5.1 Análise da diversidade e impacto de NTE <sub>KPC</sub> e seus plasmídeos na disseminação do gene <i>bla</i> <sub>KPC</sub> em diferentes espécies. ....	101
5.2 Caracterização de plasmídeos carreando <i>bla</i> <sub>KPC-2</sub> e <i>bla</i> <sub>NDM-1</sub> de uma disseminação clonal de <i>K. pneumoniae</i> do ST11. ....	105
6 CONCLUSÕES .....	109
REFERÊNCIAS .....	111





# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Antibióticos

Por milhares de anos, as pessoas foram expostas indefesamente a vários tipos de infecções, que, muitas vezes, custaram vidas. Devido à falta de conhecimento, a busca por estratégias para combater, curar e prevenir a propagação de doenças transmissíveis foi infrutífera por muito tempo.<sup>1</sup> Dessa forma, a introdução de antibióticos na prática clínica foi indiscutivelmente o maior avanço médico do século XX.<sup>2-3</sup>

A descoberta da penicilina em 1928 deu início à era de ouro da descoberta de antibióticos de produtos naturais atingindo o pico em meados da década de 1950.<sup>2</sup> Os antibióticos foram inicialmente vistos como “medicamentos milagrosos”, principalmente porque foram introduzidos em uma época em que apenas a drenagem cirúrgica ou curas espontâneas estavam disponíveis para tratar infecções bacterianas graves.<sup>4</sup> Em pouco mais de 100 anos, os antibióticos mudaram drasticamente a medicina moderna e prolongaram a expectativa de vida humana média em 23 anos.<sup>2</sup>

Antibiótico pode ser definido como um produto químico orgânico de origem natural ou sintética que inibe ou mata bactérias patogênicas.<sup>1</sup> Durante as cinco ou seis décadas desde a sua introdução, várias classes desses fármacos tornaram-se disponíveis, incluindo sulfonamidas e trimetoprim, penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos, cloranfenicol, tetraciclina, macrolídeos, estreptograminas, rifamicinas, glicopeptídeos, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, oxazolidinonas, lipoglicopeptídeos e suas variações.<sup>4</sup>

Os antibióticos transformaram a medicina moderna. Além de tratar doenças infecciosas, possibilitaram muitos procedimentos médicos modernos, incluindo tratamento de câncer, transplantes de órgãos e cirurgia de coração aberto, e demais terapias e procedimentos vitais.<sup>2,5</sup>

No entanto, apesar desse sucesso, seu uso continuado no século XXI está ameaçado por dois desafios. O primeiro é que os microrganismos alvos dessas moléculas desenvolvem resistência a elas ao longo do tempo e o segundo é que a descoberta e o desenvolvimento de antibióticos não são mais vantajosos economicamente.<sup>5</sup> Desenvolver novos antibióticos é uma tarefa desafiadora por vários motivos, desde a descoberta de uma nova molécula até várias questões comerciais e regulatórias.<sup>6-7</sup> A descoberta de novos antibióticos é tecnicamente exigente e financeiramente inviável, pois requer tempo, esforço e gastos consideráveis com baixo retorno do investimento.<sup>6,8</sup> Consequentemente, há um número cada vez menor de

empresas e laboratórios dedicados ao fornecimento de novos antibióticos, resultando em cenário que ameaça o controle de infecções.<sup>5</sup>

## **1.2 Resistência antimicrobiana**

Os antibióticos salvam vidas, mas sempre que são usados - em pessoas, animais ou na agricultura - podem selecionar bactérias resistentes.<sup>9</sup> Devido ao uso incorreto dos antibióticos, a resistência antimicrobiana está aumentando a níveis perigosamente altos em todas as partes do mundo. Mecanismos de resistência estão emergindo e se espalhando globalmente, ameaçando a capacidade de tratar doenças infecciosas comuns. Infecções como pneumonia, tuberculose, gonorreia, doenças transmitidas por alimentos e infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) estão cada vez mais difíceis e, algumas vezes, impossíveis, de serem tratadas. Sem ação urgente, caminhamos para uma era pós-antibiótico, na qual infecções comuns e ferimentos leves podem se tornar fatais.<sup>10</sup>

Dada a facilidade e a frequência com que as pessoas viajam atualmente e o fato de muitas pessoas realizarem o “turismo médico” (deslocamento de pessoas em busca de algum procedimento médico), a resistência aos antimicrobianos (RAM) é um problema global. Dessa forma, a RAM exige esforços de todas as nações e muitos setores, sendo classificada pela Organização Mundial da Saúde, em 2019, como uma das 10 ameaças à saúde global.<sup>9,11-12</sup> Estima-se que anualmente fungos e bactérias resistentes a antibióticos causem mais de 2,8 milhões de infecções e aproximadamente 35.900 mortes anualmente nos Estados Unidos.<sup>9</sup>

Com base em cenários de aumento da resistência a medicamentos para seis patógenos até 2050, um estudo estimou que, a menos que sejam tomadas medidas, o número de mortes devido à RAM pode chegar a 10 milhões por ano em 2050, a um custo cumulativo para a produção econômica global de US\$ 100 trilhões (Figura 1).<sup>13</sup>

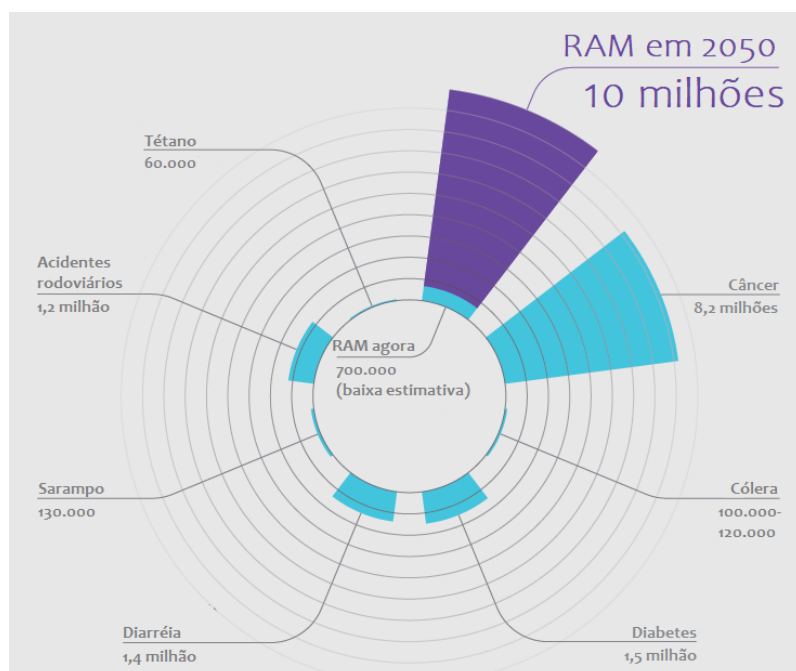


Figura 1 - Mortes atribuíveis à RAM todos os anos em comparação a outras principais causas de morte. Fonte: Adaptada de O'NEILL<sup>13</sup>

Classicamente, a resistência aos antibióticos tem sido definida a partir de um ponto de vista operacional. Este classifica as bactérias como resistentes ou sensíveis, com base na possibilidade de tratar as infecções por elas produzidas.<sup>14</sup>

Para inibir o crescimento bacteriano, os antibióticos devem primeiro atravessar os envoltórios celulares. Além disso, alguns podem precisar ser ativados e todos devem atingir seu alvo em uma concentração adequada para exercer um efeito.<sup>14</sup> Nessas etapas que se fundamentam os mecanismos clássicos de resistência, de forma que uma ampla gama de mecanismos bioquímicos e fisiológicos pode ser responsável pela mesma.<sup>14-15</sup> Um banco de dados recente lista a existência de mais de 20.000 genes de resistência em potencial de quase 400 tipos diferentes, previstos principalmente a partir de sequências disponíveis do genoma bacteriano.<sup>15-16</sup> Um compilado dos antibióticos comumente usados, seus modos de ação e mecanismos de resistência está apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 - Modos de ação e mecanismos de resistência dos antibióticos comumente usados

Classe de antibiótico	Exemplo (s)	Alvo	Mecanismo (s) de resistência
$\beta$ -Lactâmicos	Penicilinas (ampicilina), cefalosporinas (cefamicina), carbapenêmicos (meropenem), monobactamicoss (aztreonam)	Biossíntese de peptidoglicano	Hidrólise, efluxo, alvo alterado

(continua)

(continuação)

Aminoglicosídeos	Gentamicina, estreptomicina, espectinomicina	Tradução	Fosforilação, acetilação, nucleotidilação, efluxo, alvo alterado
Glicopeptídeos	Vancomicina, teicoplanina	Biossíntese de peptidoglicano	Reprogramando a biossíntese de peptidoglicano
Tetraciclina	Minociclina, Tigeciclina	Tradução	Monooxigenação, efluxo, alvo alterado
Macrolídeos	Eritromicina, azitromicina	Tradução	Hidrólise, glicosilação, fosforilação, efluxo, alvo alterado
Oxazolidinonas	Linezolida	Tradução	Efluxo, alvo alterado
Fenicóis	Cloranfenicol	Tradução	Acetilação, efluxo, alvo alterado
Quinolonas	Ciprofloxacino	Replicação DNA	Acetilação, efluxo, alvo alterado
Pirimidinas	Trimetoprim	Metabolismo C <sub>1</sub>	Efluxo, alvo alterado
Sulfonamidas	Sulfametoxazol	Metabolismo C <sub>1</sub>	Efluxo, alvo alterado
Rifamicinas	Rifampina	Transcrição	ADP-ribosilação, efluxo, alvo alterado
Lipopeptídeos	Daptomicina	Membrana celular	Alvo alterado
Peptídeos catiônicos	Colistina	Membrana celular	Efluxo, alteração de carga de membrana, alvo alterado

Fonte: Adaptada de DAVIES; DAVIES<sup>15</sup>

### 1.3 Antibióticos $\beta$ -lactâmicos

Os principais antibióticos utilizados na prática clínica e testados em laboratório são divididos em dois grandes grupos: os  $\beta$ -lactâmicos e os não  $\beta$ -lactâmicos.<sup>17</sup>

Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos são atualmente a classe mais utilizada de agentes antibacterianos no arsenal de doenças infecciosas. Representam 65% de todas as prescrições de antibióticos injetáveis nos Estados Unidos<sup>18</sup> e são caracterizados por apresentar em sua estrutura um anel  $\beta$ -lactâmico, que é o responsável pela sua ação antimicrobiana.<sup>17</sup> Essa classe de antibióticos age inibindo a biossíntese da parede celular bacteriana como resultado da ligação covalente às chamadas proteínas ligadoras de penicilina (PBPs, do inglês *penicillin-binding proteins*). Estas são enzimas envolvidas nas etapas terminais da ligação cruzada de peptidoglicano em bactérias gram-negativas e gram-positivas.<sup>18-19</sup> Os  $\beta$ -lactâmicos podem ser divididos em quatro classes/categorias de antibióticos: penicilinas, cefalosporinas, monobactâmico e carbapenêmicos (Figura 2).<sup>17</sup>

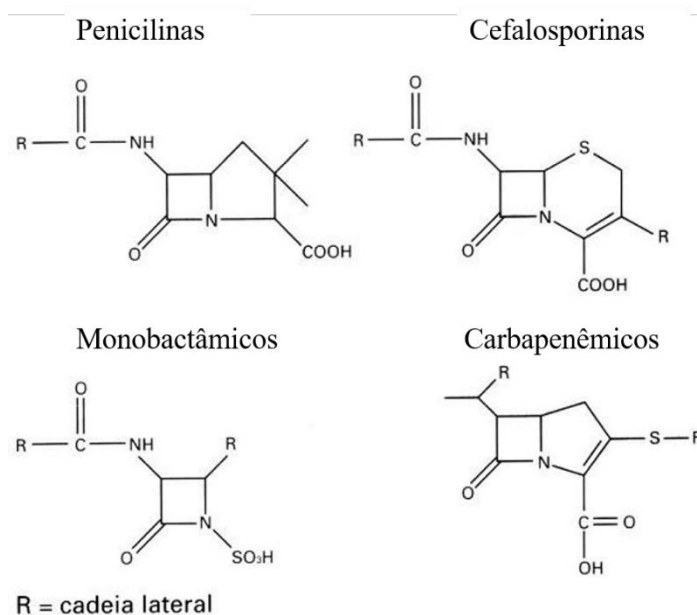


Figura 2 - Estrutura dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos.  
 Fonte: Adaptada de WILLIAMS.<sup>20</sup>

Dentre os principais mecanismos de resistência das bactérias contra antibióticos, se encontram: redução ou defeito na permeabilidade da membrana externa, sistemas de efluxo hiperexpressos, alteração do sítio alvo, proteção ou bloqueio do sítio alvo, e produção de enzimas que degradam ou modificam antibióticos.<sup>17</sup> Neste último, milhares de enzimas que podem degradar e modificar antibióticos de diferentes classes, incluindo  $\beta$ -lactâmicos, aminoglicosídeos, fenicóis e macrolídeos, já foram identificadas.<sup>21</sup> As  $\beta$ -lactamases são as principais enzimas de degradação de antibióticos e agem sobre a classe dos  $\beta$ -lactâmicos através da catálise hidrolítica do anel que dá nome a classe. Assim, torna esses fármacos inativos, o que possibilita biossíntese normal da parede celular da bactéria.<sup>17</sup> Atualmente, existem mais de 32 famílias (ou tipos) de  $\beta$ -lactamases, constituindo mais de 4000 variantes conhecidos.<sup>17,22-23</sup> As  $\beta$ -lactamases são classificadas de acordo com sua sequência de aminoácidos ou sua funcionalidade, ou seja, sua especificidade de substrato.<sup>24</sup>

A expansão das classes de antibióticos para incluir derivados que possuem propriedades melhoradas foi refletida no surgimento de enzimas hidrolíticas que alteraram o seu espectro de atividade. As  $\beta$ -lactamases primitivas, que eram ativas contra  $\beta$ -lactâmicos de primeira geração, foram seguidas por  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBLs) e carbapenemases. Independentemente do mecanismo, a característica comum tem sido a rápida disseminação e expansão da resistência em um período relativamente curto de tempo.<sup>21</sup>

### 1.3.1 Carbapenêmicos

Os carbapenêmicos são um poderoso grupo de antibióticos de amplo espectro que, em muitos casos, são os últimos recursos contra infecções bacterianas multirresistentes. São antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, mas ligeiramente diferentes da penicilina pela presença de um átomo de carbono em substituição a um átomo de enxofre e adição de uma ligação dupla ao anel de cinco membros do núcleo da penicilina (Figura 2).<sup>24-26</sup>

Imipenem, meropenem e ertapenem são os carbapenêmicos disponíveis atualmente na prática clínica nos EUA, Europa e Brasil. Meropenem é mais ativo contra bactérias gram-negativas enquanto o imipenem é mais ativo contra gram-positivas. Vale ressaltar que o ertapenem não tem atividade contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*.<sup>27</sup>

A prescrição de carbapenêmicos está aumentando amplamente em todo o mundo devido à sua relativa segurança e eficácia na resolução da maioria das infecções bacterianas multidroga-resistentes (MDR). Isso está desencadeando e levando à seleção de resistência aos carbapenêmicos entre um número crescente de patógenos bacterianos gram-negativos, incluindo *Enterobacterales*, *P. aeruginosa* e *A. baumannii*. A crescente incidência e prevalência mundial destes microrganismos com resistência aos carbapenêmicos reflete em taxas de mortalidade variando de 6,6% a 20%. Assim, são considerados ameaças globais à saúde humana e animal.<sup>24,28-29</sup>

De forma semelhante aos demais  $\beta$ -lactâmicos, a resistência aos carbapenêmicos envolve vários mecanismos. Dentre eles estão alterações na permeabilidade da membrana externa mediada por alterações em porinas, super expressão de sistemas de efluxo juntamente com hiperprodução de AmpC  $\beta$ -lactamases ou  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBLs), ou mais comumente, a produção de carbapenemases (Figura 3).<sup>30</sup>

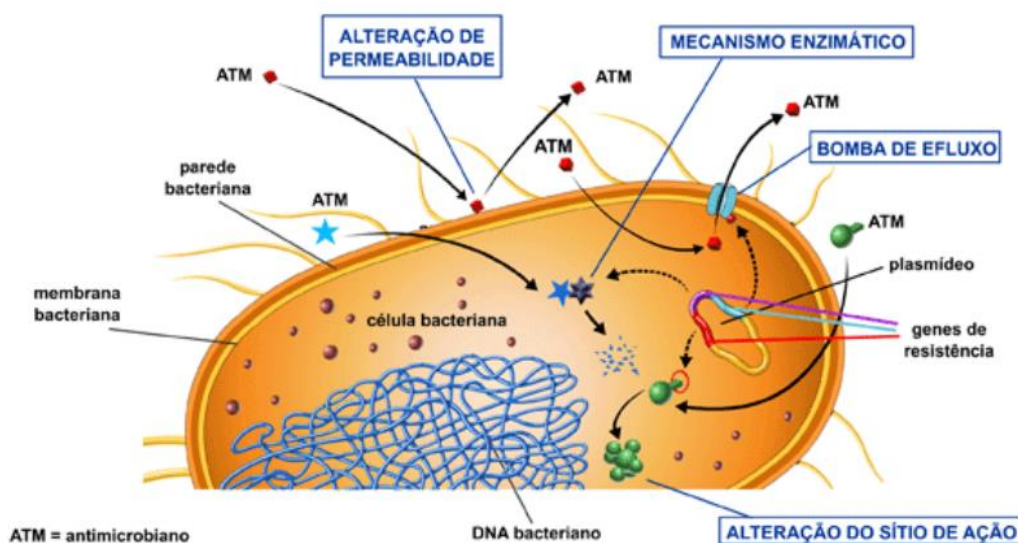


Figura 3 - Principais mecanismos de resistência aos antibióticos carbapenêmicos e aos  $\beta$ -lactâmicos em geral. Fonte: [http://www.anvisa.gov.br/servicosauade/controlere/rede\\_rm/cursos/rm\\_controlere/opas\\_web/modulo3/mec\\_animacao.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicosauade/controlere/rede_rm/cursos/rm_controlere/opas_web/modulo3/mec_animacao.htm) – Acesso em 13 fev. 2022.

#### 1.4 Carbapenemases

As carbapenemases são enzimas com o maior espectro/potencial de degradação de  $\beta$ -lactâmicos. Recebem esse nome por conferirem resistência aos antibióticos carbapenêmicos, apesar de terem potencial para hidrolisar praticamente todos os  $\beta$ -lactâmicos (Figura 4).<sup>17,24,31-32</sup> Embora os genes codificantes para essas enzimas tenham sido identificados primeiramente apenas em cromossomos, muitos são agora mediados por plasmídeos.<sup>21,33</sup>

Principais beta-lactamases (Exemplos)	Classe/subclasse de antibiótico beta-lactâmico#						
	Penicilinas	Cefens			Monobactâmico	Penens	
		Cefamicinas	Cefalosporinas 1ª e 2ª gerações	Cefalosporinas 3ª geração	Cefalosporinas 4ª geração	Carbapenêmicos	
	AMP, AMX	FOX	CFZ, CFX	CTX <sup>a</sup> , CAZ	CPM	ATM	ERT, IPM, MER
AmpC (CMY)							
Hiperprodução de AmpC (CMY)					Não degrada CPM		
Cefalosporinase (TEM, SHV)							
ESBL (variantes TEM e SHV; CTX-M)		Não degrada FOX					
Carbapenemase-MBL (IMP, VIM, SPM, NDM)						Não degrada ATM	
Carbapenemase-serina (KPC)							

Figura 4 - Classes de  $\beta$ -lactamases e seu espectro de ação. Fonte: Adaptada de ANDRADE; DARINI.<sup>17</sup>

As carbapenemases são amplamente divididas em dois tipos principais com base nas sequências de aminoácidos. As metalo  $\beta$ -lactamases (Classe B) contém zinco no sítio ativo; e as serina  $\beta$ -lactamases (Classes A, C e D) contém serina no sítio ativo (Figura 5).<sup>34</sup>

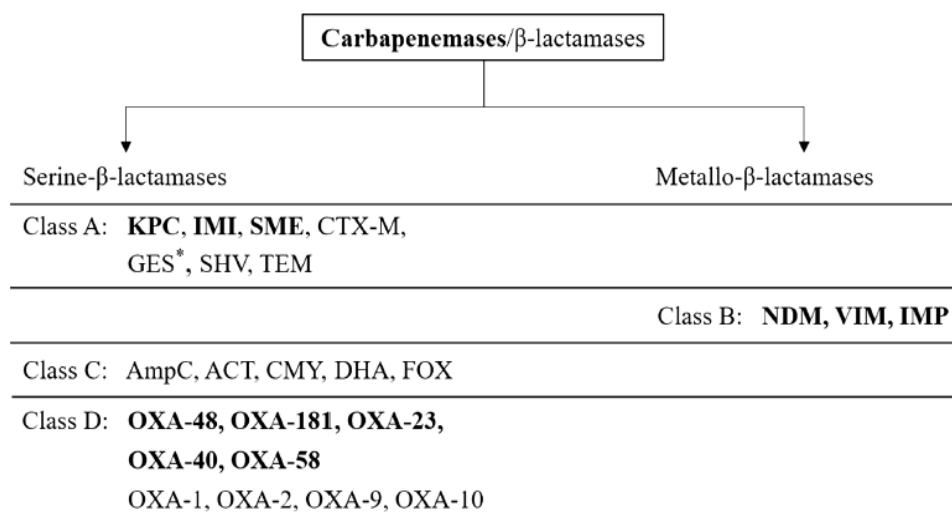


Figura 5 - Sistema de classificação de Ambler.

Fonte: Adaptada de TAGGAR *et al.*<sup>26</sup>

#### 1.4.1 *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

Existem diferentes serina-carbapenemases em bactérias gram-negativas, mas a codificada pelo gene *bla<sub>KPC</sub>* (beta-lactamase *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases) tem ganhado atenção mundial. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) foi identificada pela primeira vez em 1996 em um isolado de *Klebsiella pneumoniae*, na Carolina do Norte, EUA, em um plasmídeo não-conjugativo.<sup>21,24,35-36</sup>

Atualmente, KPC é a serina carbapenemase mais significativa clinicamente no Brasil, Estados Unidos e na maioria dos países do mundo, e sua rápida disseminação internacional a tornou uma ameaça à saúde pública mundial.<sup>30,33,37</sup> Enzimas KPC são  $\beta$ -lactamases de classe Ambler A, compreendendo cerca de 90 variantes, com predominância de KPC-2 e KPC-3.<sup>23,38-39</sup>

KPC tem sido encontrada em muitas espécies de bactérias gram-negativas, incluindo bactérias da ordem *Enterobacteriales* e não fermentadores (por exemplo, *P. aeruginosa* e *A. baumannii*) - com *K. pneumoniae* sendo a espécie mais predominante. Esta enzima foi considerada como globalmente encontrada.<sup>21,24,30,35-36</sup> Frequentemente associada a IRAS, como



infecções do trato urinário, septicemia, pneumonia e infecções intra-abdominais, KPC não é comum em infecções adquiridas na comunidade.<sup>30,33,37</sup>

No Brasil, a primeira detecção de KPC foi em 2006, em isolados de Recife, que foram reportados três anos depois.<sup>40-41</sup> Desde então, essa enzima foi identificada em isolados de várias espécies ao redor do país. Resultados do *SENTRY Antimicrobial Surveillance Program* com linhagens da América Latina indicaram que, em 2012, a taxa de *Klebsiella* spp. não sensíveis a meropenem foram mais altas no Brasil (11,1%), seguida pela Argentina (8,2%), Chile (5,0%), e México (0,8%). *K. pneumoniae* produtoras de KPC não foram detectadas em 2008, mas surgiram em 2009 (10 linhagens) e aumentaram significativamente em 2010.<sup>42</sup> O gene *bla*<sub>KPC-2</sub> foi detectado em 65,9% das linhagens de *K. pneumoniae* não sensíveis a carbapenêmicos. Um estudo conduzido em São Paulo indicou um aumento na taxa de resistência a carbapenêmicos de 6,8% a 35,5% entre 2011 e 2015, e *bla*<sub>KPC-2</sub> foi detectado em 96,2% dos isolados resistentes a carbapenêmicos.<sup>42-43</sup> Karlowsky *et al.*, 2017 também indicou que *bla*<sub>KPC</sub> é a causa da maioria das resistências a carbapenêmicos em *K. pneumoniae* na América do Sul.

Em um estudo realizado com o intuito de analisar o impacto da pandemia de COVID-19 nos genes codificantes para carbapenemases no Brasil foram analisadas linhagens isoladas entre 2015 e 2022, identificando uma diminuição da taxa de detecção de *bla*<sub>KPC</sub> em *Enterobacterales* de 74,5% em 2015 para 55,1% em 2022.<sup>44</sup> Essa mesma diminuição também foi relatada em outro estudo brasileiro. A mesma pode ser explicada por vários fatores, como a utilização de métodos de detecção do gene nos hospitais e o número de isolados testados no estudo para *bla*<sub>KPC</sub> que incluíam linhagens resistentes à polimixina, mas não necessariamente aos carbapenêmicos. Por fim, o fato de o mesmo estudo ter observado um aumento na detecção do gene *bla*<sub>NDM</sub> pode indicar uma possível substituição das carbapenemases no Brasil.<sup>44-45</sup> Vale ressaltar, que em comparação com o início pré-pandêmico, a taxa de detecção de *bla*<sub>KPC</sub> em *Enterobacterales* aumentou de 57,1% para 61,8% no período pós-início.<sup>44</sup>

#### 1.4.1.1 Disseminação do gene *bla*<sub>KPC</sub>

A transmissão do gene que codifica a KPC, *bla*<sub>KPC</sub>, pode ser mediada por diferentes mecanismos moleculares, desde a mobilidade de pequenos elementos genéticos até a transferência horizontal de plasmídeos e via disseminação clonal.<sup>30,46</sup>

No caso da espécie *K. pneumoniae*, onde KPC é mais encontrada, a disseminação internacional foi associada ao ST258 (ST, do inglês, *sequence type*) e foi relatada em mais de

vinte e cinco países de quatro continentes.<sup>30,47</sup> O ST258 é responsável por mais de 77% dos surtos nos EUA e 90% de todas as infecções de *K. pneumoniae* produtora de KPC em Israel.<sup>48-49</sup> Os fatores que contribuem para o sucesso epidemiológico do ST258 permanecem desconhecidos. No entanto, fatores cromossômicos ou mediados por plasmídeos, além da resistência aos antibióticos, podem aumentar o *fitness* da linhagem e fornecer uma vantagem que auxilia sua prevalência.<sup>50-52</sup>

No Brasil, o CC258, grupo clonal ao qual ST258 pertence, é o principal, e ST11 e ST437 foram descritos como os mais frequentes. Porém, um estudo relatou que ST258 foi o clone principal em seis hospitais localizados em duas regiões distantes.<sup>53-54</sup>

O gene *bla*<sub>KPC</sub> foi originalmente encontrado associado ao Tn4401, um transposon do tipo-Tn3.<sup>55-57</sup> Além do gene *bla*<sub>KPC</sub>, o Tn4401 possui um gene de uma transposase (*tnpA*), uma resolvase (*tnpR*), e duas sequências de inserção (IS) (*ISKpn6* e *ISKpn7*). A esse ambiente genético e suas isoformas atribui-se a mobilidade do gene, bem como aos plasmídeos conjugativos onde este transposon é encontrado.<sup>55,58-59</sup> Em adição a transferência horizontal, também ocorre a disseminação vertical do gene através da multiplicação de clones contendo esse elemento.<sup>30</sup>

Apesar da maioria dos genes *bla*<sub>KPC</sub> estarem no Tn4401, esse gene tem sido encontrado em outros ambientes genéticos referidos como elementos não-Tn4401 carreando *bla*<sub>KPC</sub> (NTE<sub>KPC</sub>, do inglês, *non-Tn4401 element carrying bla*<sub>KPC</sub>) (Figura 6).<sup>30,55,60</sup> O Laboratório de Epidemiologia e Microbiologia Moleculares (LEMiMo), liderado pela Prof. Ilana Camargo na Universidade de São Paulo na cidade de São Carlos, em 2018, identificou um novo NTE<sub>KPC</sub> em um plasmídeo IncX5 em *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* que se disseminou e causou um surto de *K. pneumoniae* produtora de KPC em um hospital em Manaus (AM, Brasil). Esse NTE<sub>KPC</sub> é similar ao NTE<sub>KPC-Ia</sub> do pKP048 identificado na China e nunca havia sido descrito no Brasil.<sup>61</sup>

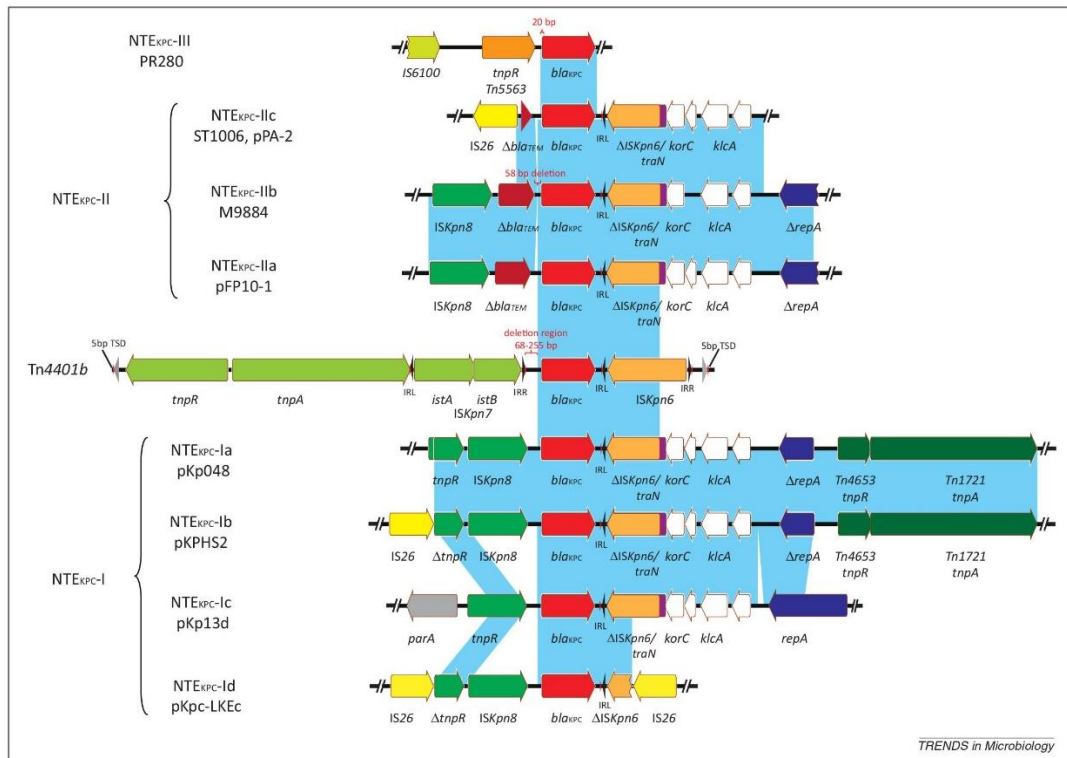


Figura 6 - Elementos genéticos abrigando o gene *bla*<sub>KPC</sub> (Tn440I e NTE<sub>KPC</sub>).  
 Fonte: Adaptada de CHEN *et al.* <sup>30</sup>

O impacto da mudança de ambiente genético na estabilidade e disseminação desse gene de resistência ainda é desconhecido.<sup>61</sup> Como o *bla*<sub>KPC</sub> era comumente detectado no Tn440I, a vigilância da disseminação do gene em outros ambientes genéticos raramente foi realizada em estudos brasileiros.<sup>41,62-63</sup>

#### 1.4.2 New Delhi carbapenemase

*New Delhi* carbapenemase (NDM) é uma das metalo β-lactamases de classe B, codificada pelo gene *bla*<sub>NDM</sub>.<sup>64</sup> *bla*<sub>NDM</sub> foi identificado pela primeira vez em uma linhagem de *K. pneumoniae* isolada de um paciente sueco que estava hospitalizado em Nova Deli, na Índia, em 2008.<sup>65-66</sup> Desde então, este gene tem sido encontrado em várias espécies de *Enterobacteriales*, *Acinetobacter* spp. e *Pseudomonas* spp.<sup>66</sup>

NDM é capaz de hidrolisar a maioria dos β-lactâmicos (incluindo carbapenêmicos), com exceção dos monobactâmicos, e sua ação não pode ser prevenida por inibidores de β-lactamase disponíveis como avibactam, clavulanato, sulbactam e tazobactam.<sup>65-67</sup> Até o momento, já foram identificadas cerca de 55 variantes do gene *bla*<sub>NDM</sub>, em mais de 60 espécies de 11 famílias bacterianas.<sup>23,66-67</sup> NDM-1 é a variante principal, sendo a mais comum em isolados de *K.*

*pneumoniae*, *Enterobacter* spp. e *Acinetobacter* spp., enquanto NDM-5 é a mais comum em *E. coli*. NDM é rara em *P. aeruginosa*, com VIM sendo a metalo  $\beta$ -lactamase mais comum nesta espécie.<sup>66,68</sup>

Linhas produtoras de NDM têm sido identificadas em todo o mundo, com a maior prevalência ocorrendo no subcontinente indiano, Oriente Médio e Balcãs, onde ocorrem amplamente em infecções hospitalares e comunitárias, e também em águas urbanas contaminadas.<sup>66-67</sup>

No Brasil, *Enterobacterales* produtoras de NDM foram detectadas pela primeira vez em 2014, em um isolado de *Providencia rettgeri* recuperado de *swabs* de vigilância na região sul. Desde então, um número crescente de enzimas NDM foi relatado em diferentes espécies e em todas as cinco regiões administrativas. A enzima foi detectada principalmente em *K. pneumoniae* provenientes de amostras clínicas e de vigilância.<sup>69-70</sup>

O programa de vigilância global SMART indicou uma prevalência relativamente baixa de NDM em isolados coletados de 2008 a 2014.<sup>66,71</sup> No programa SMART, a prevalência de isolados positivos para NDM variou significativamente entre os países: até 5,01% nos Emirados Árabes Unidos (EAU), 6,15% no Egito, 6,22% na Índia e 6,26% na Sérvia.<sup>66,71</sup> Taxas crescentes de CRE (do inglês, *carbapenem-resistant Enterobacterales*) produtoras de NDM foram relatadas por um sistema de vigilância global. Um recente estudo brasileiro de centro único relatou um aumento constante na ocorrência de patógenos produtores de NDM entre CRE, de 4% em 2015 para 24 % em 2020.<sup>31,69,72</sup>

No Brasil, um estudo realizado com amostras bacterianas coletadas de 2015-2022 mostrou que a taxa de detecção de *bla*<sub>NDM</sub> em *Enterobacterales* aumentou de 4,1% em 2015 para 39,4% em 2022, sendo que esses aumentos se tornaram mais evidentes a partir de 2017.<sup>44</sup> Foi identificado um pico de detecção em 2022 para *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., e *Klebsiella pneumoniae*, com aumentos anuais de 75,7%, 47,1% e 39,5%, respectivamente.<sup>44</sup> Além disso, observou-se que o aumento se deu principalmente nos anos de pandemia (2020, 2021 e, principalmente, em 2022), sendo esse aumento de 18,7% para 28,0%. Uma hipótese levantada para esse aumento nos anos de pandemia é a disseminação clonal relacionada a hospitais superlotados, e o uso indiscriminado de antibióticos.<sup>44,73</sup>

A disseminação dessa enzima envolve predominantemente a transferência do gene *bla*<sub>NDM-1</sub> entre plasmídeos e surtos clonais. Bactérias com NDM-1 são tipicamente resistentes a quase todos os antibióticos, de forma que a detecção e a vigilância correta são cruciais.<sup>67</sup>

### 1.4.2.1 Disseminação do gene *bla*<sub>NDM</sub>

Dentre os isolados bacterianos NDM-positivos, a maior incidência é das espécies *K. pneumoniae*, *Acinetobacter* spp., e *Enterobacter* spp. Linhagens de *K. pneumoniae* e *E. coli* produtoras de NDM estão distribuídas em mais de 40 STs para cada espécie. Além disso, linhagens de *Enterobacter* spp. e *Acinetobacter* spp. produtoras de NDM estão também distribuídas dentre várias espécies e STs, apesar do número de STs ser menor que nas duas primeiras espécies citadas.<sup>66</sup>

Como já descrito, linhagens de *K. pneumoniae* NDM-positivas estão distribuídas em um grande número de STs, sem linhagens predominantes. Este fato contrasta-se com linhagens de *K. pneumoniae* KPC-positivas, cuja disseminação global é em grande parte devido ao complexo clonal 258 compreendendo ST258 e ST11.<sup>30,66,74</sup> ST11, ST14, ST15, e ST147 são linhagens relativamente comuns dentre isolados carreadores de *bla*<sub>NDM</sub>, com ST14 sendo repetidamente relatada como um dos tipos mais comuns de linhagens de *K. pneumoniae* positivas para NDM, juntamente com ST11.<sup>66,75-78</sup>

O gene *bla*<sub>NDM</sub> tem sido encontrado em uma variedade de contextos genéticos, o que sugere que múltiplos mecanismos têm sido envolvidos na mobilização do mesmo. Os ambientes genéticos do *bla*<sub>NDM</sub> compartilham duas características comuns: a *ISAbal25* (intacta ou truncada) está sempre *upstream* ao gene da carbapenemase, enquanto o gene de resistência à bleomicina, *ble*<sub>MBL</sub>, está usualmente *downstream*.<sup>66,79-80</sup> Uma sequência de inserção truncada *ISAbal25* geralmente ocorre *upstream* a *bla*<sub>NDM-1</sub> em *Enterobacteriales*, mas foi identificada pela primeira vez em isolados de *A. baumannii* negativos para NDM-1, onde foi associada à expressão de vários genes de resistência não relacionados.<sup>67,81-82</sup> Essa associação, juntamente com a posição em que *ble*<sub>MBL</sub> normalmente se encontra, sugerem que um mecanismo de mobilização relacionado ao *ISAbal25* pode ser responsável pela aquisição em bloco de *bla*<sub>NDM-1</sub> e *ble*<sub>MBL</sub>, embora a mobilização *in vivo* ainda não tenha sido observada.<sup>67</sup>

Embora *bla*<sub>NDM</sub> tenha sido encontrado em cromossomos bacterianos, a grande maioria do carregamento desse gene ocorre em plasmídeos, que desempenham um papel vital na disseminação.<sup>66,83-85</sup> Foi relatado que *bla*<sub>NDM</sub> é transportado em plasmídeos de vários grupos de incompatibilidade, ou seja, de vários tipos de replicons, incluindo IncC, IncB/O/K/Z, IncFIA, IncFIB, IncFIC, IncFIII, IncHI1, IncHI2, IncHI3, IncN, IncN2, IncL/M, IncP, IncR, IncT, IncX1, IncX3, IncX4, IncY, e ColE10.<sup>66,85-106</sup> Isso sugere múltiplas aquisições de *bla*<sub>NDM</sub> por

vários plasmídeos, destacando a transferência horizontal do gene mediada por esses elementos genéticos móveis.<sup>66</sup>

A disseminação do gene *bla*<sub>NDM</sub> em *Enterobacterales* é um risco alarmante devido ao fato dessas novas bactérias multirresistentes poderem se disseminar em todo o mundo muito rapidamente. Além disso, o gene codificante para NDM-1 está localizado em diferentes plasmídeos grandes. Estes plasmídeos abrigar outros genes de resistência e ser facilmente transferidos para outras bactérias, conferindo resistência a múltiplos antibióticos. Assim, a rápida disseminação de NDM-1 em bactérias clinicamente relevantes tornou-se uma séria ameaça para a clínica.<sup>64,107</sup>

## 1.5 Plasmídeos

A resistência aos carbapenêmicos é principalmente impulsionada por carbapenemases encontradas em elementos genéticos móveis (EGMs), como integrons, sequências de inserção, transposons e plasmídeos móveis. Os EGMs possibilitam a disseminação dos genes de resistência entre bactérias da mesma espécie ou de espécies diferentes.<sup>24</sup> Juntamente com suas características extracromossômicas e autorreplicativas, os plasmídeos são cruciais para a adaptação e sobrevivência bacteriana em ambientes inadequados. Os plasmídeos encontrados na natureza variam entre uma e centenas de kb e entre uma a centenas de cópias em uma célula.<sup>24,108–110</sup>

Elementos carregando *bla*<sub>KPC</sub> são quase sempre localizados em um plasmídeo, o que aumenta a probabilidade de propagação desse gene através da transferência horizontal. Os plasmídeos permitem a aquisição e disseminação de genes de resistência a antimicrobianos por meio de conjugação, que só é alcançável por plasmídeos móveis/conjugativos.<sup>24,111</sup>

Para plasmídeos serem considerados conjugativos, eles necessitam codificar o aparato de conjugação que inclui um sistema de secreção tipo IV (T4SS, do inglês, *type IV secretion system*) para formar o canal de conjugação, e um módulo de mobilidade (MOB), que inclui uma origem de transferência (*oriT*), uma relaxase e uma proteína de acoplamento tipo IV. Entretanto, se somente uma *oriT* e uma relaxase são produzidas, o plasmídeo é caracterizado como mobilizável, uma vez que pode sequestrar sistemas T4SS codificados por outros EGMs dentro da mesma célula bacteriana. Até recentemente, se um plasmídeo não possuísse nenhum dos elementos, era considerado não transmissível. Porém, já se sabe que eles podem sofrer *relaxase-in trans*, onde uma relaxase de outro plasmídeo da mesma célula pode ser utilizada para mover

o plasmídeo não transmissível. Na maioria dos casos, o plasmídeo não transmissível deve ter uma *oriT* altamente similar, chamada *oriT* mímica, para esse trabalho. Isso demonstrou não ser um requisito absoluto caso haja um fator acessório de relaxossomo (RAF) que possa aliviar a necessidade de uma *oriT* proximoamente correspondente para que a mobilização ocorra (Figura 7).<sup>112</sup>

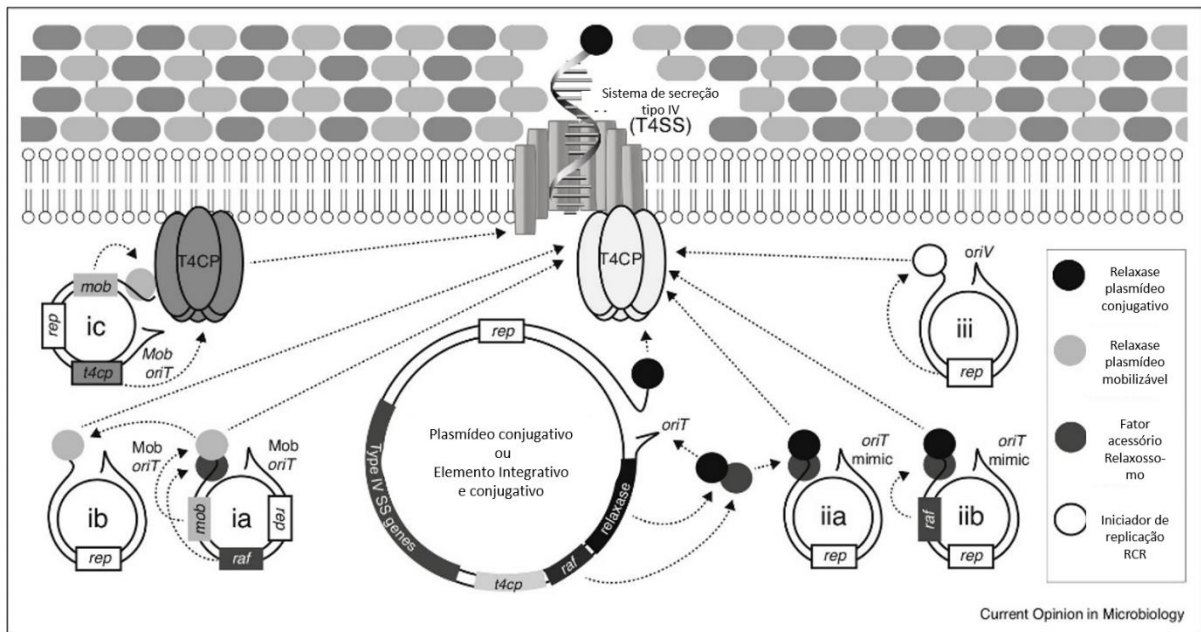


Figura 7 - Diversas estratégias de mobilização de elementos móveis. Esse esquema ilustra as diversas estratégias de plasmídeos e elementos integrativos empregam para explorar o Mpf /T4SS de um elemento conjugativo para sua transferência. Plasmídeos conjugativos ou elementos conjugativos e integrativos (ICEs) carregam todos os genes necessários para sua própria transmissão via conjugação, incluindo um sistema de secreção tipo IV (T4SS), uma proteína de acoplamento (T4CP), fatores acessórios de relaxossomo (RAFs) e um gene relaxase. Relaxases, RAFs e proteínas iniciadoras Rep são mostradas como círculos sombreados correspondendo à legenda à direita. Plasmídeos podem explorar elementos conjugativos para transferência por: (ia) carregando um gene relaxase *mob* distinto e *oriT* e às vezes um gene *raf*; (ib) transportando apenas um *oriT* mímico específico do Mob; (ic) transportar genes *t4cp* para um T4CP, *mob* e *oriT* distintos; (iia) transportando um mímico da sequência *oriT* do plasmídeo conjugativo; (iib) carregando uma cópia da *oriT* e *raf* do plasmídeo conjugativo ou (iii) codificando uma relaxase replicativa capaz de recrutar DNA para o T4CP.

Fonte: Adaptado de RAMSAY; FIRTH.<sup>112</sup>

A transferência horizontal de plasmídeos mobilizáveis e conjugativos facilita suas persistências na população bacteriana. A persistência do plasmídeo também depende da estabilidade deste e a segregação bem-sucedida para as células filhas. Sistemas de partição auxiliam a segregação de plasmídeos, mas quando estão ausentes, o estado multicópias e a distribuição física dos plasmídeos são fatores importantes nesse processo. Além dos mecanismos de estabilidade de plasmídeo, acredita-se que a persistência a longo prazo dos plasmídeos dependa amplamente do *fitness* do hospedeiro ao recebê-los.<sup>113</sup> Plasmídeos proporcionam às bactérias novas ferramentas adaptativas, mas também ocasionam uma carga

metabólica que, na ausência de seleção para as características codificadas, reduz a competitividade do clone portador.<sup>114</sup> Embora essa redução de *fitness* possa ser aliviada ao longo do tempo por meio da evolução compensatória, o custo inicial associado ao transporte do plasmídeo é a principal restrição na disseminação vertical e horizontal desses elementos genéticos. Assim, esse custo pode influenciar suas capacidades de se associar a novos hospedeiros bacterianos e, conseqüentemente, na evolução da resistência a antibióticos mediada por plasmídeo.<sup>113-114</sup>

Os plasmídeos são classificados de acordo com sua incompatibilidade (Inc), que é baseado nos fatores de replicação expressos pelo plasmídeo nas bactérias, ou seja, nas origens de replicação. Dois plasmídeos de um mesmo grupo de incompatibilidade não coexistem dentro da mesma célula.<sup>24</sup> *bla*<sub>KPC</sub> e *bla*<sub>NDM</sub> já foram descritos em plasmídeos de diferentes grupos de Inc, incluindo IncFII, FIA, I2, A / C, N, X, R, P, U, W, L / M e ColE. Esses plasmídeos podem conter outros genes de resistência a outros agentes antimicrobianos, como os aminoglicosídeos, quinolonas, trimetoprim, sulfonamidas e tetraciclina. Essas características ampliam a complexidade do controle da disseminação desses plasmídeos, uma vez que a co-seleção leva à transmissão de multirresistência.<sup>30</sup>

## 1.6 Coprodução de KPC e NDM na América Latina

No Brasil, estudos indicam KPC como a principal carbapenemase com uma prevalência de mais de 76% entre *Enterobacteriales* resistentes aos carbapenêmicos, enquanto NDM é encontrada em menor ocorrência e prevalência.<sup>45,115-116</sup> Desde sua primeira identificação no Brasil, em 2013, bactérias produtoras de NDM tem sido considerada a próxima ameaça à saúde pública do Brasil.<sup>45,70,117</sup>

De acordo com um alerta emitido pela Organização Pan-Americana da Saúde, a América Latina tem visto o surgimento e aumento de novas combinações de carbapenemases em *Enterobacteriales*, bem como a presença de carbapenemases que não foram descritas anteriormente. Argentina, Uruguai, Equador, Guatemala e Paraguai identificaram isolados coprodutores de KPC e NDM com taxas crescentes entre 2020/2021 em relação aos anos anteriores, principalmente em *K. pneumoniae*.<sup>118</sup>

Dados do sul e centro-oeste do Brasil, mostraram que o número de isolados coproduzindo NDM e KPC aumentou quase 6 vezes durante o período da pandemia de COVID-19, sendo detectado principalmente em *Klebsiella pneumoniae complex* (59,5%), seguido de



*Pseudomonas aeruginosa* (12,9%) e *Serratia marcescens* (8,8%).<sup>119</sup> O aumento de coprodutores de KPC/NDM durante a pandemia de COVID-19 representa um preocupante cenário para a saúde pública da América Latina.<sup>119-121</sup>

### 1.7 Opções terapêuticas em casos de coprodução de KPC/NDM

Dentre as principais opções para tratamento contra patógenos coprodutores de KPC/NDM estão as polimixinas (colistina e polimixina B). Essas foram introduzidas novamente na prática clínica em meados da década de 1990 devido ao desenvolvimento de linhagens extensivamente resistentes aos antibióticos disponíveis. Infelizmente, uma rápida resistência global à colistina surgiu após sua reintrodução.<sup>122</sup>

No Brasil, ceftazidima-avibactam (CAZ-AVI) e aztreonam (ATM) estão disponíveis para tratar infecções causadas por bactérias produtoras de KPC e produtoras de NDM, respectivamente. Entretanto, esses medicamentos sozinhos são ineficientes no tratamento de infecções causadas por coprodutoras de KPC e NDM. Alguns casos na literatura, mostraram o sinergismo e eficácia em tratar essas infecções usando a combinação de CAZ-AVI e ATM contra *Enterobacteriales* e *P. aeruginosa* coprodutoras de serina e metalo  $\beta$ -lactamases.<sup>123-124</sup>

Um grande estudo recente avaliou a atividade *in vitro* de aztreonam-avibactam (ATM-AVI) contra mais de 100 isolados de *K. pneumoniae* coprodutores de NDM e KPC recuperados de 2017 a 2019 em laboratórios privados do Brasil e detectaram que essa combinação foi fortemente eficaz contra todos os isolados. O único isolado resistente a ATM-AVI foi um mutante de *K. pneumoniae ompK35/36* carbapenemase negativo.<sup>69,125</sup>

Um medicamento promissor nesses casos seria o cefiderocol (CFDC), uma nova cefalosporina siderófora, com atividade contra bactérias resistentes a carbapenêmicos, incluindo *Enterobacteriales* multirresistentes (MDR) e não fermentadoras, devido ao seu distinto mecanismo de penetração que utiliza transportadores ativos de ferro e sua estabilidade contra carbapenemases.<sup>126-128</sup> CFDC mostrou alta atividade contra isolados produtores de metalo  $\beta$ -lactamase e alguns produtores de duplas carbapenemases, como KPC+VIM, NDM+OXA-48-like e VIM+OXA-48-like.<sup>129-130</sup> Entretanto, evidências sobre atividade contra coprodutores de KPC/NDM são limitadas.<sup>129</sup>



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

O objetivo geral desse trabalho foi analisar bactérias gram-negativas isoladas de hospitais do Brasil contendo o gene *bla<sub>KPC</sub>* em NTE<sub>KPC</sub>, bem como caracterizar um conjunto específico de bactérias portadoras do gene *bla<sub>KPC</sub>* e *bla<sub>NDM</sub>*, e em ambos os casos estudar seus ambientes genéticos e plasmídeos, quanto a capacidade de conjugação, impacto no fitness e replicação.

### 2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos foram:

- Obter seleção de isolados gram-negativos portadores do gene *bla<sub>KPC</sub>* em NTE<sub>KPC</sub>.
- Obter o conjunto de bactérias portadoras dos genes *bla<sub>KPC</sub>* e *bla<sub>NDM</sub>*;
- Selecionar representantes clonais contendo *bla<sub>KPC</sub>* NTE<sub>KPC</sub> para as próximas análises;
- Verificar a diversidade genética do conjunto de bactérias portadoras dos genes *bla<sub>KPC</sub>* e *bla<sub>NDM</sub>*;
- Obter a sequência completa do genoma dos isolados selecionados;
- Caracterizar os ambientes genéticos e plasmídeos abrigando o gene *bla<sub>KPC</sub>* em NTE<sub>KPC</sub>;
- Caracterizar os ambientes genéticos e plasmídeos abrigando o gene *bla<sub>KPC</sub>* e *bla<sub>NDM</sub>* nos isolados sequenciados do possível surto;
- Obter transconjugantes a partir de uma seleção de isolados com genoma sequenciado;
- Comparar o *fitness* das bactérias receptoras e de seus transconjugantes contendo o mesmo plasmídeo;
- Determinar as taxas de conjugação dos plasmídeos;
- Determinar o número de cópias relativos dos plasmídeos;



### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Bactérias do estudo**

##### **3.1.1 Isolados bacterianos**

Para seleção dos isolados bacterianos foram consideradas bactérias gram-negativas resistentes aos carbapenêmicos da coleção do LEMiMo. Os isolados foram doados de laboratórios de hospitais localizados em Ribeirão Preto (SP), Belo Horizonte (MG), São Carlos (SP) e Manaus (AM), pertencem a diferentes espécies, possuem diferentes perfis de resistência e foram isolados de pacientes hospitalizados em diferentes períodos para cada hospital. Depois de liberar a identificação e o antibiograma aos médicos, ao invés de descartar a bactéria, o laboratório doou os isolados para pesquisa (com o consentimento do hospital responsável). O estudo foi enviado para o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), através da Plataforma Brasil, mas foi dispensado devido ao não envolvimento dos dados e envolvimento dos pacientes. Os isolados estão registrados no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) em A6F8C22, A6594DF, AB0AA65 e AAE0048.

##### **3.1.2 Linhagens controle e receptora**

Para os ensaios de conjugação foi selecionada a linhagem *E. coli* J53 como receptora. A mesma já é descrita na literatura para esse ensaio experimental.<sup>61</sup>

Como controles das reações de PCR foram utilizadas as linhagens *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705 e *K. pneumoniae* ATCC BAA-1706.

Como controle dos ensaios de determinação da CIM e disco difusão foi utilizada a linhagem *E. coli* ATCC 25922.

#### **3.2 Extração de DNA genômico**

##### **3.2.1 Para realização de PCR**

As amostras bacterianas foram inoculadas em 10 mL de meio de cultura caldo *Brain and Heart Infusion* (BHI) e cultivadas por 18 horas a 37°C. Após a incubação, as culturas foram

centrifugadas por 5 minutos a 5000 rpm e 4°C, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* foi lavado com 10 mL de solução fisiológica (NaCl 0,85%). As bactérias foram centrifugadas novamente nas mesmas condições e o sobrenadante novamente foi descartado. Em seguida, foi adicionado a cada tubo um volume equivalente a 200 µL de pérolas de vidro (1 mm de diâmetro, tratadas com ácido nítrico 50% e autoclavadas) e 600 µL de solução tamponante de extração TED (200 mM Tris-HCl pH 8,5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA pH 8, 17,5 mM SDS). Os tubos foram agitados vigorosamente por agitador do tipo vórtex por 10 minutos. Após deixar os tubos em repouso por 5 minutos, 500 µL de cada amostra de lisado foram transferidos para microtubos de 1,5 mL e 500 µL de fenol-clorofórmio (1:1) foram adicionados a estes. As misturas foram homogeneizadas por inversão durante 15 segundos e centrifugadas por 20 minutos a 12000 rpm a 4°C. Um volume aproximado de 400 µL dos sobrenadantes foi transferido para outro microtubo de 1,5 mL, 400 µL de isopropanol absoluto gelado foram adicionados e as extrações foram mantidas a -20°C por 18h. No dia seguinte, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 12000 rpm a 4°C, o sobrenadante foi descartado e 1 mL de etanol 70% gelado foi adicionado a cada microtubo. As misturas foram homogeneizadas por inversão, centrifugadas por 10 minutos a 12000 rpm a 4°C, os sobrenadantes foram descartados e os líquidos remanescentes foram absorvidos em papel toalha. Os microtubos foram mantidos a temperatura ambiente por 10 minutos até a completa evaporação dos líquidos e em seguida, cada o *pellet* foi suspenso em 100 µL de água ultrapura e mantida a 4°C por 2 h. Após a incubação, foi adicionado 1 µL de RNase (10 µg/mL) a cada tubo e estes foram mantidos a 37°C por 1 h. Por último, quantificou-se a concentração de DNA através do espectrofotômetro *NanoDrop® 2000* (Thermo Scientific, EUA).

### 3.2.2 Para sequenciamento do genoma

Uma única colônia de cada bactéria foi adicionada a 3 mL de meio de cultura LB (do inglês, *Lysogeny Broth*) líquido e incubada a 37°C por 18h. Paralelamente, 1,6 mL de cada suspensão bacteriana foi transferida para microtubos de 2 mL e centrifugados por 1 minuto a 13000g a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspenso em 580 µL de EDTA 0,5 M pH 8. Em seguida, foram adicionados 20 µL de lisozima 50 mg/mL e as misturas foram incubadas a 37°C por 60 minutos. Após incubação, as misturas foram centrifugadas por 2 minutos a 13000g à temperatura ambiente e o sobrenadante foi removido. Os *pellets* foram ressuspenso em 600 µL de *Nuclei Lysis Solution* (do *Wizard Genomic DNA*

*Purification Kit* – Promega), incubados por 5 minutos a 80°C e então resfriados à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 3 µL de *RNase Solution Mix* (do *Wizard Genomic DNA Purification Kit* – Promega), as misturas foram incubadas por 60 minutos a 37°C e resfriadas à temperatura ambiente. Decorrido o tempo de resfriamento, foram adicionados 200 µL de *Protein Precipitation Solution* (do *Wizard Genomic DNA Purification Kit* – Promega), as misturas foram misturadas vigorosamente por agitador do tipo vórtex por 30 segundos e incubadas em gelo por 5 minutos. Para precipitação do DNA, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 13000g à temperatura ambiente e os sobrenadantes foram transferidos para microtubos de 2 mL novos contendo 600 µL de isopropanol absoluto e misturados por inversão. Essas amostras foram centrifugadas novamente por 15 minutos a 13000g à temperatura ambiente, os sobrenadantes foram descartados e os *pellets* foram lavados com 600 µL de etanol 70%. O álcool foi retirado completamente após uma nova centrifugação de 2 minutos a 13000g à temperatura ambiente e os *pellets* foram secados à temperatura ambiente por 15 minutos. Por fim, os *pellets* de DNA foram reidratados com a adição de 100 µL de *EB Buffer* (*Qiagen*), incubados por 60 minutos a 65°C e mantidos a 4°C por 18h. No dia seguinte, as amostras foram quantificadas utilizando espectrofotômetro *NanoDrop® 2000* e submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% corado com *SYBR Safe Gel DNA Stain* (Invitrogen) para verificação da integridade destas.

### 3.3 Detecção dos genes *bla<sub>KPC</sub>* e *bla<sub>NDM</sub>*

Para detecção do gene *bla<sub>KPC</sub>* e *bla<sub>NDM</sub>*, foi usado o DNA genômico extraído segundo o item 3.2.1 e diluído para uma concentração final de 100 ng/µl. Em seguida, foram realizadas PCRs (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*) utilizando os DNAs genômicos como molde de cada reação e oligonucleotídeos específicos para os genes.<sup>131</sup> *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705 (que possui o gene *bla<sub>KPC</sub>*), uma linhagem doada pela Professora Doutora Ana Cristina Gales (que possui o gene *bla<sub>NDM</sub>*) e a *K. pneumoniae* ATCC BAA-1706 (que não possui os genes) foram utilizadas como controle em todas as reações, além de um controle sem adição de DNA. As reações foram preparadas com aproximadamente 100 ng de DNA genômico, 0,2 µM de cada primer, solução tamponante da enzima 1x concentrado, MgCl<sub>2</sub>, 1,6 mM, dNTP 0,2 mM e 0,05 U de enzima *Taq DNA Polymerase recombinant* (Thermos Scientific, EUA). Os ensaios foram executados em Termociclador *C100 Thermal Cycler* (Bio-rad, EUA) com desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos,

hibridização a 55°C por 30 segundos e alongação a 72°C por 1 minutos e, por fim, uma etapa final de extensão a 72°C por 10 minutos. As amplificações foram verificadas por eletroforese em gel de agarose 1% corado com *SYBR Safe DNA Gel Stain* (Invitrogen) em solução tamponante TAE (Tris-Acetato-EDTA) 1x. De forma semelhante, foram realizadas detecções para o gene *bla<sub>NDM</sub>* para isolados pertencentes a um surto dos dois genes aqui citados com oligonucleotídeos específicos segundo POIREL, *et al.*, 2011.

### 3.4 Detecção do transposon Tn4401

A detecção do ambiente genético Tn4401 também foi realizada por PCR simples com pares de oligonucleotídeos específicos para diferentes regiões desse transposon, segundo descrito por NAAS, *et al.*, 2008 (Tabela 2).

Tabela 2 - Oligonucleotídeos utilizados para detecção do transposon Tn4401<sup>55</sup>

Nome	Sequência	Tamanho do amplicon	Região
P4281	GGCACGGCAAATGACTA	650 pb	ISKpn6
P4714	GAAGATGCCAAGGTCAATGC		
P3781L	GCTTTCTTGCTGCCGCTGTG		
P3098U	TGACCCTGAGCGGCGAAAGC	600 pb	ISKpn7
P905L	GCGACCGGTCAGTTCCTTCT	200 pb	tnpA
P816U	CACCTACACCACGACGAACC		
Pprimer1	TCACCGGCCCTCACCTTTGG	450 pb	IRL
Pprimer2	CTTAGCAAATGTGGTGAACG		

Fonte: Elaborada pela autora.

*K. pneumoniae* ATCC BAA-1705 (que possui o gene *bla<sub>KPC</sub>*) e a *K. pneumoniae* ATCC BAA-1706 (que não possui o gene *bla<sub>KPC</sub>*) foram utilizadas como controles em todas as reações, além do branco, um controle sem adição de DNA.

As PCRs foram conduzidas com as mesmas concentrações de reagentes e condições de ciclagem descritas no item 3.3.1, usando Termociclador *C1000 Thermal Cycler* (Bio-Rad, EUA). As amplificações foram verificadas por eletroforese em gel de agarose 1% corado com *SYBR Safe DNA Gel Stain* (Invitrogen) em solução tamponante TAE (Tris-Acetato-EDTA) 1x.

### 3.5 Eletroforese em gel de campo pulsado

Para evitar o sequenciamento de genoma de isolados bacterianos de mesmo clone, foi realizada uma triagem por macrorestrição do DNA genômico seguido de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE, do inglês, *Pulsed Field Gel Electrophoresis*). Dessa forma, isolados que



eram os únicos de suas espécies de um determinado hospital não foram submetidos à essa etapa de triagem, cujo objetivo é selecionar apenas um representante de cada população clonal.

Blocos de agarose contendo as células bacterianas foram preparados com inóculos feitos a partir de colônia única em 10 mL meio de cultura BHI incubados por 18h a 37 °C. No dia seguinte, as culturas foram ajustadas para DO<sub>600</sub> entre 0,8 e 1,0 e 2 mL foram transferidos para um microtubo de 2 mL. As amostras foram centrifugadas por 1 minuto a 13200 rpm a 4°C, o sobrenadante foi removido e foram adicionados 2 mL de solução tamponante de Suspensão Celular (CSB - 100 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM EDTA pH8) para ressuspensão do *pellet*. Esse procedimento foi repetido 2 vezes e no fim, o *pellet* foi novamente ressuspensos em 2 mL de CSB. Em seguida, 400 µL da suspensão bacteriana, 40 µL de proteinase K (10 mg/mL) e 400 µL de Agarose *Seakem Gold (Lonza)* 1,25% em solução tamponante TE (10 mM Tris-HCl pH8, 1 mM EDTA pH8) a 60°C foram adicionados em um microtubo de 1,5 mL e adicionados em um molde de blocos de agarose. Os moldes foram embrulhados e mantidos em gelo por 10 minutos para completa solidificação dos blocos.

Para a lise das células imobilizadas nos blocos, estes foram retirados dos moldes e adicionados a tubos contendo 5 mL de solução tamponante de lise celular (50 mM Tris-HCl pH8, 50 mM EDTA pH8, 1% Sarcosil) e 50 µL de proteinase K (10 mg/mL). Essas misturas foram incubadas por 2h a 55°C em banho de água fervente com agitação de 160 rpm. Após o tempo de incubação, os tubos foram removidos do banho de água fervente, a solução tamponante de lise foi descartado e 10 mL de água ultrapura esterilizada a 55 °C foram adicionados aos blocos e incubados por 10 minutos a 55 °C em banho de água fervente com agitação. Então, a água foi descartada e essa lavagem foi repetida mais uma vez. Por fim, foi realizada a lavagem com solução tamponante TE a 55°C por 4 vezes, nas mesmas condições da lavagem com água. Os blocos foram transferidos a microtubos contendo 2 mL de solução tamponante TE e armazenados a 4°C até a etapa de restrição.

Uma porção de aproximadamente 5 × 5 mm de cada bloco foi cortada e adicionada a microtubos de 1,5 mL contendo 200 µL de uma diluição da solução tamponante de restrição da enzima de endonuclease de restrição em água com concentração final de 1x. Diferentes enzimas foram usadas dependendo da espécie bacteriana: *SpeI* *New England Biolabs*, EUA) para *Serratia marcescens* e *XbaI* *New England Biolabs*, EUA) para as demais espécies. Ambas as enzimas tinham a solução tamponante *Cut Smart (New England Biolabs*, EUA) como melhor opção. A mistura foi incubada por 10 minutos a 37°C em banho de água fervente sem agitação e, após incubação, a solução tamponante foi removido, foram adicionados 200 µL de solução

de restrição (*Cut Smart Buffer* 1x, 100 µg/mL BSA, 50 U XbaI/SpeI) e as novas misturas foram incubadas por 2h a 37°C em banho de água fervente sem agitação. Então, os tubos foram retirados do banho de água fervente, a solução de restrição foi removida e 200 µL de TBE (Tris-Borato-EDTA) 0,5x foram adicionados aos blocos e incubados por 5 minutos a temperatura ambiente.

A próxima etapa consistiu na preparação do gel de agarose e posterior eletroforese. Assim, após digestão do DNA foram dispostos no pente usado para marcação dos poços, juntamente com os blocos do marcador de peso molecular *Lambda DNA Ladders In Incert*<sup>®</sup> *Agarose Gel Plugs Size Standards for Megabase DNA (Lonza)*, preparados segundo recomendações do fabricante e a agarose *Seakem Gold (Lonza)* 1% em solução tamponante TBE 0,5x a 60°C foi despejada no suporte adequado juntamente com o pente contendo os blocos. Após gelificação do gel, o pente foi retirado e o gel foi posicionado no equipamento *CHEF Mapper*<sup>®</sup> *XA Pulsed Field Electrophoresis System (Bio-Rad, EUA)* e eletroforese foi iniciada com gradiente de 6V, tempo total de corrida eletroforética de 19h, tempo de troca inicial de 6,76s e tempo interruptor final de 35,38s.

Após finalização da corrida eletroforética, o gel foi retirado do equipamento, transferido para um recipiente contendo 400 mL de solução tamponante TBE 0,5x e 40 µL de *SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen)* e incubado por 60 minutos. Finalizado o tempo de incubação o gel foi revelado e fotografado em fotodocumentador *ChemiDoc*<sup>™</sup> *MP (Bio-Rad, EUA)*;

As imagens dos géis foram utilizadas para realização das análises de similaridade genômica entre os DNAs das bactérias selecionadas através do *software BioNumerics 7.1*. Assim, amostras bacterianas com 100% de similaridade apresentarão padrões de bandas idênticos no gel de agarose.

### 3.6 Sequenciamento do genoma

Após as etapas de triagem, o DNA dos representantes das populações clonais de linhagens com o gene *bla*<sub>KPC</sub> em NTE<sub>KPC</sub>, das amostras bacterianas utilizadas como receptoras nos experimentos de conjugação (item 3.1.2), e das linhagens coprodutoras de NDM e KPC foi extraído (item 3.2.2) e submetido ao sequenciamento por dois métodos: *Oxford Nanopore Technologies (ONT)* e *Illumina* (Figura 8). Esta combinação é importante para alcançar os objetivos desse estudo, que envolvem a caracterização dos seus cromossomos e plasmídeos. Ambos os métodos propostos foram realizados em parceria com a Dra. Fernanda Paganelli e

Prof. Rob Willems, ambos da *University Medical Center Utrecht* (UMC Utrecht), localizado em Utrecht, Holanda.

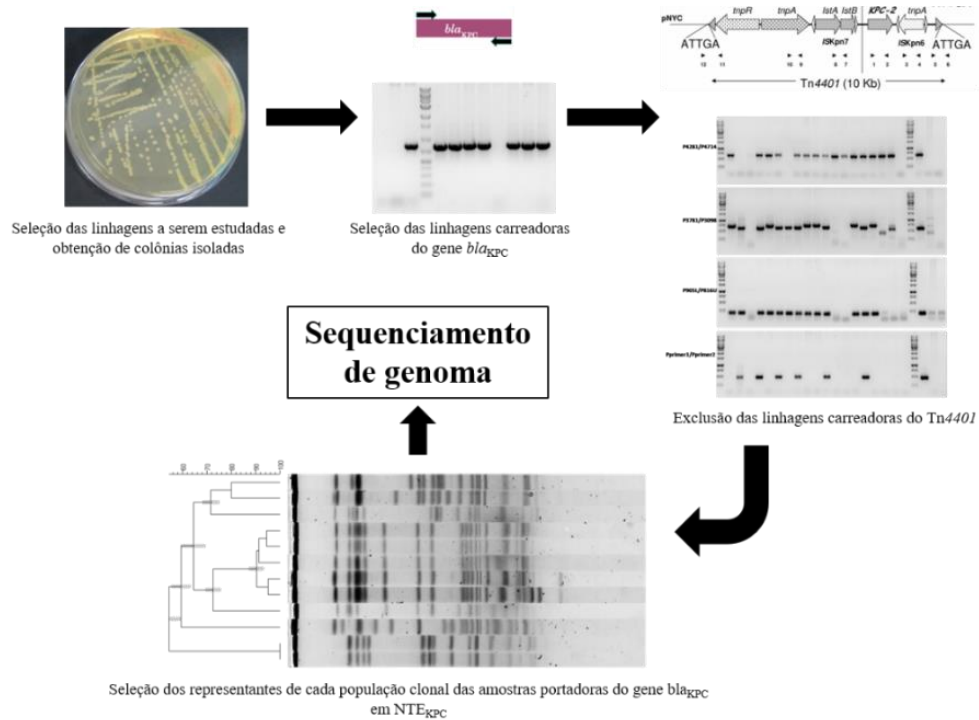


Figura 8 - Esquema das etapas realizadas até a seleção das amostras bacterianas para sequenciamento de genoma. Fonte: Elaborada pela autora.

### 3.6.1 Sequenciamento usando método da *Oxford Nanopore Technologies*

A plataforma *MinION* da *ONT* gera *long reads* de DNA (>5 kb) que abrangem as repetições em cromossomos e plasmídeos. Usando dados de *Nanopore*, genomas, incluindo plasmídeos, podem ser montados por completo, apesar de perder acurácia em relação aos sequenciamentos por *short reads*. Isolados clínicos foram sequenciados por esse método com o objetivo principal de obter as sequências completas dos plasmídeos quando combinados com o *short reads* no procedimento conhecido como *hybrid assembly*. As bibliotecas foram preparadas usando o *Oxford Nanopore's Ligation Sequencing Kit* e o *Native Barcoding Expansion Kit* e os isolados foram sequenciados utilizando o equipamento *MinION* (*Oxford Nanopore technologies*).

### 3.6.2 Sequenciamento de genoma usando método *Illumina*.

Sequenciamento *Illumina* por síntese (SBS) é uma tecnologia de sequenciamento de próxima geração (do inglês, *Next-Generation Sequencing* – NGS) do equipamento *NextSeq 550*

*System*, que suporta sequenciamento paralelo massivo. Esse tipo de sequenciamento gera *short reads* que dificultam a montagem completa de plasmídeos e genoma, porém, traz maior acurácia aos resultados, o qual em combinação com os *long reads* produzidos por Nanopore formam a melhor estratégia para o estudo de plasmídeos completos. Para esse sequenciamento, a biblioteca foi preparada com *Nextera DNA sample preparation kit* e *Nextera index v2 set D for 96 indexes* e os isolados foram sequenciados utilizando NextSeq500 2 x 150 bp mid output (120 M clusters) (*Illumina*, EUA).

### 3.7 Análises bioinformáticas

As análises bioinformáticas dos genomas sequenciados foram realizadas em colaboração com o doutor Julian Paganini, do *University Medical Center Utrecht* (UMC Utrecht).

Primeiramente foram analisadas as qualidades iniciais das *reads* do sequenciamento *Illumina* usando *Fastqc* (v0.11.9). Em seguida, o *software Trim Galore* (v.0.6.6) com parâmetros padrões foi utilizado para remover os adaptadores e corte de qualidade. Os genomas foram montados usando *Unicycler* (v.0.4.8) em modo *bold*. Por fim, a qualidade das montagens híbridas foi acessada utilizando o *software BUSCO* (v5.1.2).

Os genomas montados foram anotados com auxílio da ferramenta *Prokka* e posteriormente submetidos ao NCBI *database* para anotação e depósito. As sequências foram analisadas utilizando *Resfinder*, *MLST*, *Virulence Finder* e *Plasmid Finder*, disponíveis no *Center for Genomic Epidemiology* (<http://www.genomicepidemiology.org/>).

O número de SNPs entre isolados foi determinado usando *CFSAN pipeline* (v.2.1.1) com parâmetros padrão. Para isso, as *reads* obtidas no sequenciamento *Illumina* de um isolado foi mapeado contra o genoma montado do outro.

Os genomas foram anotados também com *BAKTA* (v1.3.3), e os genes *core* e acessórios foram identificados utilizando *Panaroo* (v1.2.10) com parâmetros padrão. A similaridade do conteúdo gênico foi avaliada através do cálculo da distância de Jaccard entre isolados, como indicado:

$$\text{Distância de Jaccard} = 1 - \frac{|\text{GenesIsolate1} \cap \text{GenesIsolate2}|}{|\text{GenesIsolate1} \cup \text{GenesIsolate2}|}$$

Além disso, os plasmídeos sequenciados foram submetidos ao *NCBI BLASTn* e ao *software Kablammo* com parâmetros padrões para analisar a identidade entre os mesmos. A

capacidade de mobilização dos plasmídeos foi determinada utilizando o *software Plascad* com parâmetros padrões.

Por fim, os genes dos sistemas toxina/antitoxina foram detectados pelo *TA Finder web service* (Bioinformatics Server at MML, SJTU) com parâmetros padrões.

Os códigos para reproduzir as análises bioinformáticas deste trabalho estão disponíveis publicamente em: [gitlab.com/jpaganini/saopaulo\\_kpn\\_outbreak](https://gitlab.com/jpaganini/saopaulo_kpn_outbreak).

### 3.8 Ensaios de conjugação

Para cada ensaio de conjugação, foi selecionado um par de doadora-receptora, sendo a linhagem doadora a que, nesse caso, possui o gene *bla<sub>KPC</sub>* em um plasmídeo que se deseja conjugar e a linhagem receptora é a que irá receber o plasmídeo, caso a conjugação seja bem-sucedida.

Inicialmente, foram preparados inóculos das duas linhagens a serem utilizadas em 5 mL de meio de cultura LB e estes foram incubados por 18h a 37°C. No dia seguinte, as culturas foram ajustadas para DO<sub>600</sub> de 0,3 em 10 mL de meio de cultura LB, mantidas a 37°C. O crescimento foi acompanhado e assim que ambas as culturas atingiram DO<sub>600</sub> entre 0,6 e 0,7, foram misturados 5 mL da cultura de cada uma das bactérias em um tubo de 50 mL e a mistura foi incubada por 24h a 37°C. Após o tempo de incubação, foi realizado a semeadura das misturas de duas diferentes maneiras. A primeira delas objetiva a obtenção de colônias isoladas para ensaios de confirmação por PCR e, para isso, a mistura foi diluída em meio de cultura LB nas proporções 1:1 e 1:10 e semeadas em duas diferentes placas de Petri com LB-ágar, contendo: **a)** antibiótico 1, seletivo para a linhagem receptora, e **b)** antibiótico 2, seletivo para o isolado com gene *bla<sub>KPC</sub>* e, conseqüentemente, o plasmídeo que o abriga. Já a segunda maneira objetiva a obtenção da taxa de conjugação entre as linhagens e, para isso, a mistura foi diluída seriadamente de 10<sup>-1</sup> até 10<sup>-12</sup> em solução fisiológica e as diluições foram semeadas pela técnica de microgotas (3 gotas de 10 µL cada) em duas diferentes placas de Petri com LB-ágar, contendo **a)** antibiótico 1, seletivo para a linhagem receptora **b)** antibiótico 1, seletivo para a linhagem receptora, e antibiótico 2, seletivo para o gene *bla<sub>KPC</sub>*. As placas foram incubadas por 24 h a 37 °C. Dessa forma, as placas contendo apenas o antibiótico 1 são seletivas para as bactérias da linhagem receptora e as placas contendo os dois antibióticos são seletivas para as bactérias da linhagem receptora que receberam o plasmídeo contendo o gene *bla<sub>KPC</sub>* por

conjugação. A quantidade de antibiótico utilizada seguiu a concentração inibitória mínima (CIM) para esses antibióticos para todas as linhagens selecionadas.

Para cálculo da taxa de conjugação, após o período de incubação das placas, as colônias foram contabilizadas obtendo o número de unidades formadoras de colônias (UFC)/mL. A taxa de conjugação foi calculada como:

$$\text{Taxa de conjugação} = \frac{\text{UFC transconjugantes/mL}}{\text{UFC total de receptoras/mL}}$$

As colônias obtidas nas placas **b** semeadas da primeira maneira foram submetidas a PCR de colônia para identificação do gene *bla*<sub>KPC</sub> e confirmação da conjugação. Para isso, cada colônia foi suspensa em 10 µL de meio de cultura LB do qual 1 µL foi utilizado como *template* em uma reação. As reações foram realizadas segundo o item 3.3 e um isolado transconjugante de cada conjugação foi selecionado para etapas futuras. Para auxiliar na identificação das espécies dos isolados considerados transconjugantes, além da atenção à morfologia da colônia destes isolados, estes foram semeados em meio cromogênico diferencial - ágar Cromonew UTI (NewProv, Brasil).

### 3.9 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

O estudo foi realizado seguindo as recomendações da ISO 20776-1.<sup>132</sup> Dessa forma, foram preparadas soluções estoques dos antibióticos imipenem e meropenem a 5120 mg/L em solução tamponante fosfato de sódio 10 mM e água ultrapura, respectivamente. Para os antibióticos colistina e polimixina B, foi utilizado água ultrapura para solução estoque e diluições. Seguindo a norma em questão, as soluções estoques foram diluídas 1:10 em meio de cultura Mueller Hinton Cátion Ajustado (MHCA) e filtradas em filtro de PES 0,22 µm. Em seguida, as demais diluições seriadas foram preparadas em tubos de 15 mL e adicionadas à uma microplaca de 96 poços. Foi utilizado um intervalo de concentração de 0,06 mg/L – 512 mg/L. Em seguida, foram preparados inóculos de cada linhagem a partir de colônias de crescimento recente. As culturas foram diluídas até a obtenção de 0,5 McFarland, diluídas 1:20 e 10 µL foram adicionados a cada poço de forma a obter uma concentração final de  $5 \times 10^5$  UFC/mL em cada poço. As placas foram incubadas por 18 h a  $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  e após a incubação foram realizadas leituras visuais dos resultados. Todos os ensaios foram realizados em triplicata experimental e com controles positivos de crescimento (sem antibiótico) e negativos (sem bactéria – controle de esterilidade) de crescimento bacteriano, bem como com linhagem *E. coli* ATCC 25922 (controle de qualidade) cuja CIM já é conhecida. O resultado desta linhagem

controle foi confirmado conforme preconizado pelo EUCAST/BrCAST para a validação do ensaio.

### **3.10 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos por disco-difusão**

O ensaio de disco-difusão foi realizado de acordo com as recomendações do BrCast e foi aplicado para determinação do perfil de susceptibilidade de alguns isolados em relação a antibióticos não testados anteriormente. As linhagens foram cultivadas por 18h a 35°C em caldo BHI (Kasvi, Brasil) e foram ajustadas até a obtenção de 0,5 McFarland em solução fisiológica. Em seguida, com o auxílio de um *swab* as culturas ajustadas foram semeadas em placas de Petri contendo 25 mL de MHCA ágar e os discos foram aplicados na superfície do ágar em distâncias adequadas. As placas foram incubadas por 18h a 35°C e após incubação os resultados foram analisados através das medidas dos tamanhos dos halos de inibição de crescimento. A leitura dos dados foi realizada conforme preconizado pelo EUCAST/BrCAST.

### **3.11 Curva de crescimento e tempo de duplicação da população bacteriana**

Inicialmente, as linhagens foram inoculadas em 5 mL meio de cultura MHCA e incubadas por 18h a 37°C. Em seguida, as culturas foram diluídas para DO<sub>600</sub> entre 0,05 e 0,1 e 200 µL foram adicionados a cada poço de uma microplaca de 96 poços de fundo chato, juntamente com o controle negativo (meio de cultura sem bactéria). O crescimento foi monitorado com leituras de absorvância a 600 nm a cada 15 minutos, em um tempo total de 14 horas de incubação a 37°C com agitações de 5 s antes e após as medições no espectrofotômetro Spectramax M5 (Molecular Devices, EUA). O experimento foi realizado em triplicata biológica, cada uma com triplicata técnica. O gráfico DO<sub>600</sub> por tempo obtido foi obtido através da média das triplicatas biológicas – cada uma a partir das médias e desvios padrões das replicatas técnicas - e a propagação de erro dos desvios padrões. Para obtenção dos tempos de duplicação de cada triplicata biológica de cada linhagem foi utilizado o *software GraphPad Prism 8* através da ferramenta de ajuste da região de fase logarítmica de crescimento *Exponencial growth equation*. Para cada triplicata biológica, primeiramente foram calculados as médias e desvios padrões de cada ponto. Foram calculadas, então, a média dos tempos de duplicação de cada triplicata biológica e o desvio padrão para obtenção de um valor com seu

erro associado de cada linhagem e em seguida foram feitos testes estatísticos ANOVA e Teste-T para analisar se havia diferença estatisticamente significativa entre as curvas.

### 3.12 Ensaio de sinergismo entre ceftazidima/avibactam e aztreonam por disco difusão

Este ensaio foi realizado de acordo com o descrito em estudo anterior.<sup>125</sup> Desta forma, o disco de ceftazidima-avibactam (10 + 4 µg – *Thermofisher Scientific – Oxoid*, EUA) foi aplicado na superfície da placa de Petri contendo 25 mL de MHCA ágar, antes da inoculação da bactéria, e foi incubado por 2 h a 36°C. Após as 2 h, o disco de antibiótico foi retirado, com o auxílio de uma pinça esterilizada. Em seguida, o inóculo cultivado por 18h a 37°C em caldo BHI (Kasvi, Brasil) foi ajustado até a obtenção de 0,5 McFarland em solução fisiológica 0,85%. Com o auxílio de um *swab* a cultura ajustada foi semeada na placa e o disco de aztreonam (30 µg – *Thermofisher Scientific – Oxoid*, EUA) foi aplicado no local onde foi colocado o disco de ceftazidima-avibactam. Além deste, outro disco de ceftazidima-avibactam e aztreonam foram aplicados na superfície da placa em distâncias adequadas, para verificação da susceptibilidade a esses antibióticos separadamente. As placas foram cultivadas por 18h a 37°C e após incubação, os diâmetros dos halos de inibição foram medidos. Os ensaios foram realizados em triplicata biológica.

### 3.13 Determinação do número de cópias dos plasmídeos

O número de cópias de plasmídeos foi determinado por qPCR de acordo com o descrito por Woodall C. A. 2003.<sup>133</sup> Culturas crescidas por 18h foram ajustadas para  $DO_{600nm} = 1$  em caldo BHI (Kasvi, Brasil), e as células foram lisadas a 98°C por 10 minutos, seguido de um resfriamento por 10 minutos a 20 °C. As culturas lisadas foram diluídas 1:10 e 3 µL foram usados em cada reação. Foram utilizados oligonucleotídeos específicos para genes *housekeeping* (gene *mdh* que codifica para uma Malato desidrogenase) e para *bla<sub>KPC</sub>/bla<sub>NDM</sub>* (Tabela 3).

Tabela 3 - Oligonucleotídeos utilizados para ensaios de qPCR

Oligonucleotídeo	Sequência (5' – 3')
<i>mdh_Ecoli_F</i>	CGATCTGAGCCATATCCCTACT
<i>mdh_Ecoli_R</i>	GAACGATCCATACCCGGTTTAC

(continua)



(continuação)

<i>mdh_Kpneumoniae_F</i>	GCGGATGTAGTGCTGATCTC
<i>mdh_Kpneumoniae_R</i>	CTGCTGCACGAGGTTCTT
<i>mdh_Pstuartii_F</i>	CCTTAGCCATATCCCAACTGAC
<i>mdh_Pstuartii_R</i>	TACCTGGTTTACGAGCAACAC
<i>mdh_Kaerogenes_F</i>	GCATGGATCGTTCCGACTTA
<i>mdh_Kaerogenes_R</i>	CGATAGCGACGGTGGTATTT
<i>mdh_Ecloacae_F</i>	CTCAGAACTCTCCCTGTACGATA
<i>mdh_Ecloacae_R</i>	CACCGGAGAAGCCTTTGATT
<i>bla<sub>KPC</sub>_qPCR_F</i>	GCGCGCTCCATCGGTGTGTA
<i>bla<sub>KPC</sub>_qPCR_R</i>	AATTGGCGGCGGCGTTATCA
<i>bla<sub>NDM</sub>_qPCR_F</i>	GATTGCGACTTATGCCAATG
<i>bla<sub>NDM</sub>_qPCR_R</i>	TCGATCCCAACGGTGATATT

---

Fonte: Elaborada pela autora.

As reações foram realizadas utilizando 1x *SYBR Green qPCR MasterMix* (ThermoFisher, EUA), 100 mM de cada oligonucleotídeo, 3 µL de cultura preparada anteriormente e água ultrapura para completar 10 µL. Os ensaios foram executados utilizando o *CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System* (Bio-Rad, EUA) com as seguintes condições: 3 min a 95 °C, 40 ciclos de 10 s a 95 °C, 1 min a 50 °C e 10 s a 72 °C. Todas as reações de qPCR, incluindo os controles, foram feitas em triplicatas experimentais. A eficiência e especificidade dos oligonucleotídeos foram determinadas utilizando curvas padrão e de *melting*, com cinco diluições seriadas. Os coeficientes angulares das curvas padrão foram utilizados para calcular a eficiência de amplificação.<sup>134</sup> O número relativo de cópias de plasmídeos (NCP) foram determinados considerando as diferentes eficiências de amplificação e valores de Ct para cada *amplicon* (cromossômico e plasmidial).<sup>134</sup>

### 3.14 Determinação do fenótipo de mucosidade

O fenótipo de mucosidade foi determinado utilizando o teste de *string*, realizado como descrito na literatura.<sup>135-136</sup> Colônias de cada isolado foram cultivadas em ágar BHI e MacConkey (Kasvi, Brasil) e tocadas com uma alça de inoculação. A alça foi afastada e se um fio maior que 5 mm fosse observado, a linhagem era classificada como hiper mucoviscosa. Caso contrário, os isolados eram classificados como mucóides.

### 3.15 Determinação do número e tamanho dos plasmídeos.

O ensaio de S1 nuclease seguida de eletroforese em gel de campo pulsado foi utilizado para determinação dos tamanhos dos plasmídeos presentes em cada isolado e consequente identificação da população de plasmídeos dos mesmos. Dessa forma, o experimento foi realizado como descrito no item 3.5 com algumas modificações. A digestão com S1 nuclease foi realizada como recomendado pelo fabricante e o padrão de peso molecular utilizado foi o *Low Range PFG Marker (New England Biolabs, EUA)*. As condições de corrida utilizadas foram gradiente de 6 V, tempo total de corrida de 15 h, tempo de troca inicial de 1 s e tempo interruptor final de 18 s.

### 3.16 Tipagem por sequenciamento de multilocus

Os isolados que tiveram seus genomas sequenciados, os dados de sequenciamento foram utilizados para determinação da ST ao qual pertencem. Para os isolados que não tiveram seus genomas sequenciados foi utilizado o esquema de Pasteur para MLST.<sup>137</sup> Assim, foram realizadas PCRs utilizando oligonucleotídeos específicos para MLST de *K. pneumoniae*<sup>137</sup> e os amplicons foram sequenciados pelo método de sequenciamento de Sanger utilizando o *Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (Life Technologies, EUA)*. As sequências obtidas foram analisadas no *web service Public databases for molecular typing and microbial genome diversity* e o perfil alélico foi determinado, possibilitando a classificação da ST.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Análise da diversidade e impacto de NTE<sub>KPC</sub> e seus plasmídeos na disseminação do gene *bla*<sub>KPC</sub> em diferentes espécies

#### 4.1.1 Seleção dos isolados

Para descrever novos ambientes genéticos abrigando o gene *bla*<sub>KPC</sub> e seus plasmídeos, foram selecionadas 212 isolados bacterianos gram-negativos resistentes a um ou mais antibiótico da classe dos carbapenêmicos dentre as bactérias do banco do LEMiMo. Essas bactérias foram isoladas entre os anos de 2006 e 2021 em 4 locais do Brasil, sendo 106 fornecidas pelo Hospital Risoleta Tolentino Neves de Belo Horizonte – MG (HRTN), 46 pelo Hospital João Lúcio Pereira Machado de Manaus – AM (HJLPM), 37 pelo Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto de Ribeirão Preto – SP (HCRP) e 23 pelo Laboratório Maricondi (LM) responsável por amostras pertencentes a hospitais de São Carlos - SP e região. Vale ressaltar que esses isolados pertencem a diferentes espécies da ordem *Enterobacterales* como *Klebsiella* sp., *Escherichia coli*, *Enterobacter* sp., *Serratia marcescens*, *Providencia stuartii*, *Proteus mirabilis* além de *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* (Tabela 4).

Tabela 4 - Distribuição do número de bactérias deste estudo de acordo com as espécies as quais pertencem e aos hospitais onde foram isoladas

	<i>Klebsiella</i> sp.	<i>P. stuartii</i>	<i>Enterobacter</i> sp.	<i>E. coli</i>	<i>Serratia</i> sp.	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>P. aeruginosa</i>
HRTN	20	12	10	4	3	56	1
HJLPM	0	0	0	2	0	26	18
LM	9	0	8	2	2	2	0
HCRP	20	0	3	1	0	0	13
Total	49	12	21	9	5	84	32

HRTN: Hospital Risoleta Tolentino Neves, HJLPM: Hospital João Lúcio Pereira Machado, HCRP: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, LM: Laboratório Maricondi

Fonte: Elaborada pela autora.

#### 4.1.2 Seleção de isolados carreadores do gene *bla*<sub>KPC</sub> em NTE<sub>KPC</sub>

Um total de 54 isolados contendo o gene *bla*<sub>KPC</sub> foi encontrado dentre as 212 amostras bacterianas selecionadas inicialmente para esse estudo, resultando em uma ocorrência de aproximadamente 25,5%.

A Figura 9 apresenta os diferentes perfis dos isolados de cada hospital com relação à presença do gene *bla<sub>KPC</sub>* para auxiliar na compreensão da epidemiologia de cada grupo de isolados.

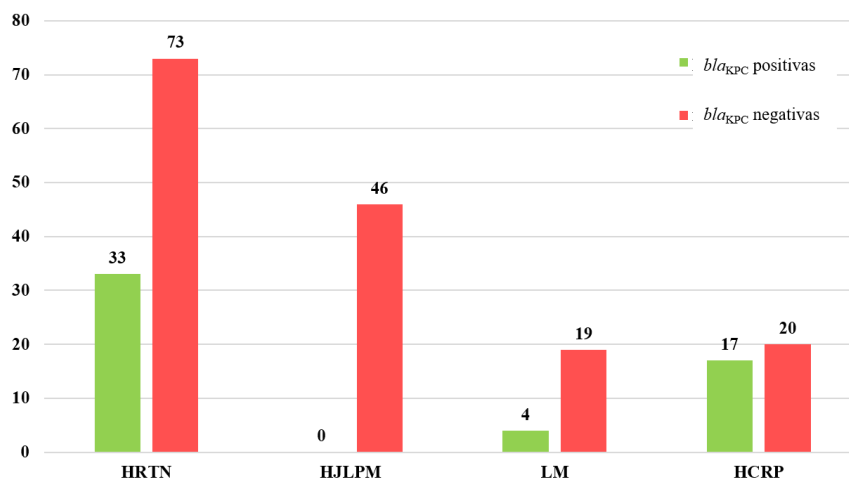


Figura 9 - Valores encontrados para presença ou ausência do gene *bla<sub>KPC</sub>*, separados por local de isolamento das linhagens. HRTN: Hospital Risoleta Tolentino Neves, HJLPM: Hospital João Lúcio Pereira Machado, HCRP: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, LM: Laboratório Maricondi. Fonte: Elaborada pela autora.

É possível notar que, dentre os isolados analisados, as ocorrências variam entre os hospitais, sendo a maior delas a do HCRP onde 17 das 37 amostras bacterianas apresentaram o gene *bla<sub>KPC</sub>*, ocorrência aproximada de 45,9%. Em seguida, encontra-se o HRTN com 31,1% (em 33 das 106 amostras bacterianas o gene de interesse estava presente). O LM apresentou valores mais baixos para a presença do gene, apenas em 4 dentre os 23 isolados, resultando em uma ocorrência de 17%. Por fim, nenhum dos isolados do HJLPM portava o gene *bla<sub>KPC</sub>* e as mesmas foram excluídas do estudo.

Além das diferentes distribuições de ocorrência de amostras bacterianas contendo o gene em cada hospital, foi possível perceber predominância de isolados pertencentes à espécie *Klebsiella pneumoniae*, que inicialmente correspondiam a 49 dos 212 isolados - aproximadamente 23% - e na distribuição das amostras bacterianas portadoras do gene *bla<sub>KPC</sub>* correspondem a quase 68,5% (37/54) (Tabela 5).

Tabela 5 - Distribuição das amostras bacterianas portadoras do gene *bla<sub>KPC</sub>* e carreadoras desse gene em NTE<sub>KPC</sub> de acordo com as espécies as quais pertencem e aos hospitais onde foram isoladas

	<i>K. pneumoniae</i>		<i>P. stuartii</i>		<i>K. aerogenes</i>		<i>Enterobacter spp.</i>		<i>E. coli</i>	
	<i>bla<sub>KPC</sub></i>	NTE <sub>KPC</sub>	<i>bla<sub>KPC</sub></i>	NTE <sub>KPC</sub>	<i>bla<sub>KPC</sub></i>	NTE <sub>KPC</sub>	<i>bla<sub>KPC</sub></i>	NTE <sub>KPC</sub>	<i>bla<sub>KPC</sub></i>	NTE <sub>KPC</sub>
HRTN	18	13	7	7	2	2	3	3	3	3
HJLPM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LM	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HCRP	15	3	-	-	-	-	1	1	1	1
Total	37	16	7	7	2	2	4	4	4	4

HRTN: Hospital Risoleta Tolentino Neves, HJLPM: Hospital João Lúcio Pereira Machado, HCRP: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, LM: Laboratório Maricondi.

Fonte: Elaborada pela autora.

Dentre os 54 isolados contendo o gene *bla<sub>KPC</sub>* selecionados na etapa anterior, 21 possuíam o transposon Tn4401. Estas amostras bacterianas são todas da espécie *K. pneumoniae* e isoladas em 3 locais diferentes, sendo 5 do HRTN, 4 do LM e 12 do HCRP.

Vale destacar que as ocorrências entre cada local foram diferentes, com o LM apresentando todos os isolados abrigando *bla<sub>KPC</sub>* em Tn4401. Em seguida, se encontra o HCRP que apresentou 70,6% dos isolados com o gene no ambiente genético canônico e, por fim, os isolados do HRTN que apresentaram *bla<sub>KPC</sub>* em Tn4401 representam 9% dos isolados selecionados pela presença do gene. Analisando os dados totais de todos os hospitais, a presença do gene *bla<sub>KPC</sub>* no Tn4401 apresentou uma ocorrência de 38,9% dentre os isolados selecionados pela presença do gene (Figura 10).

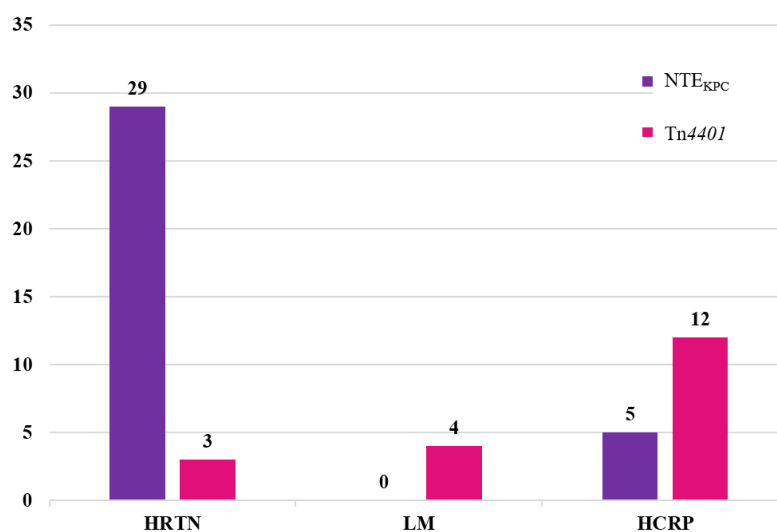


Figura 10 - Distribuição das amostras bacterianas que apresentam *bla<sub>KPC</sub>* em Tn4401 ou NTE<sub>KPC</sub>, separados por local de isolamento das linhagens. HRTN: Hospital Risoleta Tolentino Neves, HCRP: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, LM: Laboratório Maricondi.

Fonte: Elaborada pela autora.

Como um dos objetivos foi estudar a diversidade de ambientes genéticos carreando o gene *bla<sub>KPC</sub>*, os isolados contendo o *Tn4401* foram excluídos das próximas etapas. Assim, 33 amostras de bactérias gram-negativas resistentes aos carbapenêmicos que apresentam o gene *bla<sub>KPC</sub>* em *NTE<sub>KPC</sub>* foram usadas nos próximos ensaios (Tabela 6).

Tabela 6 - Distribuição das amostras bacterianas portadoras do gene *bla<sub>KPC</sub>* em *NTE<sub>KPC</sub>* de acordo com as espécies as quais pertencem e aos hospitais onde foram isoladas

	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. stuartii</i>	<i>K. aerogenes</i>	<i>Enterobacter spp.</i>	<i>E. coli</i>
HRTN	13	7	2	3	3
HJLPM	-	-	-	-	-
LM	-	-	-	-	-
HCRP	3	-	-	1	1
Total	16	7	2	4	4

HRTN: Hospital Risoleta Tolentino Neves, HJLPM: Hospital João Lúcio Pereira Machado, HCRP: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, LM: Laboratório Maricondi.

Fonte: Elaborada pela autora.

#### 4.1.3 Seleção de representantes clonais

Após seleção das linhagens contendo o gene *bla<sub>KPC</sub>* em *NTE<sub>KPC</sub>* foi realizada uma última etapa de triagem para seleção dos isolados a serem sequenciadas. Essa etapa consiste na identificação de clones dentre as amostras bacterianas para que apenas um representante de cada população clonal seja submetido ao sequenciamento.

É comum haver disseminação de um mesmo clone em hospitais e estes são os maiores responsáveis pelos surtos de infecções nesses locais.<sup>138-140</sup> Dois organismos pertencentes a uma mesma população clonal possuem genomas muito similares ou até mesmo idênticos, abrigando, na maioria das vezes, os mesmos elementos genéticos. Levando-se em consideração o objetivo desse projeto de estudar e comparar diferentes ambientes genéticos e plasmídeos e a otimização do orçamento para realização de sequenciamento, apenas uma amostra de cada população clonal foi selecionada.

Por fim, as análises desse experimento foram realizadas somente para grupos pertencentes ao mesmo gênero e espécie e mesmo hospital (grupos destacados na Tabela 7). Isolados das espécies de *Enterobacter spp.* não foram submetidos ao PFGE devido ao fato estarem agrupadas somente com relação ao seu gênero, pois suas espécies não haviam sido identificadas em tal ponto. Não foi possível estabelecer um protocolo funcional para análise de similaridade genômica entre os isolados de *P. stuartii*.

Tabela 7 - Distribuição das amostras bacterianas portadoras do gene  $bla_{KPC}$  em  $NTE_{KPC}$  de acordo com as espécies as quais pertencem e aos hospitais onde foram isoladas. Os grupos destacados representam os isolados submetidos a análises de similaridade por PFGE

	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. stuartii</i>	<i>K. aerogenes</i>	<i>Enterobacter</i> spp.	<i>E. coli</i>
HRTN	<b>13</b>	7	<b>2</b>	3	<b>3</b>
HJLPM	-	-	-	-	-
LM	-	-	-	-	-
HCRP	<b>3</b>	-	-	1	1
Total	16	7	2	4	4

HRTN: Hospital Risoleta Tolentino Neves, HJLPM: Hospital João Lúcio Pereira Machado, HCRP: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, LM: Laboratório Maricondi.

Fonte: Elaborada pela autora.

Não foram encontrados clones dentre os isolados de *K. aerogenes* e *E. coli* do HRTN (Figuras 11 e 12). Dentre os isolados de *K. pneumoniae* do HCRP foram encontradas duas amostras bacterianas clonais e, então, somente uma delas foi selecionada (Figura 13). Já com as amostras de *K. pneumoniae* do HRTN foram identificadas 2 disseminações clonais, sendo uma delas de 2 isolados e uma de 3, e como foram selecionados apenas um representante de cada população, outros 3 isolados foram excluídos do estudo (Figura 14) (Tabela 8).

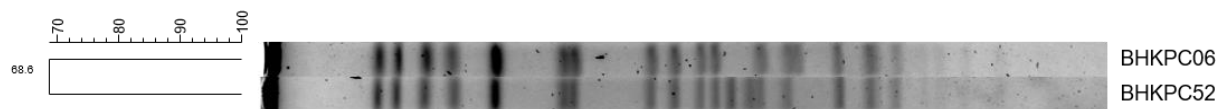


Figura 11 - Análise do perfil de bandas obtidos na PFGE dos isolados de *K. aerogenes* do HRTN.

Fonte: Elaborada pela autora.

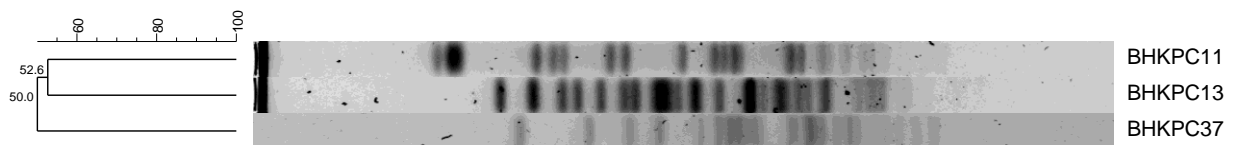


Figura 12 - Análise do perfil de bandas obtidos na PFGE dos isolados de *E. coli* do HRTN.

Fonte: Elaborada pela autora.

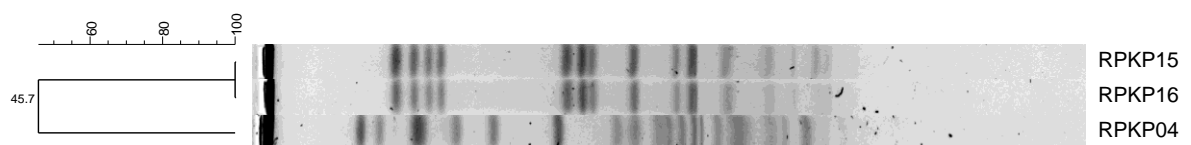


Figura 13 - Análise do perfil de bandas obtidos na PFGE dos isolados de *K. pneumoniae* do HCRP.

Fonte: Elaborada pela autora.

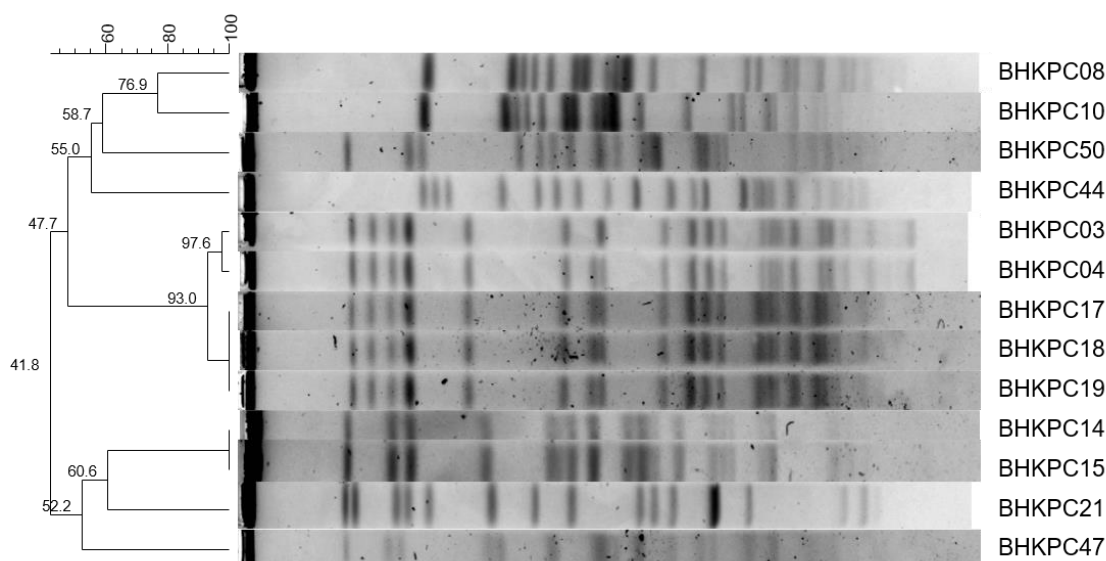


Figura 14 - Análise do perfil de bandas obtidos na PFGE dos isolados de *K. pneumoniae* do HRTN.  
Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 8 - Distribuição dos representantes de cada população clonal das amostras bacterianas portadoras do gene *bla<sub>KPC</sub>* em *NTE<sub>KPC</sub>* de acordo com as espécies as quais pertencem e aos hospitais onde foram isoladas

	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. stuartii</i>	<i>K. aerogenes</i>	<i>Enterobacter spp.</i>	<i>E. coli</i>
HRTN	10	7	2	3	3
HJLPM	-	-	-	-	-
LM	-	-	-	-	-
HCRP	2	-	-	1	1
Total	12	7	2	4	4

HRTN: Hospital Risoleta Tolentino Neves, HJLPM: Hospital João Lúcio Pereira Machado, HCRP: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, LM: Laboratório Maricondi.  
Fonte: Elaborada pela autora.

Os resultados deste experimento permitiram excluir 5 isolados do estudo, resultando em 29 amostras bacterianas finais que foram submetidas ao sequenciamento de genoma por duas tecnologias diferentes (Tabela 8).

#### 4.1.4 Sequenciamento do genoma

Os 29 isolados selecionados (Tabela 8) e a linhagem escolhida para os experimentos de conjugação, *E. coli* J53, tiveram seus DNAs extraídos e foram enviadas ao *University Medical Center Utrecht* (UMC Utrecht), localizado em Utrecht, Holanda, onde foram sequenciadas por duas tecnologias: Illumina e Nanopore. Essa etapa do projeto foi desenvolvida em parceria com a Dra. Fernanda Paganelli e Dr. Rob Willems, pesquisadores no instituto citado acima.



#### 4.1.5 Análises iniciais dos sequenciamentos de genoma

Para melhor entendimento dos ensaios, desse momento em diante, os isolados clínicos serão referidos pelos nomes que possuem no banco de dados do LEMiMo.

Assim, os dados dos sequenciamentos foram processados e os genomas híbridos (utilizando dados de ambos sequenciamentos) foram montados utilizando os dados dos dois tipos de sequenciamento, com o auxílio do *software Unicycler*. A montagem do genoma, bem como algumas análises bioinformáticas realizadas nesse estudo foram realizadas em parceria com o Dr. Julian Paganini e o Dr. Rodrigo Meneses.

Os valores obtidos para análises de qualidade do experimento mostram uma boa cobertura dos sequenciamentos, em geral, de aproximadamente 100x, indicando boa confiabilidade dos dados (Tabela 9).

Tabela 9 - Dados de qualidade do sequenciamento de genoma dos 30 isolados e os números de acessos dos genomas anotados

pécie	Isolado	Hospital	Cobertura	N50	Número de acesso
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	BHKPC03	HRTN	116x	197916	JAUPKA000000000
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	BHKPC04	HRTN	43x	203715	JAUPKB000000000
<i>Klebsiella aerogenes</i>	BHKPC06	HRTN	145x	200304	JAUPKC000000000
<i>Enterobacter hormaechei</i>	BHKPC07	HRTN	32x	172684	JAUPMS000000000
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	BHKPC08	HRTN	103x	208711	JAVCPB000000000
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	BHKPC10	HRTN	260x	208711	JAVPCP000000000
<i>Escherichia coli</i>	BHKPC11	HRTN	116x	209759	CP132074-CP132075
<i>Escherichia coli</i>	BHKPC13	HRTN	178x	268668	CP132076-CP132077
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	BHKPC15	HRTN	229x	373307	CP132078-CP132079
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	BHKPC18	HRTN	152x	172898	JAVCPD000000000
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	BHKPC21	HRTN	103x	241815	CP132080-CP132084
<i>Providencia stuartii</i>	BHKPC23	HRTN	153x	213454	CP132247-CP132248
<i>Providencia stuartii</i>	BHKPC27	HRTN	149x	78438	CP132249-CP132252
<i>Enterobacter cloacae</i>	BHKPC28	HRTN	84x	191661	JALKVG000000000
<i>Providencia stuartii</i>	BHKPC29	HRTN	124x	185696	CP132253-CP132254
<i>Providencia stuartii</i>	BHKPC30	HRTN	147x	284876	CP132255-CP132256
<i>Providencia stuartii</i>	BHKPC31	HRTN	183x	523668	CP132257-CP132258
<i>Providencia stuartii</i>	BHKPC35	HRTN	182x	157733	CP132259-CP132262
<i>Escherichia coli</i>	BHKPC37	HRTN	221x	200154	CP132085-CP132090
<i>Providencia stuartii</i>	BHKPC41	HRTN	105x	457351	CP132263-CP132264

(continua)

(continuação)

<i>Enterobacter hormaechei</i>	BHKPC43	HRTN	47x	150982	CP132265-CP132270
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	BHKPC44	HRTN	87x	323337	JAVCPE000000000
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	BHKPC47	HRTN	167x	305448	JAVCPF000000000
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	BHKPC50	HRTN	134x	322859	CP132091-CP132096
<i>Klebsiella aerogenes</i>	BHKPC52	HRTN	207x	261144	JAVCPG000000000
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	RPKP04	HCRP	95x	203910	JAVCPH000000000
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	RPKP15	HCRP	65x	294697	JAVCPI000000000
<i>Enterobacter hormaechei</i>	RPEC01	HCRP	28x	127114	CP132271-CP132278
<i>Escherichia coli</i>	RPECL001	HCRP	56x	121169	CP132097-CP132101
<i>Escherichia coli</i>	<i>E. coli</i> J53	-	263x	133063	CP132102

Fonte: Elaborada pela autora.

#### 4.1.6 Disseminação do gene *bla<sub>KPC</sub>* dentre os isolados sequenciados

Os dados das primeiras análises realizadas com os genomas sequenciados estão dispostos na Tabela 10.

Notou-se alta diversidade de STs dentre isolados de mesma espécie, o que era esperado devido as etapas de triagem adotadas no estudo, principalmente a exclusão de isolados com 100% de similaridade genômica de acordo com o PFGE. Além disso, foram analisados os perfis alélicos de cada ST e não foram encontrados *single locus variants* dentre os isolados de STs diferentes, indicando maior diversidade genética.

Apesar da diversidade genética indicada pelas classificações por ST dos isolados, ao analisar o contexto genético do gene *bla<sub>KPC</sub>* notou-se que este se encontrava no mesmo ambiente genético em todos os isolados selecionados, o NTE<sub>KPC</sub>-IId (Tabela 10). Além disso, em 27 dos 29 isolados, o ambiente genético carreando *bla<sub>KPC</sub>* estava abrigado em plasmídeos IncQ1 similares (Figura 15) (Tabela 10). As exceções são dois isolados do HCRP que apresentaram o NTE<sub>KPC</sub>-IId em um plasmídeo IncX3 de aproximadamente 46 kpb (Figura 16) (Tabela 10).

Tabela 10 - Dados de ST ao qual pertencem e do contexto genético do gene *bla<sub>KPC</sub>* nos isolados sequenciados

Espécie	Isolado	Hospital	ST	Ambiente genético <i>bla<sub>KPC</sub></i>	Plasmídeo <i>bla<sub>KPC</sub></i>	Tamanho plasmídeo <i>bla<sub>KPC</sub></i> (pb)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	BHKPC03	HRTN	11	NTE <sub>KPC</sub> -IId	IncQ1	10946
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	BHKPC04	HRTN	11	NTE <sub>KPC</sub> -IId	IncQ1	10952
<i>Klebsiella aerogenes</i>	BHKPC06	HRTN	4	NTE <sub>KPC</sub> -IId	IncQ1	10948

(continua)

(continuação)

<i>Enterobacter hormaechei</i>	BHKPC07	HRTN	93	NTE <sub>KPC</sub> -IId	IncQ1	10949
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	BHKPC08	HRTN	35	NTE <sub>KPC</sub> -IId	IncQ1	10941
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	BHKPC10	HRTN	35	NTE <sub>KPC</sub> -IId	IncQ1	10947
<i>Escherichia coli</i>	BHKPC11	HRTN	1001	NTE <sub>KPC</sub> -IId	IncQ1	10952
<i>Escherichia coli</i>	BHKPC13	HRTN	127	NTE <sub>KPC</sub> -IId	IncQ1	10982
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	BHKPC15	HRTN	603	NTE <sub>KPC</sub> -IId	IncQ1	10949
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	BHKPC18	HRTN	11	NTE <sub>KPC</sub> -IId	IncQ1	10950
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	BHKPC21	HRTN	1517*	NTE <sub>KPC</sub> -IId	IncQ1	10946
<i>Providencia stuartii</i>	BHKPC23	HRTN	-	NTE <sub>KPC</sub> -IId	IncQ1	10949
<i>Providencia stuartii</i>	BHKPC27	HRTN	-	NTE <sub>KPC</sub> -IId	IncQ1	10946
<i>Enterobacter cloacae</i>	BHKPC28	HRTN	850	NTE <sub>KPC</sub> -IId	IncQ1	14620
<i>Providencia stuartii</i>	BHKPC29	HRTN	-	NTE <sub>KPC</sub> -IId	IncQ1	10949
<i>Providencia stuartii</i>	BHKPC30	HRTN	-	NTE <sub>KPC</sub> -IId	IncQ1	10948
<i>Providencia stuartii</i>	BHKPC31	HRTN	-	NTE <sub>KPC</sub> -IId	IncQ1	10949
<i>Providencia stuartii</i>	BHKPC35	HRTN	-	NTE <sub>KPC</sub> -IId	IncQ1	10949
<i>Escherichia coli</i>	BHKPC37	HRTN	457	NTE <sub>KPC</sub> -IId	IncQ1	10950
<i>Providencia stuartii</i>	BHKPC41	HRTN	-	NTE <sub>KPC</sub> -IId	IncQ1	10949
<i>Enterobacter hormaechei</i>	BHKPC43	HRTN	114	NTE <sub>KPC</sub> -IId	IncQ1	10948
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	BHKPC44	HRTN	29	NTE <sub>KPC</sub> -IId	IncQ1	10948
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	BHKPC47	HRTN	147	NTE <sub>KPC</sub> -IId	IncQ1	10952
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	BHKPC50	HRTN	874	NTE <sub>KPC</sub> -IId	IncQ1	10949
<i>Klebsiella aerogenes</i>	BHKPC52	HRTN	4	NTE <sub>KPC</sub> -IId	IncQ1	18248
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	RPKP04	HCRP	258	NTE <sub>KPC</sub> -IId	IncX3	46146
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	RPKP15	HCRP	423	NTE <sub>KPC</sub> -IId	IncQ1	10944
<i>Enterobacter hormaechei</i>	RPEC01	HCRP	536	NTE <sub>KPC</sub> -IId	IncQ1	10946
<i>Escherichia coli</i>	RPECLO01	HCRP	69	NTE <sub>KPC</sub> -IId	IncX3	46324

\*- ST mais próxima encontrada.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os plasmídeos IncQ1 possuem cerca de 10,5 kpb e, além do NTE<sub>KPC</sub>-IId, abrigam outro gene de resistência. O gene *aph(3')-Via* codifica uma fosfotransferase amiglicosídica relacionada à resistência a aminoglicosídeos. Além disso, os plasmídeos possuem genes que permitem suas mobilizações para outras células, porém, dependendo de um T4SS de um plasmídeo conjugativo, sendo assim, classificados como não conjugativos, mas mobilizáveis (Figura 15).

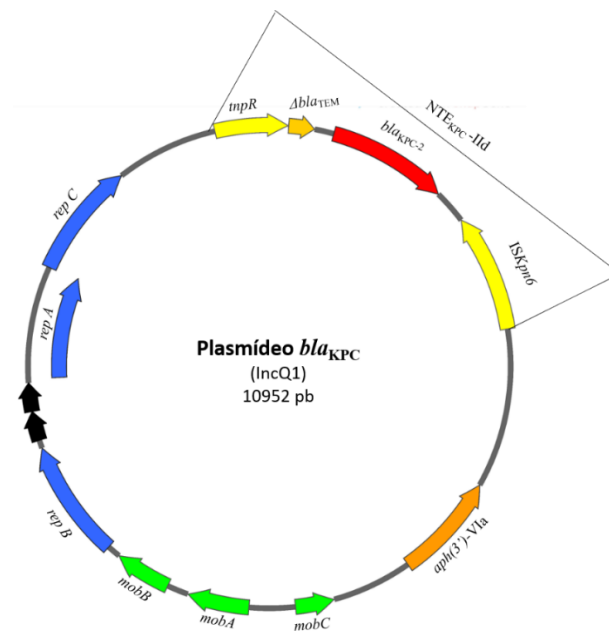


Figura 15 - Mapa representando os plasmídeos IncQ1 carreado o gene *bla*<sub>KPC</sub> em 27 dos 29 isolados sequenciados. O gene da *bla*<sub>KPC</sub> está representado em vermelho, o ambiente genético do gene está representado em amarelo, outros genes de resistência estão representados em laranja, iniciadores de replicação do plasmídeo estão representados em azul e genes envolvidos na mobilização do plasmídeo estão representados em verde.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os plasmídeos IncX3 possuem cerca de 46 kpb e, além do NTE<sub>KPC-IIId</sub>, não abrigam outros genes de resistência. Porém, esses plasmídeos possuem a maquinaria de conjugação completa, sendo assim, classificados como conjugativos, possibilitando sua disseminação horizontal para outras linhagens (Figura 16).

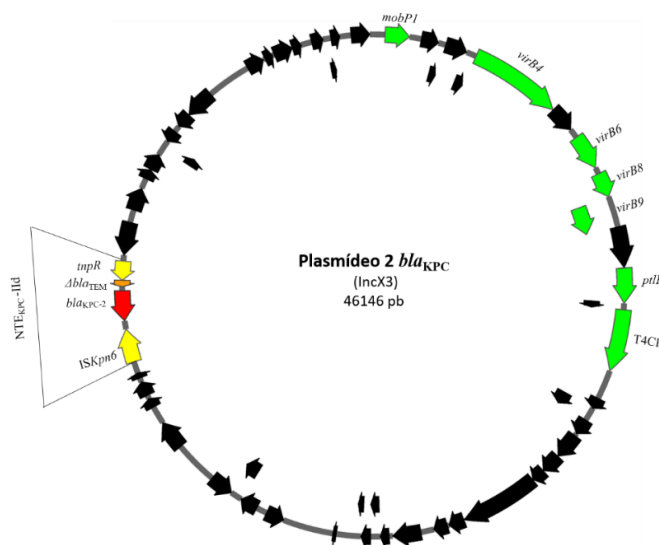


Figura 16 - Mapa representando os plasmídeos IncX3 carreado o gene *bla*<sub>KPC</sub> em 2 dos 29 isolados sequenciados. O gene da *bla*<sub>KPC</sub> está representado em vermelho, o ambiente genético do gene está representado em amarelo, outros genes de resistência estão representados em laranja, e genes envolvidos na mobilização do plasmídeo estão representados em verde.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os 23 isolados do HRTN, com exceção de *Enterobacter cloacae* BHKPC28 e *K. aerogenes* BHKPC52, apresentaram o gene *bla*<sub>KPC</sub> em contextos genéticos similares, bem como *K. pneumoniae* RPKP15 e *E. hormaechei* RPEC01, de forma que esses 25 plasmídeos foram alinhados e comparados entre si com auxílio do *software Proksee* a fim de demonstrar tal similaridade (Figura 17).

O plasmídeo abrigando *bla*<sub>KPC</sub> em *K. aerogenes* BHKPC52 apresenta uma duplicação de uma região de cerca de 7,7 kpb correspondente a toda porção do plasmídeo que não pertence ao NTE<sub>KPC</sub>-IId. Devido a isso, possui cerca de 18 kpb, diferentemente dos 10,5 kpb dos demais.

A linhagem *E. cloacae* BHKPC28 se tornou de grande interesse deste estudo, pois, além de carrear o gene *bla*<sub>KPC</sub> também abriga o gene *mcr-9*, relacionado à resistência às polimixinas e, devido a isso, será abordada em um capítulo específico ao final desta sessão de resultados.

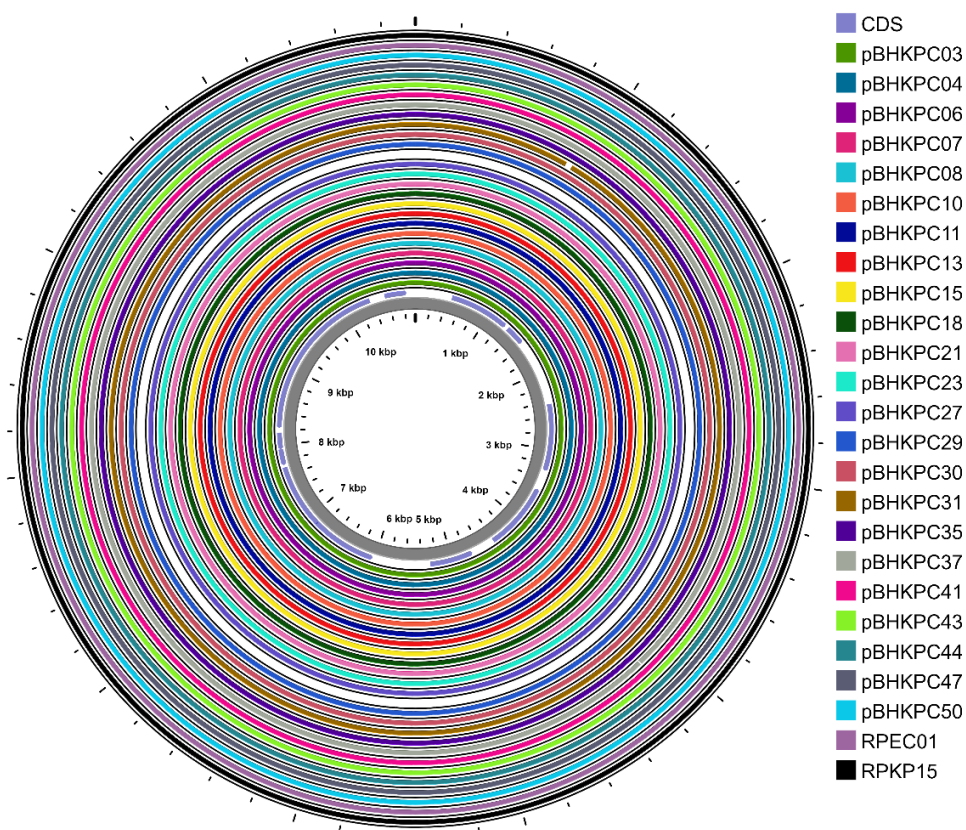


Figura 17 - Esquema da comparação entre os plasmídeos IncQ1 dos 25 isolados que apresentavam o mesmo sem grandes modificações.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os dois plasmídeos IncX3 carreando *bla*<sub>KPC</sub> em *K. pneumoniae* RPKP04 e *E. coli* RPECLO01 também foram comparados entre si com auxílio do *software Proksee* (Figura 18).

Dados de alinhamento entre os plasmídeos indicaram que os mesmos compartilham 99,98% de identidade e 100% de cobertura.

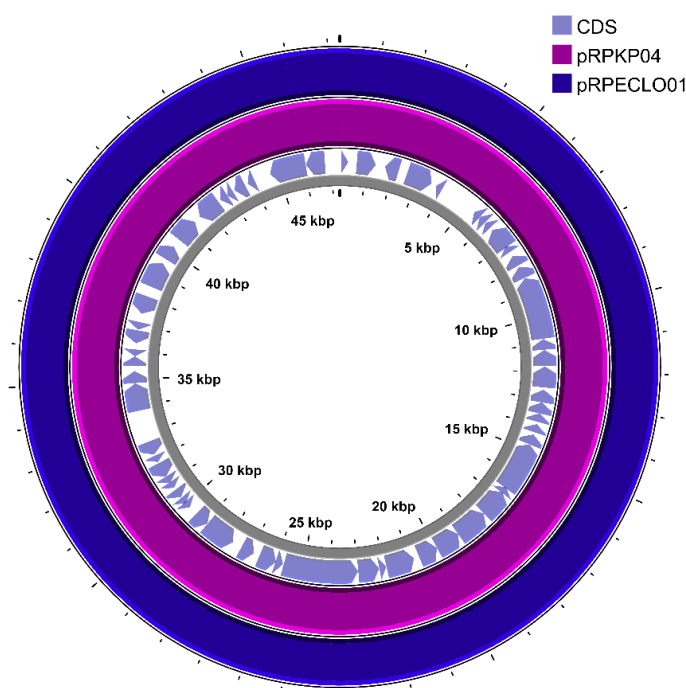


Figura 18 - Esquema da comparação entre os plasmídeos IncX3 de *K. pneumoniae* RPKP04 e *E. coli* RPECLO01.

Fonte: Elaborada pela autora.

#### 4.1.7 Isolados apresentaram diferentes populações de plasmídeos

Apesar dos plasmídeos abrigando o gene *bla<sub>KPC</sub>* serem semelhantes dentre a maioria dos isolados, diferentes populações de plasmídeos foram observadas em cada um. Estes plasmídeos apresentam diferentes características relacionadas a grupo de incompatibilidade, capacidade de conjugação/mobilização e genes de resistência abrigados (Tabelas 11, 12, 13, 14 e 15).

Notam-se 8 isolados de três diferentes espécies, sendo duas *E. coli*, uma *K. pneumoniae* e 5 *P. stuartii*, que possuem apenas o plasmídeo IncQ1 em seus genomas. O fato deste plasmídeo ter se disseminado para diferentes espécies indica transferência horizontal de genes. Porém, os plasmídeos IncQ1 desse estudo foram classificados como mobilizáveis, e só podem ter se transferido juntamente com outros plasmídeos conjugativos. Assim, supõe-se que plasmídeos conjugativos possibilitaram a transferência dos plasmídeos IncQ1 e, posteriormente, foram perdidos pelas células. Além disso, somente *K. pneumoniae* BHKPC44, *K. pneumoniae* RPKP15, *E. hormaechei* BHKPC07 não apresentaram nenhum plasmídeo

classificado como conjugativo, indicando que algum/alguns deste/destes foram perdidos após possibilitarem a transferência dos demais.

Dentre os isolados de *K. pneumoniae* pode-se notar grupos com populações de plasmídeos similares, como BHKPC03, BHKPC04 e BHKPC18, além de BHKPC08 e BHKPC10, porém, ainda assim devido ao maior número de isolados dessa espécie, ainda há diversidade entre as populações de plasmídeos (Tabela 11).

Tabela 11 - Dados de localização dos genes de resistência em cada isolado e de caracterização das populações de plasmídeos presentes em cada isolado de *K. pneumoniae*

Cromossomo/Plasmídeos	Contig	Classificação	Genes de resistência	Mobilização	Tamanho (pb)
cromossomo_BHKPC03	1	-	<i>fosA, OqxA, OqxB,</i>	-	5.437.498
pBHKPC03_1	2	IncFIB(pNDM-Mar) / IncHI1B(pNDM-MAR)	<i>aad1, aac(6')-Iq, sul2, sul1, dfrA15, sul1, aadA1, bla<sub>SHV-182</sub>, bla<sub>CTX-M-2</sub>, qacE</i>	Mobilizável	324.226
pBHKPC03_2	3	IncFII(K) / repB(R1701)	-	Conjugativo	94.287
pBHKPC03_3	4	IncM1	-	Conjugativo	73.682
pBHKPC03_4	5	IncR	-	Não mobilizável	22.698
pBHKPC03_5	8	IncQ1	<i>aph(3')-Via, bla<sub>KPC-2</sub></i>	Mobilizável	10.946
pBHKPC03_6	9	NI	-	Mobilizável	5.647
pBHKPC03_7	12	Col(pHAD28)	-	Mobilizável	4.096
cromossomo_BHKPC04	1	-	<i>fosA, OqxB, OqxA, bla<sub>SHV-182</sub></i>	-	5.373.033
pBHKPC04_1	2	IncFIB(pNDM-Mar) / IncHI1B(pNDM-MAR)	<i>aadA1, aac(6')-Iq, sul1, dfrA15, sul2, bla<sub>CTX-M-2</sub>, qacE</i>	Mobilizável	323.238
pBHKPC04_2	3	IncFII(K) / repB(R1701)	-	Conjugativo	95.748
pBHKPC04_3	4	IncM1	-	Conjugativo	73.628
pBHKPC04_4	6	IncR	-	Não mobilizável	49.739
pBHKPC04_5	8	IncQ1	<i>aph(3')-Via, bla<sub>KPC-2</sub></i>	Mobilizável	10.952
pBHKPC04_6	9	NI	-	Mobilizável	5.647
pBHKPC04_7	11	Col(pHAD28)	-	Mobilizável	4.096
cromossomo_BHKPC08	1	-	<i>fosA, OqxA, OqxB, bla<sub>SHV-33</sub></i>	-	4.700.919
cromossomo2_BHKPC08	2	-	-	-	533.736
pBHKPC08_1	3	IncFIB(K)	-	Conjugativo	187.694
pBHKPC08_2	4	NI	-	Conjugativo	54.440

(continua)

(continuação)					
pBHKPC08_3	5	IncQ1	<i>aph(3')-Via, bla<sub>KPC</sub>-<sub>2</sub></i>	Mobilizável	10.941
pBHKPC08_4	7	NI	-	Não mobilizável	3.679
cromossomo_BHKPC10	1	-	<i>fosA, OqxB, OqxA, bla<sub>SHV-33</sub></i>	-	5.069.383
cromossomo2_BHKPC10	3	-	-	-	158.775
pBHKPC10_1	2	IncFIB(K)	-	Conjugativo	187.693
pBHKPC10_2	4	NI	-	Conjugativo	54.440
pBHKPC10_3	5	IncQ1	<i>aph(3')-Via, bla<sub>KPC</sub>-<sub>2</sub></i>	Mobilizável	10.947
pBHKPC10_4	8	NI	-	Não mobilizável	3679
cromossomo_BHKPC15	1	-	<i>fosA, OqxB, OqxA, bla<sub>SHV-172</sub></i>	-	5.321.796
pBHKPC15_1	2	IncQ1	<i>aph(3')-Via, bla<sub>KPC</sub>-<sub>2</sub></i>	Mobilizável	10.949
cromossomo_BHKPC18	1	-	<i>fosA, OqxA, OqxB, bla<sub>SHV-182</sub></i>	-	5.455.033
pBHKPC18_1	2	IncFIB(pNDM-Mar) / IncHI1B(pNDM-MAR)	<i>aac(6')-Iq, aadA1, sul1, dfrA15, sul2, bla<sub>CTX-M-2</sub>, qacE</i>	Mobilizável	326.748
pBHKPC18_2	3	IncFII(K) / repB(R1701)	-	Conjugativo	90.171
pBHKPC18_3	4	IncM1	-	Conjugativo	73.682
pBHKPC18_4	5	IncR	-	Não mobilizável	50.939
pBHKPC18_5	6	IncQ1	<i>aph(3')-Via, bla<sub>KPC</sub>-<sub>2</sub></i>	Mobilizável	10.950
pBHKPC18_6	7	NI	-	Mobilizável	5674
cromossomo_BHKPC21	1	-	<i>fosA, OqxA, OqxB, bla<sub>SHV-40</sub>, bla<sub>SHV-56</sub>, bla<sub>SHV-89</sub>, bla<sub>SHV-79</sub>, bla<sub>SHV-85</sub></i>	-	5.300.457
pBHKPC21_1	2	IncFIA(pBK30683) / IncFIB(K)(pCAV1099-114)	-	Conjugativo	165.354
pBHKPC21_2	3	IncQ1	<i>aph(3')-Via, bla<sub>KPC</sub>-<sub>2</sub></i>	Mobilizável	10.946
pBHKPC21_3	4	Col440II	-	Mobilizável	5.252
pBHKPC21_4	5	NI	<i>qnrB19</i>	Mobilizável	3.947
cromossomo_BHKPC44	1	-	<i>fosA, OqxB, OqxA, bla<sub>SHV-187</sub></i>	-	5.218.814
pBHKPC44_1	2	IncFIB(pKPHS1)	-	Não Mobilizável	107.402
pBHKPC44_2	3	IncFIB(K) / IncFII(K)	-	Mobilizável	93.841

(continua)



(continuação)

pBHKPC44_3	5	IncQ1	<i>aph(3')-Via, bla<sub>KPC-2</sub></i>	Mobilizável	10.948
pBHKPC44_4	6	Col440I	-	Não Mobilizável	6.937
pBHKPC44_5	7	NI	-	Não mobilizável	4.773
-	4, 10 e 11	-	<i>aph(6)-Id, aph(3'')-Ib, qnrB1, dfrA14, sul2, bla<sub>CTX-M-15</sub>, bla<sub>TEM-1B</sub>, aac(3)-Iia, aac(6')-Ib-cr, bla<sub>OXA-1</sub>, catB3</i>	Parte de um plasmídeo	-
cromossomo_BHKPC47	1	-	<i>OqxB, OqxA, bla<sub>SHV-67</sub>, bla<sub>SHV-11</sub> msr(E), fosA, mph(A), mph(E), qnrB4, sull1, bla<sub>DHA-1</sub>, qacE</i>	-	5.356.393
pBHKPC47_1	2	IncM2	<i>mph(A), mph(E), qnrB4, sull1, bla<sub>DHA-1</sub>, qacE</i>	Conjugativo	82.937
pBHKPC47_2	4	IncR	<i>aph(3'')-Ib, aph(6)-Id, bla<sub>CTX-M-15</sub></i>	Não mobilizável	51.328
pBHKPC47_3	5	IncQ1	<i>aph(3')-Via, bla<sub>KPC-2</sub></i>	Mobilizável	10.952
pBHKPC47_4	7	NI	-	Mobilizável	3.223
pBHKPC47_5	8	Col(pHAD28)	-	Não mobilizável	2.495
cromossomo_BHKPC50	1	-	<i>fosA, bla<sub>CTX-M-15</sub>, bla<sub>SHV-121</sub></i>	-	5.386.786
pBHKPC50_1	2	IncFIB(K)	-	Conjugativo	193.125
pBHKPC50_2	3	IncN/IncR	<i>aac(3)-Iia, aph(3'')-Ib, aac(6')-Ib-cr, aph(6)-Id, aadA5, mph(A), dfrA17, sull1, aadA5, bla<sub>OXA-1</sub>, bla<sub>CTX-M-15</sub>, qacE, catB3</i>	Não mobilizável	62.588
pBHKPC50_3	4	NI	-	Não mobilizável	59.704
pBHKPC50_4	5	IncQ1	<i>aph(3')-Via, bla<sub>KPC-2</sub></i>	Mobilizável	10.949
pBHKPC50_5	6	NI	-	Não mobilizável	3.614
cromossomo_RPKP04	1	-	<i>fosA, OqxA, OqxB, bla<sub>SHV-182</sub></i>	-	3.394.300
pRPKP04_1	2	IncFIB(K) / IncFII(K)	<i>aph(3')-Ia, aadA2, mph(A), dfrA12, sull1, dfrA12, bla<sub>CTX-M-14</sub>, qacE, catA1</i>	Conjugativo	208.311

(continua)

(continuação)

pRPKP04_2	3	IncC	<i>erm(42), aph(3'')-Ib, aadA2, rmtB, aac(3)-Iid, aph(6)-Id, sul1, sul2, tet(G), bla<sub>TEM-1B</sub>, qacE</i>	Conjugativo	176.335
pRPKP04_3	4	IncX3	<i>bla<sub>KPC-2</sub></i>	Conjugativo	46.146
pRPKP04_4	5	ColRNAI	-	Mobilizável	9.294
cromossomo_RPKP15	1	-	<i>fosA, OqxA, OqxB, bla<sub>SHV-79</sub>, bla<sub>SHV-89</sub>, bla<sub>SHV-40</sub>, bla<sub>SHV-56</sub>, bla<sub>SHV-85</sub></i>	-	5.256.822
pRPKP15_1	2	NI	-	Não mobilizável	100.182
pRPKP15_3	4	IncQ1	<i>aph(3')-Via, bla<sub>KPC-2</sub></i>	Mobilizável	10.944

NI: Não identificado.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os isolados de *K. aerogenes*, *Enterobacter hormaechei* e *E. cloacae* apresentam diversidade de plasmídeos, e nenhum apresentou apenas o plasmídeo do *bla<sub>KPC</sub>*. *K. aerogenes* BHKPC06 e BHKPC52 abrigam populações de plasmídeos parecidas, com exceção da presença de um plasmídeo IncM1 em *K. aerogenes* BHKPC06 e das diferenças de mobilização e genes de resistências presentes nos plasmídeos IncC (Tabelas 12 e 13).

Tabela 12 - Dados de localização dos genes de resistência em cada isolado e de caracterização das populações de plasmídeos presentes em cada isolado de *K. aerogenes*

Cromossomo/Plasmídeos	Contig	Classificação	Genes de resistência	Mobilização	Tamanho
cromossomo_BHKPC06	1	-	<i>fosA</i>	-	3.307.240
pBHKPC06_1	2	IncC	<i>aac(3)-Iia, qacE, sul1, dfrA22, bla<sub>TEM-1B</sub>, bla<sub>CTX-M-2</sub></i>	Não mobilizável	83.448
pBHKPC06_2	3	IncM1	-	Conjugativo	73.682
pBHKPC06_3	4	IncQ1	<i>aph(3')-Via, bla<sub>KPC-2</sub></i>	Mobilizável	10.948
pBHKPC06_4	5	ColRNAI	-	Mobilizável	9.294
cromossomo_BHKPC52	1	-	<i>fosA</i>	-	5.436.500
pBHKPC52_1	2	IncC	<i>msr(E), aac(6')-Ib-cr, aac(3)-Iia, aac(6')-Ib3, mph(E), sul1, bla<sub>TEM-1B</sub>, bla<sub>OXA-2</sub>, qacE</i>	Conjugativo	153.890
pBHKPC52_2	3	IncQ1	<i>aph(3')-Via, bla<sub>KPC-2</sub></i>	Mobilizável	18.248
pBHKPC52_3	4	ColRNAI	-	Mobilizável	9.294

NI: Não identificado.

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 13 - Dados de localização dos genes de resistência em cada isolado e de caracterização das populações de plasmídeos presentes em cada isolado de *Enterobacter* spp.

Cromossomo/Plasmídeos	Contig	Classificação	Genes de resistência	Mobilização	Tamanho
cromossomo_BHKPC07	1	-	<i>fosA, bla<sub>ACT-7</sub></i>	-	4.803.210
pBHKPC07_1	2	NI	<i>aph(6)-Id, aadA1, aac(3)-Iia, aac(6')-Ib-cr, aph(3'')-Ib, qnrB1, dfrA14, sul2, tet(A), bla<sub>CTX-M-15</sub>, bla<sub>OXA-1</sub>, bla<sub>TEM-1B</sub>, catB3, catA1</i>	Mobilizável	234.132
pBHKPC07_2	3	IncQ1	<i>aph(3')-Via, bla<sub>KPC-2</sub></i>	Mobilizável	10.949
pBHKPC07_3	4	Col(pHAD28)	-	Mobilizável	4.096
cromossomo_BHKPC43	1	-	<i>aadA1, fosA, dfrA1, sul1, bla<sub>ACT-16</sub>, qacE</i>	-	4.890.604
pBHKPC43_1	2	IncHI2/IncHI2A	<i>aph(6)-Id, qnrB1, dfrA14, sul2, tet(A), bla<sub>TEM-1B</sub>, catA1</i>	Conjugativo	309.583
pBHKPC43_2	3	IncFII(pCRY)	-	Conjugativo	40.314
pBHKPC43_3	4	IncQ1	<i>aph(3')-Via, bla<sub>KPC-2</sub></i>	Mobilizável	10.948
pBHKPC43_4	5	NI	-	Mobilizável	3.223
pBHKPC43_5	6	Col(pHAD28)	-	Não mobilizável	2.495
cromossomo_RPEC01	1	-	<i>aac(3)-Iia, aac(6')-Ib-cr, fosA, dfrA14, tet(A), bla<sub>OXA-1</sub>, bla<sub>ACT-15</sub>, bla<sub>CTX-M-15</sub>, catB3</i>	-	4.768.111
pRPEC01_1	2	IncX3	-	Conjugativo	38.804
pRPEC01_2	3	IncQ1	<i>aph(3')-Via, bla<sub>KPC-2</sub></i>	Mobilizável	10.946
pRPEC01_3	4	NI	-	Mobilizável	6.237
pRPEC01_4	5	NI	-	Mobilizável	4.096
pRPEC01_5	6	NI	-	Mobilizável	4.067
pRPEC01_6	7	Col(pHAD28)	<i>qnrB19</i>	Não mobilizável	2.989
pRPEC01_7	8	ColpVC	-	Não mobilizável	1.848

NI: Não identificado.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os isolados de *E. coli* apresentam diversidade de plasmídeos, sendo o IncQ1 o único plasmídeo que as linhagens compartilham. *E. coli* BHKPC11 e BHKPC13 foram as únicas que apresentaram somente o plasmídeo IncQ1 sendo que a primeira abriga somente mais um gene de resistência, além dos carreados pelo plasmídeo. *E. coli* BHKPC13 apresenta outros genes de resistência abrigados no seu cromossomo: *aadA1, dfrA1, sul1, sitABCD, bla<sub>TEM-1A</sub>, qacE* e *catA1* (Tabela 14).

Tabela 14 - Dados de localização dos genes de resistência em cada isolado e de caracterização das populações de plasmídeos presentes em cada isolado de *E. coli*

Cromossomo/Plasmídeos	Contig	Classificação	Genes de resistência	Mobilização	Tamanho
cromossomo_BHKPC11	1	-	<i>sitABCD</i>	-	4.817.895
pBHKPC11_1	2	IncQ1	<i>aph(3')-Via, bla<sub>KPC-2</sub></i>	Mobilizável	10.952
cromossomo_BHKPC13	1	-	<i>aadA1, dfrA1, sul1, sitABCD, bla<sub>TEM-1A</sub>, qacE, catA1</i>	-	5.275.482
pBHKPC13_1	2	IncQ1	<i>aph(3')-Via, bla<sub>KPC-2</sub></i>	Mobilizável	10.982
cromossomo_BHKPC37	1	-	-	-	4.955.215
pBHKPC37_1	2	IncFIB(AP001918)	<i>aadA2b, aadA1, dfrA8, sul3, tet(A), bla<sub>TEM-1B</sub>, qacL, cmlA1, floR</i>	Conjugativo	94.640
pBHKPC37_2	3	IncM1	-	Conjugativo	68.006
pBHKPC37_3	4	IncQ1	<i>aph(3')-Via, bla<sub>KPC-2</sub></i>	Mobilizável	10.950
pBHKPC37_4	5	NI	-	Mobilizável	4.067
pBHKPC37_5	6	Col(pHAD28)	<i>qnrB19</i>	Não mobilizável	2.989
cromossomo_RPECLO01	1	-	<i>sitABCD</i>	-	5.128.999
pRPECLO01_1	2	IncC	<i>erm(42), aph(6)-Id, aph(3'')-Ib, aadA2, rmtB, aac(3)-Iid, sul2, dfrA12, sul1, tet(G), bla<sub>TEM-1B</sub>, bla<sub>CTX-M-14</sub>, qacE</i>	Conjugativo	176.336
pRPECLO01_2	3	IncFIB(AP001918) / IncFII(29)	<i>tet(B), bla<sub>TEM-1B</sub></i>	Não mobilizável	94.852
pRPECLO01_3	4	IncX3	<i>bla<sub>KPC-2</sub></i>	Conjugativo	46.324
pRPECLO01_4	5	NI	-	Mobilizável	5.165

NI: Não identificado.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os isolados de *P. stuartii* são os que apresentam menor diversidade de população de plasmídeos, sendo que cinco dos sete isolados abrigam apenas o plasmídeo IncQ1 que carrega *bla<sub>KPC</sub>* e *aph(3')-Via*. Além disso, os cromossomos das sete linhagens abrigam os mesmos genes de resistência: *aac(2')-Ia*, *catA3* e *tet(B)*. Por fim, *P. stuartii* BHKPC27 e BHKPC35 abrigam dois outros plasmídeos, conjugativos, incluindo um plasmídeo IncC abrigando oito genes de resistência: *aac(3)-Iia*, *aac(6')-Ib3*, *aac(6')-Ib-cr*, *sul1*, *bla<sub>TEM-1B</sub>*, *bla<sub>OXA-2</sub>*, *bla<sub>CTX-M-2</sub>*, *qacE* (Tabela 15)

Tabela 15 - Dados de localização dos genes de resistência em cada isolado e de caracterização das populações de plasmídeos presentes em cada isolado de *P. stuartii*

Cromossomo/Plasmídeos	Contig	Classificação	Genes de resistência	Mobilização	Tamanho
cromossomo_BHKPC23	1	-	<i>aac(2')-Ia, catA3, tet(B)</i>	-	4.375.260
pBHKPC23_1	2	IncQ1	<i>aph(3')-Via, bla<sub>KPC-2</sub></i>	Mobilizável	10.949
cromossomo_BHKPC27	1	-	<i>aac(2')-Ia, tet(B), catA3</i>	-	4.458.479
pBHKPC27_1	2	IncC	<i>aac(3)-Iia, aac(6')-Ib3, aac(6')-Ib-cr, sul1, bla<sub>TEM-1B</sub>, bla<sub>OXA-2</sub>, bla<sub>CTX-M-2</sub>, qacE</i>	Conjugativo	169.130
pBHKPC27_2	3	NI	-	Conjugativo	36.059
pBHKPC27_3	4	IncQ1	<i>aph(3')-Via, bla<sub>KPC-2</sub></i>	Mobilizável	10.946
cromossomo_BHKPC29	1	-	<i>aac(2')-Ia, tet(B), catA3</i>	-	4.376.968
pBHKPC29_1	2	IncQ1	<i>aph(3')-Via, bla<sub>KPC-2</sub></i>	Mobilizável	10.949
cromossomo_BHKPC30	1	-	<i>aac(2')-Ia, tet(B), catA3</i>	-	4.374.916
pBHKPC30_1	2	IncQ1	<i>aph(3')-Via, bla<sub>KPC-2</sub></i>	Mobilizável	10.948
cromossomo_BHKPC31	1	-	<i>aac(2')-Ia, tet(B), catA3</i>	-	4.374.698
pBHKPC31_1	2	IncQ1	<i>aph(3')-Via, bla<sub>KPC-2</sub></i>	Mobilizável	10.949
cromossomo_BHKPC35	1	-	<i>aac(2')-Ia, tet(B), catA3</i>	-	4.458.749
pBHKPC35_1	2	IncC	<i>aac(3)-Iia, aac(6')-Ib3, aac(6')-Ib-cr, sul1, bla<sub>CTX-M-2</sub>, bla<sub>TEM-1B</sub>, bla<sub>OXA-2</sub>, qacE</i>	Conjugativo	169.130
pBHKPC35_2	3	NI	-	Conjugativo	36.059
pBHKPC35_3	4	IncQ1	<i>aph(3')-Via, bla<sub>KPC-2</sub></i>	Mobilizável	10.949
cromossomo_BHKPC41	1	-	<i>aac(2')-Ia, tet(B), catA3</i>	-	4.374.816
pBHKPC41_1	2	IncQ1	<i>aph(3')-Via, bla<sub>KPC-2</sub></i>	Mobilizável	10.949

NI: Não identificado.

Fonte: Elaborada pela autora.

#### 4.1.8 Análise comparativa dos valores de CIM de carbapenêmicos e NCP dos plasmídeos carreando *bla<sub>KPC</sub>*

Como visto nas seções anteriores, não foi observada alta diversidade de ambientes genéticos e plasmídeos carreando *bla<sub>KPC</sub>*. Porém, foi obtido uma diversidade de *backgrounds* para esses plasmídeos e ambientes genéticos, ou seja, há isolados com diferentes populações de plasmídeos e de diferentes espécies abrigando o gene *bla<sub>KPC</sub>*.

A fim de analisar se há relações diretas entre os diferentes *backgrounds* e certas características do gene *bla<sub>KPC</sub>* foram comparados valores de CIM de imipenem e meropenem e também os NCPs para os diferentes isolados (Tabela 16).

Os valores de CIM obtidos foram próximos uns dos outros, com exceção de *K. pneumoniae* RPKP04, *K. aerogenes* BHKPC06 e BHKPC52 que apresentaram valores mais altos que as demais. Vale ressaltar que as três linhagens possuem populações de plasmídeos parecidas (Tabela 16).

Todos os isolados de *P. stuartii* apresentaram altos valores de CIM de imipenem. Por outro lado, *E. coli* BHKPC37 e RPECLO01 apresentaram valores de CIM dos carbapenêmicos que as classificam com sensíveis, de acordo com os parâmetros definidos pelo BrCAST (Tabela 16).

Os dados de NCP indicam uma relação entre o mesmo e a espécie que abriga o gene *bla<sub>KPC</sub>*. Os maiores valores foram encontrados nos isolados de *K. pneumoniae*, com exceção de *K. pneumoniae* BHKPC15 e RPKP04. *K. pneumoniae* BHKPC15 é o único isolado de *K. pneumoniae* que só abriga o plasmídeo IncQ1 carregando *bla<sub>KPC</sub>* e *K. pneumoniae* RPKP04 é o único isolado de *K. pneumoniae* que abriga o NTE<sub>KPC</sub>-IId no plasmídeo IncX3 (Tabela 16).

Os menores valores foram obtidos com os isolados de *P. stuartii* independente da população de plasmídeos, indicando que os plasmídeos IncQ1 estão presentes em uma única cópia (Tabela 16).

Os isolados de *E. coli*, *K. aerogenes* e *Enterobacter* spp. apresentaram valores parecidos de NCP e o menor valor dentre essas espécies foi encontrado para a linhagem *E. coli* RPECLO01, que de forma semelhante a *K. pneumoniae* RPKP04, possui o o NTE<sub>KPC</sub>-IId no plasmídeo IncX3 (Tabela 16).

Não foram observados padrões entre os valores de CIM e o NCP.

Tabela 16 - Valores de CIM de imipenem e meropenem e do NCP dos plasmídeos carregando *bla<sub>KPC</sub>* de cada isolado

Espécie	Isolado	CIM <sub>Imipenem</sub> (mg/L)	CIM <sub>Meropenem</sub> (mg/L)	NCP plasmídeos <i>bla<sub>KPC</sub></i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	BHKPC03	8	16	99 ± 1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	BHKPC04	32	32	417 ± 4
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	BHKPC08	32	32	125 ± 2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	BHKPC10	32	32	357 ± 4
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	BHKPC15	16	32	18,8 ± 0,8
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	BHKPC18	64	64	152 ± 1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	BHKPC21	32	32	223 ± 2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	BHKPC44	8	16	109,3 ± 0,7

(continua)

(continuação)

<i>Klebsiella pneumoniae</i>	BHKPC47	8	16	110 ± 3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	BHKPC50	8	16	335 ± 3
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	RPKP04	128	256	6,2 ± 0,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	RPKP15	8	16	74 ± 1
<i>Klebsiella aerogenes</i>	BHKPC06	64	128	12,9 ± 0,2
<i>Klebsiella aerogenes</i>	BHKPC52	64	256	17,7 ± 0,8
<i>Enterobacter hormaechei</i>	BHKPC07	8	16	16,4 ± 0,3
<i>Enterobacter cloacae</i>	BHKPC28	8	16	23 ± 0,5
<i>Enterobacter hormaechei</i>	BHKPC43	32	64	16 ± 1
<i>Enterobacter hormaechei</i>	RPEC01	8	8	12,2 ± 0,1
<i>Escherichia coli</i>	BHKPC11	8	8	20,7
<i>Escherichia coli</i>	BHKPC13	8	16	22,5
<i>Escherichia coli</i>	BHKPC37	4	4	22,8
<i>Escherichia coli</i>	RPECLO01	4	4	7,5
<i>Providencia stuartii</i>	BHKPC23	128	16	0,43 ± 0,02
<i>Providencia stuartii</i>	BHKPC27	128	32	0,94 ± 0,5
<i>Providencia stuartii</i>	BHKPC29	64	16	0,73 ± 0,02
<i>Providencia stuartii</i>	BHKPC30	128	32	0,90 ± 0,08
<i>Providencia stuartii</i>	BHKPC31	64	16	1,27 ± 0,08
<i>Providencia stuartii</i>	BHKPC35	128	32	1,25 ± 0,07
<i>Providencia stuartii</i>	BHKPC41	64	16	0,93 ± 0,06

Fonte: Elaborada pela autora.

#### 4.1.9 Análise da transferência dos plasmídeos carreando *bla<sub>KPC</sub>*

A partir das análises dos genomas e, mais especificamente, dos plasmídeos de interesse deste estudo, foram selecionadas para os ensaios de conjugação, os isolados da espécie *K. pneumoniae* que abrigavam o plasmídeo IncQ1 carreando *bla<sub>KPC</sub>* e diferentes populações de plasmídeos. Como os plasmídeos IncQ1 carreando *bla<sub>KPC</sub>* foram classificados como mobilizáveis e não conjugativos, não seria possível tentar conjugá-lo a partir das linhagens que só possuem o mesmo.

Dessa forma foram selecionadas as linhagens: *K. pneumoniae* BHKPC03, BHKPC04, BHKPC08, BHKPC10, BHKPC18, BHKPC21, BHKPC47 e BHKPC50. Apesar de *K. pneumoniae* BHKPC44 possuir o plasmídeo IncQ1 e outros, nenhum destes foi classificado como conjugativo, logo, em teoria, não seria possível obter transconjugantes.

Foi obtido um transconjugante a partir do ensaio utilizando *K. pneumoniae* BHKPC10 como linhagem doadora e a taxa de conjugação obtida foi de  $1,49 \times 10^{-4}$ .

Em seguida, a fim de verificar qual ou quais plasmídeos conjugaram juntamente ao plasmídeo pBHKPC10\_3 linhagens doadoras, receptora e transconjugantes foram submetidas ao ensaio de S1 nuclease associado à PFGE.

A partir da análise do gel obtido, foi possível confirmar a transferência de um plasmídeo de cerca de 10 kpb e de outros dois plasmídeos que possuem cerca de 40-50 kpb. O plasmídeo pBHKPC10\_2 possui cerca de 50 kpb e é conjugativo, indicando que este possibilitou a transferência de pBHKPC10\_3 durante sua conjugação. Porém, os dados do sequenciamento do genoma da *K. pneumoniae* BHKPC10 mostraram a presença de apenas um plasmídeo de tamanho próximo a 40-50 kpb. O segundo plasmídeo de tamanho próximo a 40-50 kpb presente na *K. pneumoniae* BHKPC10 e na sua transconjugante pode indicar que há plasmídeos semelhantes em sequências que foram erroneamente agrupados juntos durante a montagem do genoma um plasmídeo maior.

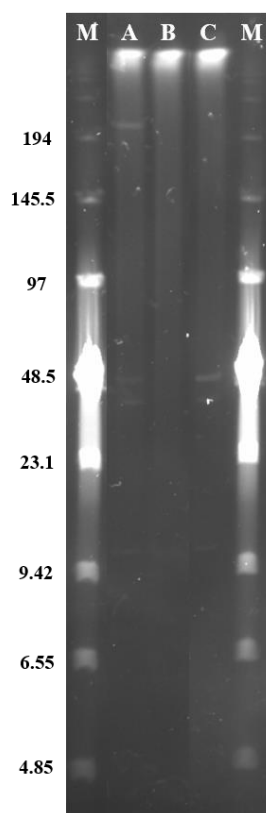


Figura 19 - Gel de S1 nuclease – PFGE das linhagens *K. pneumoniae* BHKPC10 (A), *E. coli* J53 (B) e do transconjugante *E. coli* J53\_pBHKPC10\_2\_3 (C). *Low Range PFG Marker* (New England Biolabs, EUA) (M) foi usado como marcador de peso molecular e foi aplicado em ambas extremidades do gel.

Fonte: Elaborada pela autora.



#### 4.1.10 Caracterização da linhagem transconjugante

Para caracterizar a linhagem transconjugante, foram analisados o perfil de crescimento da linhagem antes e após a conjugação, bem como os seus tempos de duplicação, os valores de CIM de imipenem e meropenem, e os números de cópias relativos do plasmídeo pBHKPC10\_3.

A Figura 20 traz as curvas de crescimento obtidas para a linhagem *E. coli* J53 antes e após conjugação é possível verificar que não há diferença na curva de crescimento da linhagem receptora e da transconjugante.

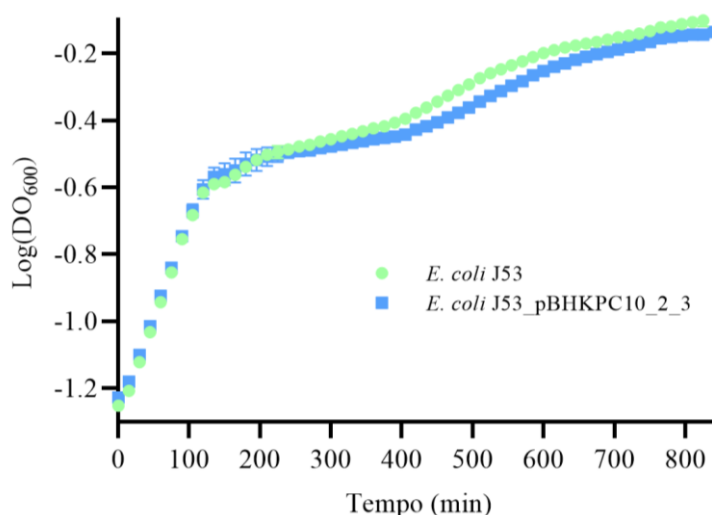


Figura 20 - Curvas de crescimento de *E. coli* J53 e linhagem transconjugante.  
Fonte: Elaborada pela autora.

A partir das curvas de crescimento, foram selecionadas regiões de crescimento exponencial para cálculos dos tempos de duplicação de cada linhagem. Foi realizada uma análise estatística – Teste T *Student*– para verificar se havia diferença significativa entre os valores de tempos de duplicação entre a linhagem receptora e suas transconjugante e foram considerados valores de  $p < 0,05$  para confirmar diferença significativa. Estes dados se encontram na Tabela 17.

Tabela 17 - Dados de tempos de duplicação e comparação de diferença estatística significativa entre linhagens receptoras e suas transconjugantes

Linhagem	Tempo de duplicação (min)	Diferença significativa ( $p < 0,05$ )
<i>E. coli</i> J53	117 ± 4	-
<i>E. coli</i> J53 pBHKPC10_2_3	121 ± 5	Não ( $p = 0,87$ )

Fonte: Elaborada pela autora.

Os dados de tempo de duplicação e o comportamento observado nas curvas de crescimento mostram que não houve alteração no *fitness* da linhagem *E. coli* J53 ao receber os plasmídeos descritos, indicando que a presença desses plasmídeos não gera gastos energéticos significativos para a sua persistência da bactéria (Tabela 17).

Os dados de CIM de imipenem e meropenem se mostraram diferentes entre as espécies, com valores ligeiramente mais altos para a *K. pneumoniae* BHKPC10 e relação a sua transconjugante *E. coli* J53\_pBHKPC10\_2\_3. Apesar da transconjugante apresenta valores de CIMs mais baixos, houve um aumento expressivo da CIM quando comparadas com *E. coli* J53 antes da conjugação. Além disso, os ensaios de determinação de NCP relativa mostraram que esse plasmídeo se apresenta em um número de cópias cerca de 70 vezes maior em *K. pneumoniae* BHKPC10 em relação à *E. coli* J53\_pBHKPC10\_2\_3 (Tabela 18).

Tabela 18 - Valores de CIM de imipenem e meropenem e do NCP do pBHKPC10\_3 nas linhagens doadora, receptora e transconjugante

	CIM <sub>Imipenem</sub> (mg/L)	CIM <sub>Meropenem</sub> (mg/L)	NCP pBHKPC10_3
<i>K. pneumoniae</i> BHKPC10	32	32	358 ± 5
<i>E. coli</i> J53	0,125	0,0625	-
J53_pBHKPC10_2_3	8	16	5,1 ± 0,2

Fonte: Elaborada pela autora.

#### 4.1.11 Descrição de linhagem carreando *bla<sub>KPC</sub>* e *mcr-9*

*E. cloacae* BHKPC28 pertence ao ST850 isolado em 2014 que, além do gene *bla<sub>KPC</sub>*, abriga o gene *mcr-9*, que codifica uma transferase de fosfoetanolamina responsável por modificar o lipídeo A do lipopolissacarídeo (LPS) conferindo resistência à polimixinas, drogas também consideradas de último recurso. Esta foi a única bactéria do estudo que abriga os genes *mcr-9* e *bla<sub>KPC</sub>*. Devido ao interesse clínico que essa linhagem traz, decidiu-se caracterizá-la separadamente nesse tópico.

Esse isolado possui valores de CIM de colistina e polimixina B de 16 mg/L e 8 mg/L, respectivamente, considerados resistentes segundo BrCAST. Além do gene *mcr-9*, *E. cloacae* BHKPC28 abriga 26 genes de resistência distribuídos no seu cromossomo e em quatro dos seus oito plasmídeos, sendo dois conjugativos, um mobilizável e um não conjugativo. Os oito plasmídeos possuem tamanhos que variam de 3,6 a 285 kpb e pertencem a seis grupos de incompatibilidade diferentes sendo que pBHKPC28\_6 e pBHKPC28\_7 não puderam ser tipados (Tabela 19)

Tabela 19 - Dados de localização dos genes de resistência e de caracterização das populações de plasmídeos presentes no isolado *E. cloacae* BHKPC28

Cromossomo/Plasmídeos	Contig	Classificação	Genes de resistência	Mobilização	Tamanho
cromossomo_BHKPC28	1	-	<i>fosA</i> , <i>bla<sub>CMH-3</sub></i>	-	5.025.881
pBHKPC28_1	2	IncHI2/IncHI2A	<i>mcr-9</i> , <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>aph(3'')-Ib</i> , <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA19</i> , <i>qnrA1</i> , <i>tet(A)</i> , <i>bla<sub>OXA-1</sub></i> , <i>bla<sub>CTX-M-15</sub></i> , <i>bla<sub>TEM-1B</sub></i> , <i>qacE</i> , <i>catB3</i>	Conjugativo	284.726
pBHKPC28_2	3	IncFIIY	-	Conjugativo	110.191
pBHKPC28_3	4	IncFII	-	Conjugativo	64.936
pBHKPC28_4	5	pBSSB1-family	<i>aadA1</i> , <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>aac(6')-Ib</i> , <i>bla<sub>OXA-9</sub></i> , <i>bla<sub>TEM-1A</sub></i>	Conjugativo	53.873
pBHKPC28_5	6	IncQ1	<i>aph(3')-Via</i> , <i>bla<sub>KPC-2</sub></i>	Mobilizável	14.620
pBHKPC28_6	8	NI	-	Mobilizável	5.560
pBHKPC28_7	9	NI	-	Mobilizável	3.869
pBHKPC28_8	10	IncN	<i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>aac(6')-Ib3</i> , <i>bla<sub>OXA-1</sub></i> , <i>catB3</i>	Não mobilizável	3.692

Fonte: Elaborada pela autora.

Em *E. cloacae* BHKPC28, o plasmídeo IncQ1 que abriga uma variação do NTE<sub>KPC-II</sub>d com 14.620 pb, cerca de 4 kpb maior que a maioria dos outros plasmídeos IncQ1 devido a uma inserção do transposon Tn5403 no gene *tnpR* do ambiente genético que abriga o *bla<sub>KPC</sub>* (Figura 21).

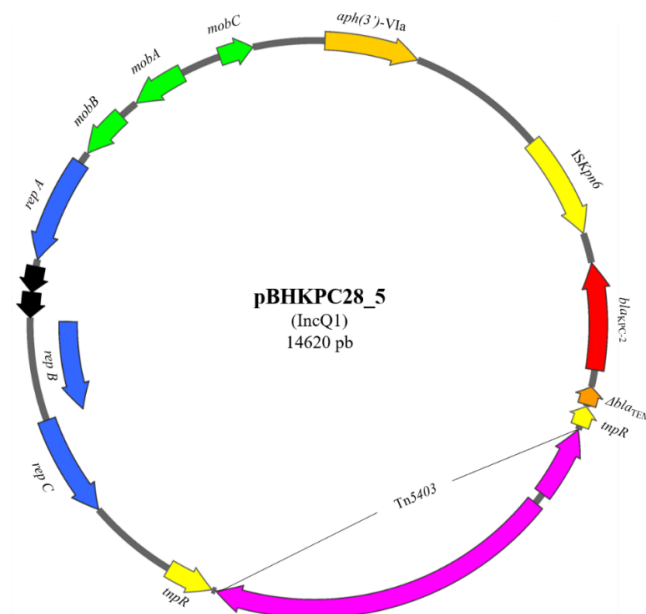


Figura 21 - Mapa representando o plasmídeo pBHKPC28\_5 carregando o gene *bla<sub>KPC</sub>*. O gene da *bla<sub>KPC</sub>* está representado em vermelho, o ambiente genético do gene está representado em amarelo, outros genes de resistência estão representados em laranja, iniciadores de replicação do plasmídeo estão representado em azul, genes envolvidos na mobilização do plasmídeo estão representados em verde e o transposon inserido na sequência está representado em rosa.

Fonte: Elaborada pela autora.

Essa alteração no ambiente genético não resultou em valores de CIM divergentes dos encontrados para outros isolados da mesma espécie que abrigavam o NTE<sub>KPC</sub>-IId íntegro. O valor de NCP relativo de pBHKPC28\_5 foi próximo aos valores encontrados para os plasmídeos IncQ1 abrigando *bla*<sub>KPC</sub> dos isolados de mesma espécie, indicando que a inserção do Tn5403 não alterou a replicação do plasmídeo (Tabela 20).

Tabela 20 - Valores de CIM de imipenem e meropenem e do NCP do pBHKPC10\_3 nas linhagens doadora, receptora e transconjugante

	CIM <sub>Imipenem</sub> (mg/L)	CIM <sub>Meropenem</sub> (mg/L)	NCP pBHKPC28_5
<i>E. cloacae</i> BHPKC28	8	16	23 ± 1

Fonte: Elaborada pela autora.

pBHKPC28\_1 é um plasmídeo IncHI2/IncHI2A, conjugativo, de cerca de 285 kpb que abriga o gene *mcr-9* e outros 12 genes de resistência: *aac(6')-Ib-cr*, *aph(3'')-Ib*, *sul1*, *sul2*, *dfrA19*, *qnrA1*, *tet(A)*, *bla*<sub>OXA-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>TEM-1B</sub>, *qacE* e *catB3*.

Neste plasmídeo o gene *mcr-9* se encontra em um ambiente genético contendo os genes *rcnR*, *rcnA*, *pcoE*, *pcoS*, *wbuC* além das duas IS (IS5 e IS26-like) que flanqueiam o gene (Figura 22).

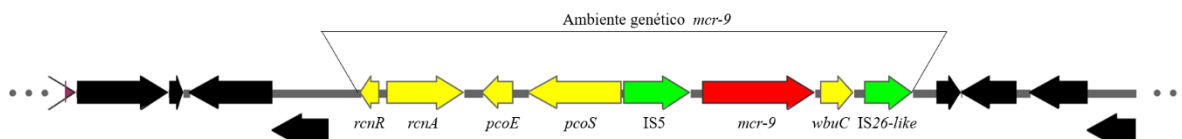


Figura 22 - Esquema do ambiente genético abrigando o gene *mcr-9* no plasmídeo pBHKPC28\_1. O gene *mcr-9* está representado em vermelho, o ambiente genético do gene está representado em amarelo, os genes das ISs estão representados em verde.

Fonte: Elaborada pela autora.

#### 4.2 Caracterização de plasmídeos carreando *bla*<sub>KPC-2</sub> e *bla*<sub>NDM-1</sub> de uma disseminação clonal de *K. pneumoniae* do ST11.

O objetivo inicial do projeto era analisar somente linhagens que abrigassem o gene *bla*<sub>KPC</sub> em NTE<sub>KPC</sub>, porém dentre as linhagens de *K. pneumoniae* isoladas no HRTN, foram identificadas quatro coprodutoras de KPC e NDM iniciando um possível surto. Devido à importância clínica desses isolados, mesmo abrigando o gene *bla*<sub>KPC</sub> no ambiente genético Tn4401, eles foram caracterizadas e são o foco da segunda parte desta Tese.<sup>141</sup>

#### 4.2.1 Disseminação de um clone de *K. pneumoniae* durante a pandemia de COVID-19

Em outubro de 2020, o HRTN detectou a primeira *K. pneumoniae* coprodutora de KPC e NDM, o que levou a uma investigação sequencial que permitiu a identificação de seis isolados coprodutores das carbapenemases. Os dois primeiros isolados, em ordem cronológica de isolamento, não puderam ser cultivados no LEMiMo, então apenas quatro permaneceram no estudo. Os quatro isolados remanescentes foram nomeados como BHKPC93, BHKPC104, BHKPC107a e BHKPC107b, sendo os dois últimos isolados do mesmo paciente em períodos diferentes. Todos pertencem a mesma espécie e foram isolados entre dezembro de 2020 e janeiro de 2021, período inserido no contexto da pandemia de COVID-19, sendo BHKPC93 proveniente de ponta de cateter, BHKPC104 de urina e BHKPC107a/BHKPC107b de tecido profundo.

O perfil de susceptibilidade dos isolados foi obtido através dos dados de antibiograma fornecidos pelo hospital, bem como pelos testes de sensibilidade aos antibióticos realizados neste estudo. É possível perceber que os quatro isolados são resistentes a múltiplos antibióticos e dentre todos os antibióticos testados, três dos quatro são sensíveis somente à amicacina (Tabela 21). Além disso, BHKPC107b era sensível à gentamicina também.

Tabela 21 - Dados gerais e perfil de susceptibilidade dos isolados coprodutores de KPC e NDM

	BHKPC93	BHKPC104	BHKPC107a	BHKPC107b
<b>Dados gerais dos isolados</b>				
Espécie	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>
Data de isolamento (DD/MM/AAAA)	11/12/2020	30/12/2020	01/01/2021	07/01/2021
Espécime clínico	Ponta de catéter	Urina	Tecido profundo	Tecido profundo
<b>Antibióticos testados (susceptibilidade/CIM)</b>				
Ácido Nalidíxico	-	R	-	-
Amicacina	S	S	S	S
Amoxicilina/Ácido Clavulânico	R	R	R	R
Ampicilina/Sulbactam	R	R	R	R
Cefepima	R	R	R	R
Ceftazidima	R	R	R	R

(continua)

(continuação)

Ceftriaxona	R	-	R	-	R	-	R	-
Cefuroxima	R	-	R	-	R	-	R	-
Axetilcefuroxima	R	-	R	-	R	-	R	-
Ciprofloxacina	R	-	R	-	R	-	R	-
Colistina	R	16 mg/L	R	16 mg/L	R	16 mg/L	R	16 mg/L
Ertapenem	R	-	R	-	R	-	R	-
Gentamicina	R	-	R	-	R	-	S	-
Imipenem	R	64 mg/L	R	128 mg/L	R	64 mg/L	R	64 mg/L
Meropenem	R	128 mg/L	R	256 mg/L	R	256 mg/L	R	256 mg/L
Nitrofurantoina	-	-	R	-	-	-	-	-
Norfloxacino	-	-	R	-	-	-	-	-
Piperacilina/Tazobactam	R	-	R	-	R	-	R	-
Polimixina B	R	8 mg/L	R	8 mg/L	R	8 mg/L	R	8 mg/L
Tigeciclina	-	1 mg/L	-	2 mg/L	-	1 mg/L	-	0.5 mg/L
Trimethoprim/Sulfamethoxazol	R	-	R	-	R	-	R	-

-: não se aplica.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os quatro isolados tiveram seus DNAs extraídos e submetidos à confirmação da presença dos genes *bla<sub>KPC</sub>* e *bla<sub>NDM</sub>* por PCR, obtendo resultado positivo para todos os casos. Além disso, como parte da triagem feita com as amostras bacterianas iniciais desse estudo, foi investigado o ambiente genético no qual o gene *bla<sub>KPC</sub>* está inserido e o *Tn4401* foi identificado nos quatro isolados.

Em seguida, foi realizada a macrorestrição do DNA seguida de eletroforese em gel de campo pulsado e foi verificada a existência de um único pulsotipo, mostrando que os isolados de *K. pneumoniae* coprodutores de KPC e NDM pertencem ao mesmo clone, ou seja, ocorreu uma disseminação clonal no HRTN durante a pandemia de COVID-19. Além disso, BHKPC93 apresentou duas diferenças no seu perfil de bandas do PFGE: uma banda adicional e a falta de outra, o que resultou em 95% de similaridade genômica em relação a BHKPC104, BHKPC107a e BHKPC107b, classificando-o como subtipo intimamente relacionado (Figura 23).

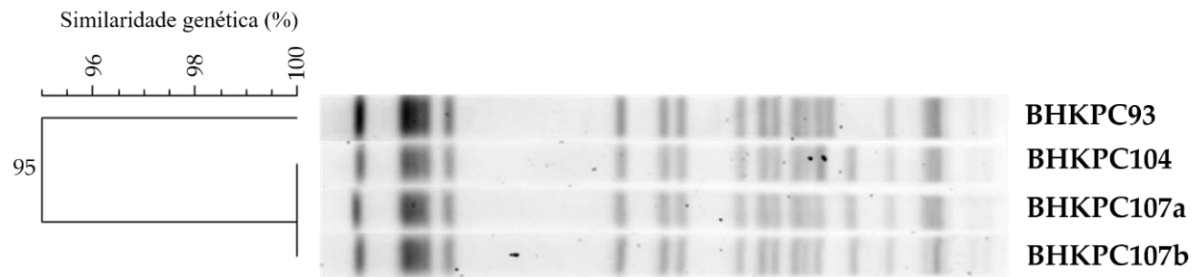


Figura 23 - Alta similaridade genômica dos quatro isolados coprodutores de KPC e NDM observada após digestão com XbaI (Thermo Scientific), eletroforese em gel de campo pulsado e análises usando o *software* *Bionumerics* v.7.1.

Fonte: Elaborada pela autora.

Apesar da possibilidade das linhagens pertencentes a um mesmo clone apresentarem populações de plasmídeos diferentes, foram selecionadas somente BHKPC93 e BHKPC104 como isolados representantes dos dois tipos clonais detectados. Assim, ambos foram submetidos ao sequenciamento de genoma completo pelas tecnologias Illumina e Nanopore.

A cobertura média do sequenciamento *Nanopore* para BHKPC93 e BHKPC104 foi 19x e as do sequenciamento *Illumina* foram 134x e 106x, respectivamente.

A montagem do genoma híbrido com os dados dos dois sequenciamentos dos isolados BHKPC93 e BHKPC104 resultou em uma sequência cromossômica fechada de 5.749.747 pb and 5.742.965 pb, respectivamente, e seis sequências plasmidiais completas, com tamanhos entre 4,5 kpb e 193 kpb. Os dois genomas compartilham 100% de identidade entre si com 100/99% de cobertura, indicando alta similaridade genética entre os isolados (Figura 24).

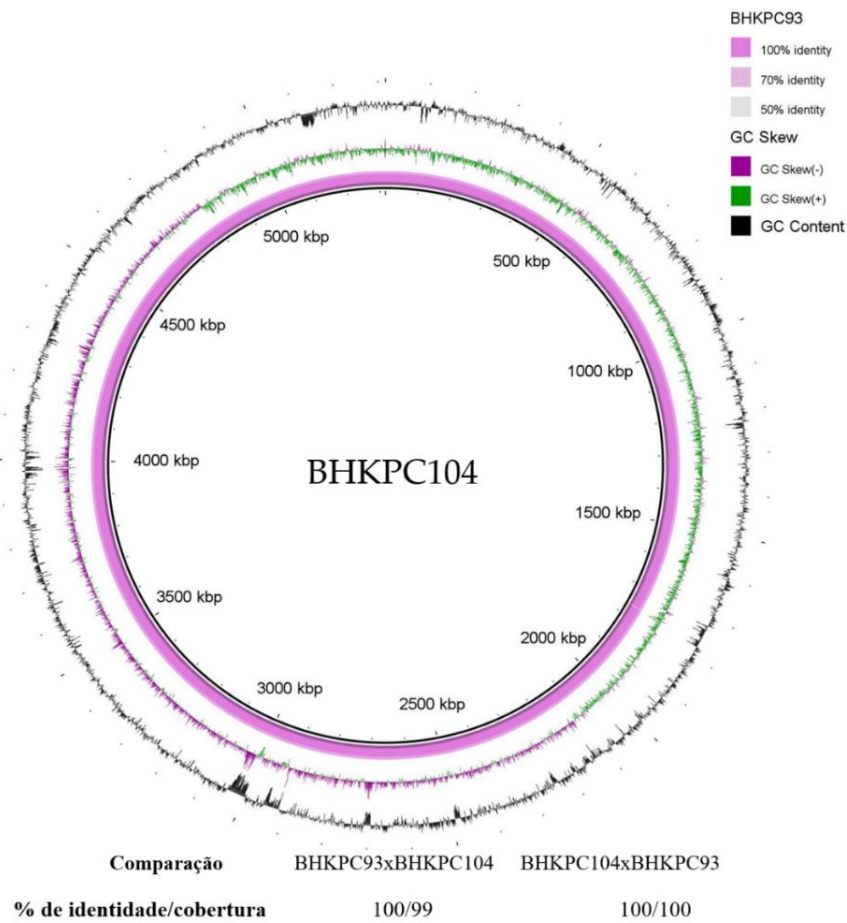


Figura 24 - Esquema da comparação cromossômica utilizando BHKPC104 como referência e comparando BHKPC93 com a referência.

Fonte: elaborada pela autora.

Também foi analisada a similaridade entre os isolados BHKPC93 e BHKPC104 baseado no conteúdo de genes. Foi detectado que ambos isolados compartilham 5425 genes, enquanto somente 15 e 11 genes foram exclusivamente encontrados em BHKPC93 e BHKPC104, respectivamente, o que resultou em uma Distância de Jaccard de 0,0046 (Tabela 22). Além disso, apenas 13 SNPs foram encontradas entre as frações de genoma que compartilham, o que confirma, então, que os isolados em questão são altamente relacionados, como indicou o resultado da análise de similaridade por PFGE.



Tabela 22 - Descrição dos 15 e 11 genes encontrados exclusivamente em BHKPC93 e BHKPC104

Proteínas de genes únicos	Presente em	Cromossomo/plasmídeo	Contig / Coordenada / Fita
IS6-like element IS26 family transposase	BHKPC93	Plasmídeo pBHKPC93_4	5 / 51764 – 52468 / -
IS6-like element IS26 family transposase	BHKPC93	Plasmídeo pBHKPC93_4	5 / 48769 – 49473 / +
IS6-like element IS26 family transposase	BHKPC93	Plasmídeo pBHKPC93_6	3 / 83846 – 84550 / +
Tn3-like element Tn5403 family transposase	BHKPC93	Plasmídeo pBHKPC93_6	3 / 81730 – 83787 / -
IS3 -like element ISKpn18 family transposase	BHKPC93	Plasmídeo pBHKPC93_5	4 / 89237 – 90115 / +
Cobalamin biosynthesis protein CbiX	BHKPC93	Plasmídeo pBHKPC93_3	6 / 31925 – 32205 / +
Cobalamin biosynthesis protein CbiX	BHKPC93	Plasmídeo pBHKPC93_3	6 / 32630 - 32926 / +
ANT(3")-Ia family aminoglycoside nucleotidyltransferase AadA2	BHKPC93	Plasmídeo pBHKPC93_6	3 / 79338 – 80117 / -
quaternary ammonium compound efflux SMR transporter QacE delta 1	BHKPC93	Plasmídeo pBHKPC93_6	3 / 78827 – 79174 / -
sulfonamide-resistant dihydropteroate synthase Sul1	BHKPC93	Plasmídeo pBHKPC93_6	3 / 77994 – 78833 / -
Proteína hipotética	BHKPC93	Plasmídeo pBHKPC93_3	6 / 31380 – 31712 / +
Proteína hipotética	BHKPC93	Plasmídeo pBHKPC93_3	6 / 32274 – 32474 / +
Proteína hipotética	BHKPC93	Plasmídeo pBHKPC93_3	6 / 32959 – 33066 / +
Proteína hipotética	BHKPC93	Plasmídeo pBHKPC93_6	3 / 77594 – 77866 / -
MFS-type transporter	BHKPC93	Cromossomo	1 / 1497284 – 1498471 / -
IS6-like element IS26 family transposase	BHKPC104	Plasmídeo pBHKPC104_6	2 / 164221 – 164826 / +
Anti-restriction protein ArdA	BHKPC104	Plasmídeo pBHKPC104_3	5 / 36942 – 37451 / +
Anti-restriction protein ArdA	BHKPC104	Plasmídeo pBHKPC104_3	5 / 35600 – 36109 / +
TrbG/VirB9 family P-type conjugative transfer protein	BHKPC104	Plasmídeo pBHKPC104_5	3 / 27981 – 28421 / +
aminoglycoside O-phosphotransferase APH(3')-Ia	BHKPC104	Plasmídeo pBHKPC104_6	2 / 165016 – 165831 / -
IS5-like element ISKpn13 family transposase	BHKPC104	Cromossomo	1 / 2993526 – 2994460 / +
IS5-like element ISKpn26 family transposase	BHKPC104	Cromossomo	1 / 2680867 – 2681847 / -
Carbohidrato porina	BHKPC104	Cromossomo	1 / 4650295 – 4651677 / -
Carbohidrato porina	BHKPC104	Cromossomo	1 / 50221 – 51600 / -
Transportador MFS	BHKPC104	Cromossomo	1 / 2710758 – 2710979 / +
Proteína hipotética	BHKPC104	Cromossomo	1 / 4692771 – 4692992 / +

Fonte: Elaborada pela autora.

Os isolados pertencem ao ST11 e abrigam os genes *bla*<sub>KPC-2</sub> e *bla*<sub>NDM-1</sub> além de outros 18 genes de resistência. Foram encontrados genes de resistência para aminoglicosídeos (*aac(6')-Ib-cr*, *aac(3)-IIa*, *aph(3')-Ia* and *aadA2*), fosfomicina (*fosA*), aminociclitol (*aadA2*), quinolonas (*aac(6')-Ib-cr*, *oqxA*, *oqxB*, *qnrS1*), antagonistas da via do folato como trimetoprima-sulfametoxazol (*sul1*, *sul2*, *dfrA12*, *oqxA*, *oqxB*), tetraciclina (*tet(A)*), β-lactâmicos (*bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>KPC-2</sub>, *bla*<sub>SHV-182</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>LAP-2</sub>), compostos de amônia quaternária (*oqxA*, *oqxB*, *qacE*), anfenicol (*catB3*, *oqxA*, *oqxB*) e macrolídeo (*mph(A)*) (Tabela 23). Os genes *fosA*, *oqxA*, *oqxB*, e *bla*<sub>SHV-182</sub> estavam localizados no cromossomo e os genes remanescentes estavam distribuídos em quatro plasmídeos (Figura 25).

Tabela 23 - Genes de resistência encontrados em BHKPC93 e BHKPC104

Gene de resistência	Identidade	Comprimento do alinhamento/ Comprimento do gene	Posição na referência	Fenótipo	Número de acesso
<i>aac(3)-IIa</i>	100.0	861/861	1..861	gentamicina, tobramicina,	<a href="#">CP023555</a>
<i>aac(6')-Ib-cr</i>	100.0	600/600	1..600	ciprofloxacina	<a href="#">DQ303918</a>
<i>aph(3')-Ia</i>	100.0	816/816	1..816	neomicina, kanamicina, lividomicina, paromomicina, ribostamicina	<a href="#">V00359</a>
<i>aadA2</i>	100.0	792/792	1..792	spectinomicina, streptomomicina	<a href="#">JQ364967</a>
<i>fosA</i>	99.27	412/420	1..412	fosfomicina	<a href="#">ACWO01000079</a>
<i>sul1</i>	100.0	840/840	1..840	sulfametoxazol	<a href="#">U12338</a>
<i>dfrA12</i>	100.0	498/498	1..498	trimetoprima	<a href="#">AM040708</a>
<i>oqxB</i>	100.0	3153/3153	1..3153	cloranfenicol, cloreto de benzalcônio, ccloreto de cetilpiridínio, ácido nalidíxico, ciprofloxacina, trimetoprima	<a href="#">EU370913</a>
<i>oqxA</i>	100.0	1176/1176	1..1176	cloranfenicol, cloreto de benzalcônio, ccloreto de cetilpiridínio, ácido nalidíxico, ciprofloxacina, trimetoprima	<a href="#">EU370913</a>
<i>sul2</i>	100.0	816/816	1..816	sulfametoxazol	<a href="#">AY034138</a>
<i>qnrS1</i>	100.0	657/657	1..657	ciprofloxacina	<a href="#">AB187515</a>
<i>tet(A)</i>	99.92	1200/1200	1..1200	doxiciclina, tetraciclina	<a href="#">AJ517790</a>

(continua)

(continuação)

<i>bla<sub>SHV-182</sub></i>	99,88	861/861	1..861	$\beta$ -lactâmico desconhecido amoxicilina, amoxicilina+ácido clavulânico, ampicilina, ampicilina+ácido clavulânico, aztreonam, cefepima, cefotaxima, cefoxitina, ceftazidima, ertapenem,	<a href="#">KP050489</a>
<i>bla<sub>KPC-2</sub></i>	100.0	882/882	1..882	imipenem, meropenem, piperacilina, piperacilina+tazobactam, ticarcilina, ticarcilina+ácido clavulânico amoxicilina, amoxicilina+ácido clavulânico, ampicilina, ampicilina+ácido clavulânico, cefepima, cefixima, cefotaxima,	<a href="#">AY034847</a>
<i>bla<sub>NDM-1</sub></i>	100.0	813/813	1..813	cefoxitina, ceftazidima, ertapenem, imipenem, meropenem, piperacilina, piperacilina+tazobactam, temocilina	<a href="#">FN396876</a>
<i>bla<sub>LAP-2</sub></i>	100.0	858/858	1..858	amoxicilina, ampicilina, cefalotina, piperacilina, ticarcilina	<a href="#">EU159120</a>
<i>bla<sub>OXA-1</sub></i>	100.0	831/831	1..831	amoxicilina, amoxicilina+ácido clavulânico ampicilina, ampicilina+ácido clavulânico, cefepima, piperacilina, piperacilina+tazobactam amoxicilina, ampicilina,	<a href="#">HQ170510</a>
<i>bla<sub>CTX-M-15</sub></i>	100.0	876/876	1..876	aztreonam, cefepima, cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, piperacilina, ticarcilina	<a href="#">AY044436</a>
<i>mph(A)</i>	100.0	906/906	1..906	eritromicina, azitromicina, spiramicina, telitromicina	<a href="#">D16251</a>
<i>qacE</i>	100.0	282/333	1..282	cloreto de benzalcônio, brometo de etídio, clorexidina, cloreto de cetilpiridínio	<a href="#">X68232</a>
<i>catB3</i>	100.0	442/633	1..442	cloranfenicol	<a href="#">U13880</a>

Fonte: Elaborada pela autora.

Além disso, ambos isolados apresentaram mutações conhecidas nos genes *gyrA* e *parC*, levando às substituições de aminoácidos S83I e S80I, respectivamente, previamente demonstrado resultarem em resistência à ciprofloxacino.<sup>142-143</sup>

Em seguida, foi explorado os possíveis mecanismos de resistência a polimixinas em BHKPC93 e BHKPC104. Os dois isolados não continham sequências da família de genes *mcr* que codificam determinantes adquiridos de resistência à colistina. Em adição às análises, foram comparadas as sequências dos genes *mgrB*, *phoP*, *phoQ*, *pmrA*, *pmrB*, *pmrC*, *pmrK*, *pmrR*, *qceB*, *qceC*, *crrA*, e *crrB*, previamente descritos como envolvidos na resistência a polimixinas, de BHKPC93 e BHKPC104 com a linhagem de *K. pneumoniae* AMKP36, sensível a polimixinas e pertencente ao ST11,<sup>138</sup> número de acesso do genoma: SAMN13160271. Essa comparação não revelou mutações específicas nos dois isolados BHKPC93 e BHKPC104, resistentes a polimixinas.

BHKPC93 e BHKPC104 também carregam mutações nos genes de porinas *ompK36* e *ompK37*, que potencialmente contribuem para resistência a cefalosporinas e carbapenêmicos e podem estar envolvidas na resistência a polimixinas.<sup>144-145</sup>

Para análise da virulência das linhagens coprodutoras de KPC e NDM foi realizado um teste de *string* e o mesmo permitiu classificar os quatro isolados como mucóides. Além disso, os dados dos genomas sequenciados dos isolados BHKPC93 e BHKPC104 mostrou que ambos possuem sete fatores de virulência envolvidos no estresse térmico/resistência ao calor (*clpK1*), adesão a superfícies (*fimH* e *mrkA*), aquisição de ferro – genes sideróforos (*fyuA*, *irp2* e *iutA*), e resistência sérica (*traT*).

#### **4.2.2 Os isolados de *K. pneumoniae* possuem 16 genes de resistência distribuídos em quatro dos seus seis plasmídeos.**

O sequenciamento completo do genoma de BHKPC93 e BHKPC104 indicou que esses isolados abrigam seis plasmídeos com tamanhos entre 4510 pb e 192068 pb, que são muito similares entre as duas linhagens (Figura 25).

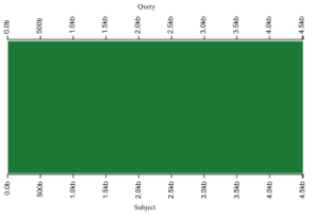
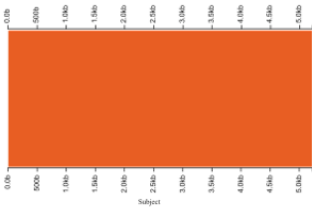
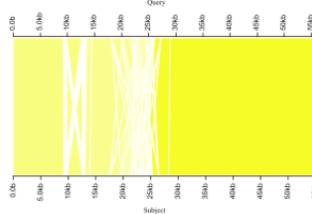
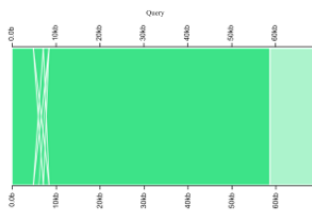
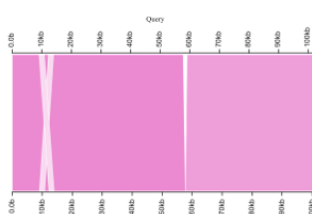
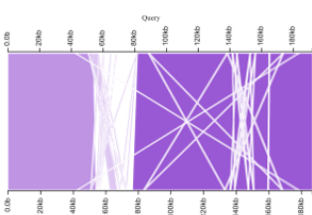
Plasmídeo	Alinhamentos	Comparação % identidade/cobertura	Características*
pBHKPC93_1 4510 pb		BHKPC93xBHKPC104 100/100	Col440I Sem GR Não mobilizável
pBHKPC104_1 4510 pb		BHKPC104xBHKPC93 100/100	RelE/HigA
pBHKPC93_2 5,225 pb		BHKPC93xBHKPC104 99.76/100	N.T. Sem GR Mobilizável
pBHKPC104_2 5216 pb		BHKPC104xBHKPC93 99.76/100	Sem T/AT
pBHKPC93_3 56,154 bp		BHKPC93xBHKPC104 100/99.98	IncN <i>bla<sub>KPC-2</sub></i> Conjugativo
pBHKPC104_3 55,431 bp		BHKPC104xBHKPC93 99.98/98	MNT-HEPN
pBHKPC93_4 69,353 bp		BHKPC93xBHKPC104 99.99/100	IncA/C <i>aac(6')-Ib-cr, qnrS1,</i> <i>catB3, bla<sub>OXA-11</sub>, bla<sub>LAP-2</sub></i>
pBHKPC104_4 69,245 bp		BHKPC104xBHKPC93 99.99/100	Conjugativo RelE-XRE
pBHKPC93_5 101,543 bp		BHKPC93xBHKPC104 100/98	IncC <i>bla<sub>NDM-1</sub>, sul1, sul2,</i> <i>dfrA12, aadA2, qacE</i>
pBHKPC104_5 102,068 bp		BHKPC104xBHKPC93 100/100	Conjugativo RelE-XRE
pBHKPC93_6 192,068 pb		BHKPC93xBHKPC104 100/99	IncFIB(K)/IncFII(K) <i>aac(3)-IIa, mph(A), tet(A),</i> <i>bla<sub>CTX-M-15</sub>, sul1, qacE,</i>
pBHKPC104_6 186,721 pb		BHKPC104xBHKPC93 100/98	<i>aadA2, dfrA12, aph(3')-Ia**</i> Conjugativo GNAT-RHH, RelE-HigA, HigB-HigA

Figura 25 - Informações gerais e comparação entre os plasmídeos de BHKPC93 e BHKPC104. \*Características observadas: grupo de incompatibilidade de plasmídeos, genes de resistência, capacidade de conjugação, Sistema toxina/antitoxina. Sem GR., sem gene de resistência. N.T., plasmídeo não tipado. Sem T/AT, sem Sistema toxina/antitoxina detectado. \*\*gene de resistência presente somente em BHKPC104.

Fonte: Elaborada pela autora.

pBHKPC93\_1 e pBHKPC104\_1 são plasmídeos 100% idênticos, com 4.510 nucleotídeos, do tipo Col440I que foram preditos como não mobilizáveis. Os plasmídeos abrigam um sistema toxina/antitoxina RelE-like/HigA (Figura25).

pBHKPC93\_2 e pBHKPC104\_2 são plasmídeos não auto-conjugativos, mas mobilizáveis, que compartilham 99,76% de identidade. Seus grupos de incompatibilidade não foram identificados. Além dos genes do sistema de mobilização, esses plasmídeos abrigam genes que codificam para uma DNA metiltransferase, uma proteína hipotética e uma proteína de iniciação de replicação (Figura25).

pBHKPC93\_3 e pBHKPC104\_3 são plasmídeos IncN de 56.154 nt e 55.431 nt, respectivamente, que carregam *bla*<sub>KPC</sub> e compartilham 99,98% de identidade (Figura25).

pBHKPC93\_3 é maior que pBHKPC104\_3 devido a uma região duplicada composta por genes que codificam duas proteínas hipotéticas e o gene *cbiX* que codifica para uma proteína de biossíntese de cobalamina. Em contraste, pBHKPC93\_3 não possuía o gene *adrA*, que codifica uma proteína anti-restrição, e estava presente em pBHKPC104\_3. Esses plasmídeos carregam genes codificantes para relaxases, e proteínas do T4CP e T4SS, classificando-os como plasmídeos conjugativos. O gene *bla*<sub>KPC</sub> está localizado no transposon canônico, na isoforma Tn4401b, que foi inserido em um gene codificante uma proteína da família das fosfolipases D em ambos os plasmídeos (Figuras 26 e 27).

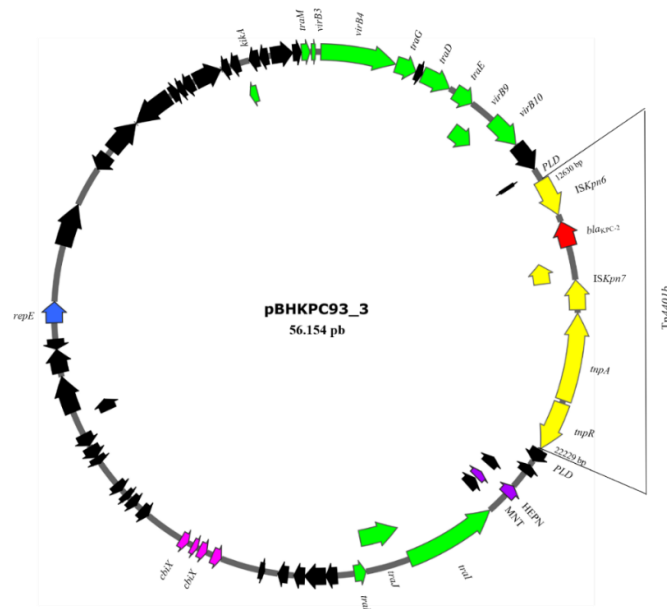


Figura 26 - Esquema do plasmídeo pBHKPC93\_3. O gene da carbapenemase está representado em vermelho, o ambiente genético do gene *bla*<sub>KPC</sub> está representado em amarelo, iniciador de replicação do plasmídeo está representado em azul. Genes do sistema T/A estão representados em roxo, genes envolvidos na conjugação do plasmídeo estão representados em verde e os genes únicos presentes somente em BHKPC93 estão representados em rosa.

Fonte: Elaborada pela autora.

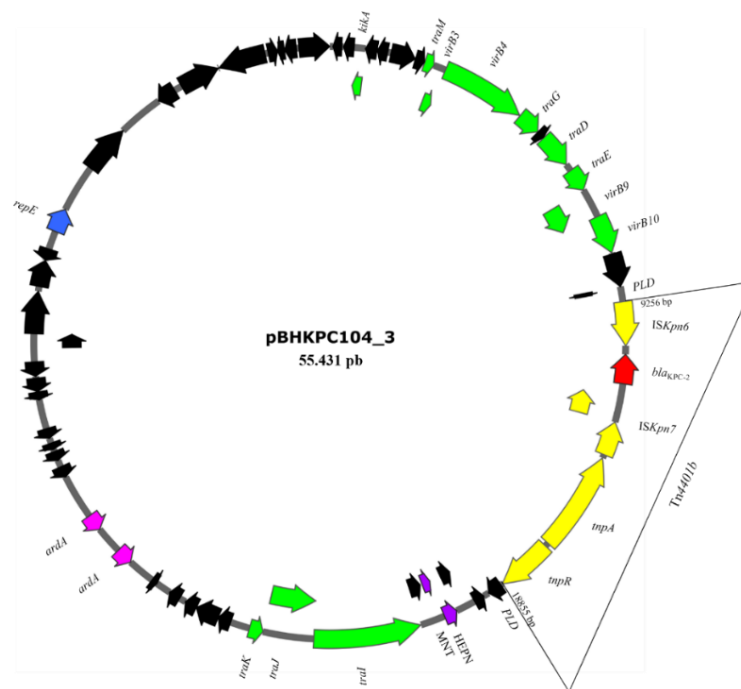


Figura 27 - Esquema do plasmídeo pBHKPC104\_3. O gene da carbapenemase está representado em vermelho, o ambiente genético do gene *bla<sub>KPC</sub>* está representado em amarelo, iniciador de replicação do plasmídeo está representado em azul, *chemE*. Genes do sistema T/A estão representados em roxo, genes envolvidos na conjugação do plasmídeo estão representados em verde e os genes únicos presentes somente em BHKPC104 estão representados em rosa.

Fonte: Elaborada pela autora

pBHKPC93\_4 e pBHKPC104\_4 são plasmídeos IncA/C conjugativos de 69.353 nt e 69.245 nt, respectivamente, carregando cinco genes de resistência e o mesmo sistema toxina/antitoxina que pBHKPC93\_5 e pBHKPC104\_5.

pBHKPC93\_5 e pBHKPC104\_5 são plasmídeos IncC abrigando *bla<sub>NDM</sub>* com 102.068 nt e 101.543 nt, respectivamente. Além de *bla<sub>NDM</sub>*, esses plasmídeos carregam cinco outros genes de resistência: *sul1*, *sul2*, *dfrA12*, *aadA2* e *qacE*. Apesar do gene da relaxase não ter sido identificado utilizando o *software Plascad*, foi usado a base de dados Pfam e foi encontrado um gene anotado com proteína hipotética que se equipara ao gene codificante para a proteína MobI. Também foram encontrados genes codificantes para proteínas envolvidas na transferência por conjugação e baseado na presença desses genes, os plasmídeos em questão foram classificados como plasmídeos conjugativos. Os plasmídeos compartilham 100% de identidade, mas 98% de cobertura devido à ausência de um gene codificante para *ISKpn18* em pBHKPC104\_5. Um  $\Delta$ Tn125-4 abriga o gene *bla<sub>NDM</sub>* com o gene de resistência a bleomicina. (Figuras 28 e 29).

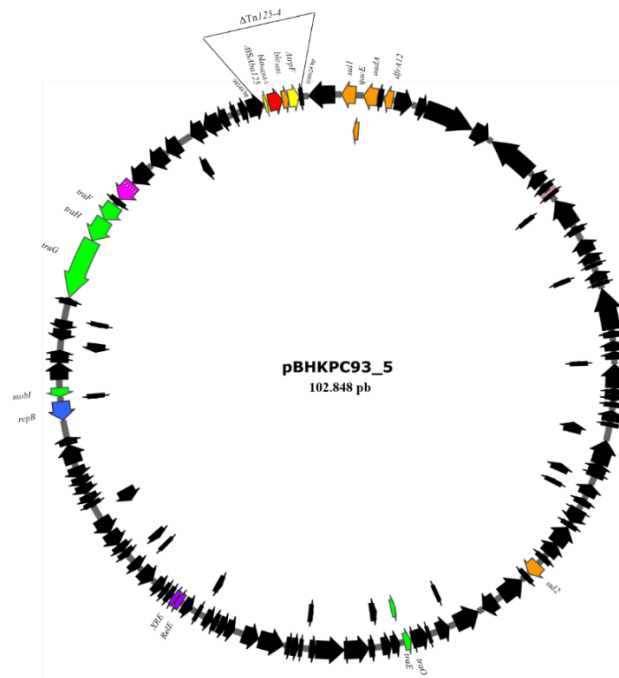


Figura 28 - Esquema do plasmídeo pBHKPC93\_5. O gene da carbapenemase está representado em vermelho, o ambiente genético do gene *bla*<sub>NDM</sub> está representado em amarelo, outros genes de resistência estão representados em laranja, iniciador de replicação do plasmídeo está representado em azul. Genes do sistema T/A estão representados em roxo, genes envolvidos na conjugação do plasmídeo estão representados em verde e os genes únicos presentes somente em BHKPC93 estão representados em rosa.

Fonte: Elaborada pela autora.

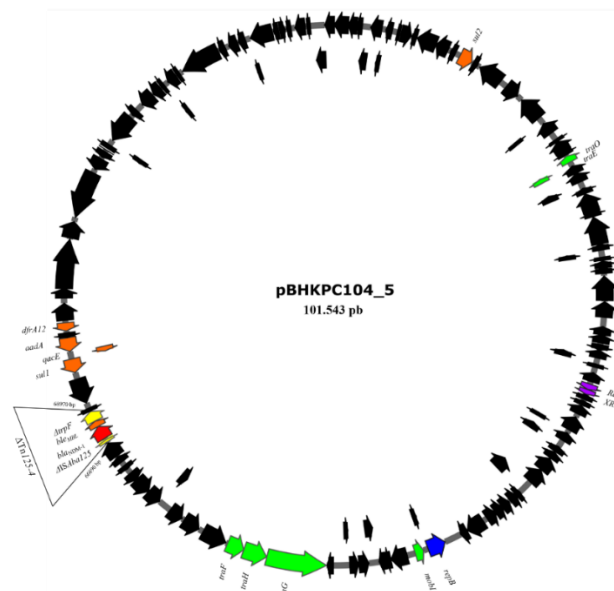


Figura 29 - Esquema do plasmídeo pBHKPC104\_5. O gene da carbapenemase está representado em vermelho, o ambiente genético do gene *bla*<sub>NDM</sub> está representado em amarelo, outros genes de resistência estão representados em laranja, iniciador de replicação do plasmídeo está representado em azul. Genes do sistema T/A estão representados em verde e os genes envolvidos na conjugação do plasmídeo estão representados em roxo e os genes únicos presentes somente em BHKPC104 estão representados em rosa.

Fonte: Elaborada pela autora,



Os maiores plasmídeos, que abrigam oito genes de resistência com sistema de conjugação completo, são pBHKPC93\_6 e pBHKPC104\_6, com 1000% de identidade e 99/98% de cobertura. pBHKPC104\_6 possui o gene *aph(3')-Ia* em adição a falta do gene codificante para o elemento tipo Tn3 Tn5403, presente em pBHKPC93\_6.

#### 4.2.3 Uma busca retrospectiva por plasmídeos *bla<sub>KPC</sub>*

Algumas das bactérias foram previamente sequenciadas e seus genomas foram depositados no *GenBank*. Entre essas, foi identificado um isolado de *K. pneumoniae* denominado BHKPC49 (Número de acesso SAMN32643894) que continha um plasmídeo IncN carreando *bla<sub>KPC</sub>* que já estava circulando em 2015. BHKPC49 pertence ao ST14 e compartilha cinco genes de virulência (*fimH*, *mrkA*, *fyuA*, *irp2* e *iutA*), com as linhagens BHKPC93 e BHKPC104, em adição aos genes *ccl* e *nlpI*.

BHKPC49 abriga um plasmídeo IncN/IncR de 134 kpb carreando *bla<sub>KPC</sub>* em Tn4401 e outro plasmídeo ColRNAI de 9 kpb. O plasmídeo do *bla<sub>KPC</sub>* de BHKPC49 contém a sequência completa dos plasmídeos IncN pBHKPC104\_3 e pBHKPC93\_3 e uma região IncR abrigando outros 13 genes de resistência: *aph(3'')-Ib*, *aph(6)-Id*, *aac(3)-IIa*, *aac(6')-Ib-cr*, *qnrS1*, *dfrA1*, *sul1*, *tet(A)*, *bla<sub>OXA-1</sub>*, *bla<sub>TEM-1B</sub>*, *bla<sub>CTX-M-15</sub>*, *qacE*, *catB3*. O plasmídeo IncN/IncR de BHKPC49 compartilha o mesmo sistema toxina/antitoxina (MNT-like/HEPN-like) que pBHKPC104\_3 e pBHKPC93\_3 e possui outros dois sistemas toxina/antitoxina (PIN-like/AbrB-like and Rel-like/Xre-like). O plasmídeo abrigando o gene *bla<sub>KPC</sub>* circulando no hospital em 2015 pode ter perdido genes com o tempo.

pBHKPC93\_3 e pBHKPC104\_3 também possuem alta similaridade (99,96% de identidade e 100% de cobertura) com plasmídeos IncN-pST15, que têm circulado em diferentes hospedeiros.<sup>146</sup> Esses plasmídeos também foram comparados com pIncN\_C1-94\_KPC da Colômbia<sup>147</sup>, classificado como parte de um grupo de plasmídeos “promíscuos” do tipo IncN que abrigam o gene *bla<sub>KPC-2</sub>*, e essas análises mostraram 97,7% de identidade e 81% de cobertura com pBHKPC993\_3 e 99,24% de identidade e 81% de cobertura com pBHKPC104\_3 (Figura 30).

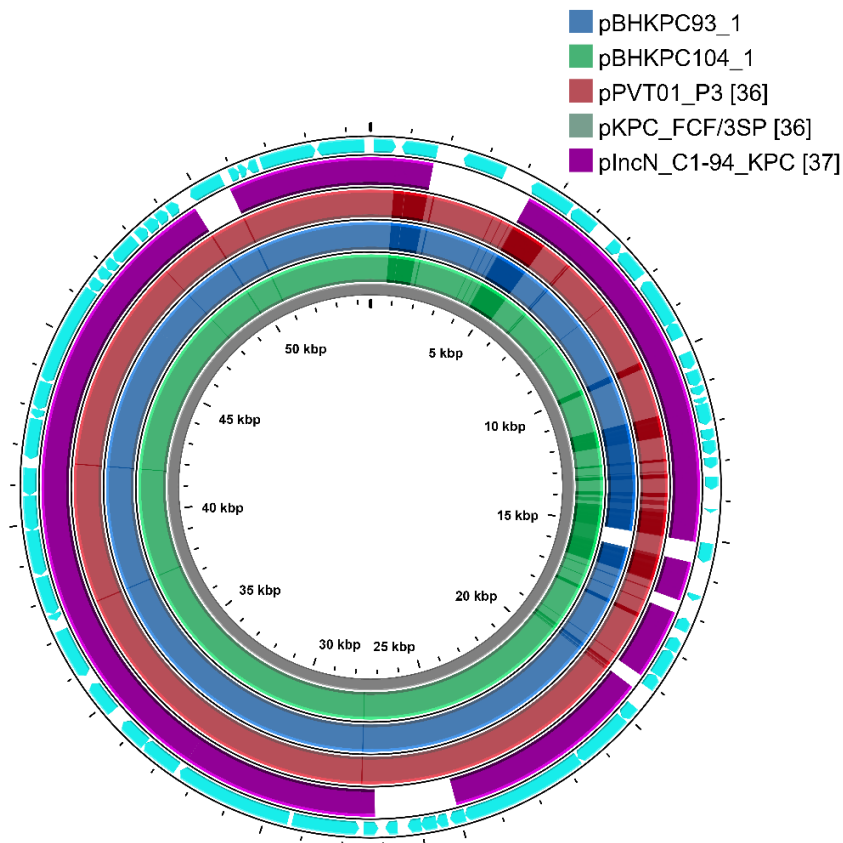


Figura 30 - Esquema da comparação entre pBHKPC93\_3 e pBHKPC104\_3 com outros plasmídeos IncN abrigando *bla<sub>KPC</sub>* já descritos.

Fonte: Elaborada pela autora.

#### 4.2.4 O impacto da presença do plasmídeo carreando *bla<sub>KPC</sub>* em *E. coli* J53

Os ensaios de conjugação *in vitro* utilizando as linhagens BHKPC93 e BHKPC104 como doadoras e *E. coli* J53 como receptora resultou na transferência somente dos plasmídeos pBHKPC93\_3 e pBHKPC104\_3 com uma taxa de conjugação de aproximadamente  $2 \times 10^{-5}$  transconjugantes/receptoras (Tabela 24).

Os dados de S1-nuclease/PFGE confirmaram essa conjugação já que somente um fragmento de ~50 kpb estava presente nos transconjugantes de *E. coli* J53 originários das doadoras BHKPC93 e BHKPC104 (Figura 31).

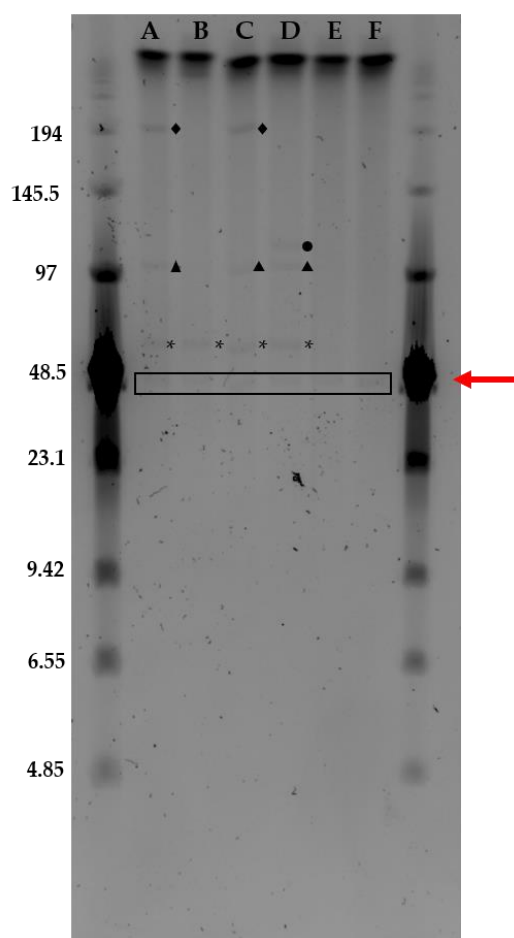


Figura 31 - Gel de S1 nuclease-PFGE dos isolados BHKPC93 (A), BHKPC104 (B), BHKPC107a (C) e BHKPC107b (D), and the transconjugants J53\_pBHKPC93\_3 (E) and J53\_pBHKPC104\_3 (F). A seta vermelha indica as bandas correspondentes ao plasmídeo do *bla<sub>KPC</sub>*. Losango, círculo, triângulos, asteriscos e o retângulo destacam as bandas dos plasmídeos. *Low Range PFG Marker* (New England Biolabs, EUA) foi usado como marcador de peso molecular.

Fonte: Elaborada pela autora.

Apesar na não-identificação de alguns plasmídeos utilizando essa técnica, a presença dos seis plasmídeos foi bem evidente no genoma híbrido, considerado um padrão outro nesse caso, de BHKPC93 e BHKPC104 (Figura 31).

Os tempos de duplicação similares de *E. coli* J53 e seus transconjugantes indicam que a aquisição do plasmídeo não parece afetar o *fitness* de *E. coli* J53 na ausência de antibióticos (Tabela 24, Figura 32) sem diferença estatisticamente significativa entre *E. coli* J53 e os transconjugantes *E. coli* J53 pBHKPC93\_3 ( $p = 0,9790$ ) e *E. coli* J53 pBHKPC104\_3 ( $p = 0,9494$ ).

A aquisição de pBHKPC93\_3 e pBHKPC104\_3 carreando o gene *bla<sub>KPC</sub>* pelas *E. coli* J53 transconjugantes resultou em um aumento substancial na CIM de meropenem e imipenem, embora, de acordo com os critérios do BrCAST, esses transconjugantes ainda serem sensíveis (Tabela 24).

O número de cópias de plasmídeos foi determinado relativamente com os valores de um gene cromossômico *housekeeping* de cópia única (*mdh*) e dos genes *bla<sub>KPC</sub>* e *bla<sub>NDM</sub>*. Os números de cópias de plasmídeos relativa revelou que NCP dos plasmídeos contendo *bla<sub>KPC</sub>* em *K. pneumoniae* foram maiores que em seus transconjugantes. Além disso, NCP dos plasmídeos contendo *bla<sub>KPC</sub>* foram maiores que os NCP dos plasmídeos contendo *bla<sub>NDM</sub>* em BHKPC93 e BHKPC104 (Tabela 24).

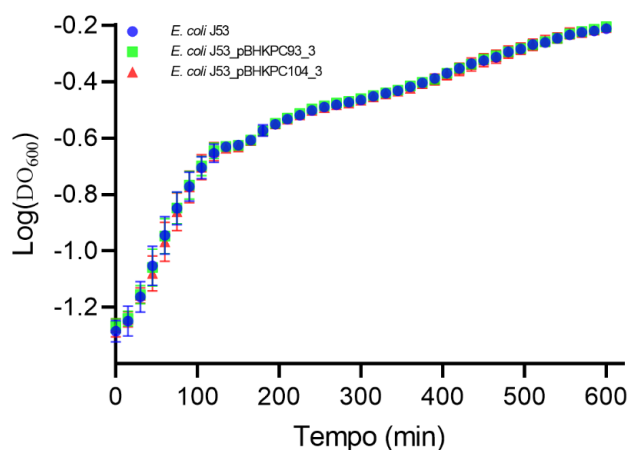


Figura 32 - Curvas de crescimento de *E. coli* J53 e linhagens transconjugantes.  
Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 24 - Dados de caracterização dos plasmídeos carreando *bla<sub>KPC</sub>* e *bla<sub>NDM</sub>*

	Taxa de conjugação	Tempo de duplicação (min)	CIM Imipenem (mg/L)	CIM Meropenem (mg/L)	NCP (plasmídeo <i>bla<sub>KPC</sub></i> / plasmídeo <i>bla<sub>NDM</sub></i> )
<i>E. coli</i> J53	-	111 ± 16	0,125	0,0625	-/-
<i>K. pneumoniae</i> BHKPC93	-	-	64	128	20,1 ± 0,1 / 1,86 ± 0,1
<i>K. pneumoniae</i> BHKPC104	-	-	128	256	7,14 ± 0,03 / 1,85 ± 0,07
<i>E. coli</i> J53 + pBHKPC93_3	2,1 × 10 <sup>-5</sup>	111 ± 13	2	2	1,87 ± 0,05 / -
<i>E. coli</i> J53 + pBHKPC104_3	1,7 × 10 <sup>-5</sup>	112 ± 14	2	2	0,78 ± 0,02 / -

Fonte: Elaborada pela autora.

#### 4.2.5 Efeito sinérgico entre CAZ-AVI e ATM possibilita tratamento de infecções causadas pelas linhagens do estudo

Os ensaios de disco difusão para avaliação de efeito sinérgico entre ceftazidima-avibactam (CAZ-AVI) e aztreonam (ATM) mostraram resultado positivo para tal efeito (Tabela

25). As linhagens de *E. coli* J53 carregam somente o gene *bla<sub>KPC</sub>* e, portanto, já são sensíveis a CAZ-AVI e resistentes a ATM, porém, nota-se um aumento do halo com CAZ-AVI + ATM indicando efeito sinérgico. As linhagens BHKPC93 e BHKPC104 são portadoras de ambos os genes e assim, resistentes a CAZ-AVI e ATM separadamente. O efeito sinérgico é ainda mais evidenciado quando os dados para as duas *K. pneumoniae* são analisados, alcançando um fenótipo de sensibilidade.

Tabela 25 - Média das medidas dos halos obtidos em triplicatas dos ensaios de disco difusão para avaliação de efeito sinérgico entre CAZ-AVI e ATM

	CAZ-AVI (mm)	ATM (mm)	CAZ-AVI + ATM (mm)
BHKPC93	8,7 ± 0,4	0	24 ± 1
BHKPC104	8,7 ± 0,4	0	23 ± 1
J53_pBHKPC93_3	24 ± 1	13 ± 1	31
J53_pBHKPC104_3	24,3 ± 0,4	13,7 ± 0,4	31 ± 1

Fonte: Elaborada pela autora



## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Análise da diversidade e impacto de NTE<sub>KPC</sub> e seus plasmídeos na disseminação do gene *bla*<sub>KPC</sub> em diferentes espécies.

Atualmente, KPC é a serina carbapenemase mais significativa clinicamente no Brasil, Estados Unidos e na maioria dos países do mundo, e sua rápida disseminação internacional a tornou uma ameaça à saúde pública mundial.<sup>30,33,37</sup>

A transmissão do gene que codifica a KPC, *bla*<sub>KPC</sub>, pode ser mediada por diferentes mecanismos moleculares, desde a mobilidade de pequenos elementos genéticos até a transferência horizontal de plasmídeos e via disseminação clonal.<sup>30,46</sup> Esse gene foi originalmente encontrado associado ao Tn4401, um transposon do tipo-Tn3.<sup>55-57</sup> e a esse ambiente genético e suas isoformas atribui-se a mobilidade do gene, bem como aos plasmídeos onde este transposon é encontrado.<sup>55,58-59</sup>

Porém, esse gene tem sido encontrado em outros ambientes genéticos referidos como NTE<sub>KPC</sub> e o impacto da mudança de ambiente genético na estabilidade e disseminação desse gene de resistência ainda é desconhecido.<sup>30,55,60-61</sup> Como o *bla*<sub>KPC</sub> era comumente detectado no Tn4401, a vigilância da disseminação do gene em outros ambientes genéticos raramente foi realizada em estudos brasileiros.<sup>41,62-63</sup>

Assim, a primeira parte desse trabalho objetivou caracterizar bactérias gram-negativas isoladas de hospitais do Brasil contendo o gene *bla*<sub>KPC</sub> em NTE<sub>KPC</sub> estudando seus ambientes genéticos e plasmídeos.

Um total de 54 isolados que carregam o gene *bla*<sub>KPC</sub> foi encontrado dentre as 212 linhagens selecionadas inicialmente para esse estudo, resultando em uma ocorrência de aproximadamente 25,5%. Todas os isolados selecionadas eram resistentes aos carbapenêmicos, porém o tipo de resistência que cada uma apresenta não estava elucidado. Assim, aqueles que não apresentaram o gene codificante para a carbapenemase alvo do estudo, podem possuir genes codificantes para outras carbapenemases, como, por exemplo, *bla*<sub>NDM</sub>, ou até mesmo outros mecanismos de resistência, como superexpressão de bombas de efluxo, modificações em porinas ou em enzimas alvos dos antibióticos desta classe. Esta taxa foi mais baixa do que o esperado, já que a expressão de KPC é o mecanismo mais comum de resistência aos carbapenêmicos no Brasil.<sup>44,71</sup>

As ocorrências encontradas para a presença da KPC mostram que os perfis dos isolados de cada localidade eram bem diferentes. A maior incidência do gene *bla*<sub>KPC</sub> ocorreu dentre os isolados do HCRP, seguido do HRTN e por fim, do LM. Nenhum dos isolados do HJLPM portava o gene *bla*<sub>KPC</sub>. É possível notar que os hospitais que apresentavam mais isolados da ordem *Enterobacteriales* apresentaram maior ocorrência do gene. De fato, os isolados do HJLPM eram *Acinetobacter* spp. ou *Pseudomonas aeruginosa*, mostrando uma menor incidência do *bla*<sub>KPC</sub> em linhagens destas espécies, como é relatado na literatura, onde se descreve uma maior incidência do gene em isolados de *K. pneumoniae*.<sup>24</sup>

Além das diferentes distribuições de ocorrência das amostras bacterianas contendo o gene em cada hospital, foi possível perceber uma predominância de isolados pertencentes à espécie *Klebsiella pneumoniae*, que inicialmente correspondiam a 49 dos 212 totais - aproximadamente 23% - e na distribuição dos isolados portadores do gene *bla*<sub>KPC</sub> correspondem a quase 68,5% (37/54), resultando em um aumento da taxa de *K. pneumoniae* entre os isolados. Esses dados são novamente consistentes com o encontrado na literatura, pois é relatado uma maior incidência do gene *bla*<sub>KPC</sub> em *K. pneumoniae*<sup>24</sup> - espécie na qual foi identificada essa carbapenemase pela primeira vez - apesar do mesmo ter se disseminado para diferentes espécies de bactérias gram-negativas.<sup>21,24,30,35-36</sup>

Ao analisar o ambiente genético carreando o gene *bla*<sub>KPC</sub> nos isolados selecionados, mais uma vez, foi obtida uma ocorrência do transposon Tn4401 de aproximadamente 38,9% (21/54) e esse valor se deve, principalmente, a taxa de 9% encontrada para os isolados do HRTN, onde apenas quatro dos 33 apresentaram o gene *bla*<sub>KPC</sub> no ambiente genético canônico. Esse perfil se mostrou diferente do esperado, já que é ao transposon Tn4401 e suas isoformas que ainda se atribui maior responsabilidade pela disseminação do gene *bla*<sub>KPC</sub>.<sup>55,58-59</sup> Os isolados do HCRP e LM apresentaram taxas altas e esperadas de 70,6% e 100%, respectivamente. Assim, mais uma vez, nota-se uma diferença dos perfis de cada hospital.

Após a seleção de representantes clonais, 29 isolados, de cinco espécies diferentes, tiveram seus genomas sequenciados e analisados. Apesar da diversidade genética indicada pelas STs de cada isolado, há pouca diversidade nos contextos genéticos do gene *bla*<sub>KPC</sub>, que se encontrava no ambiente genético NTE<sub>KPC</sub>-IId sem alterações, em todos os isolados, com exceção do *Enterobacter cloacae* BHKPC28. Além disso, este ambiente genético foi encontrado em plasmídeos IncQ1 mobilizáveis, semelhantes em todos os isolados, com exceção de *K. pneumoniae* RPKP04 e *E. coli* RPECLO01, onde se encontrava em um plasmídeo IncX3 conjugativo.



Estes dados indicam que houve uma disseminação do plasmídeo IncQ1 carreando *bla<sub>KPC</sub>* no HRTN entre 2009 e 2016. De fato, plasmídeos IncQ1 abrigando NTE<sub>KPC</sub>-IId são nacionalmente conhecidos e já foram descritos em diferentes regiões do Brasil.<sup>148-152</sup> Além dos isolados do HRTN, *K. pneumoniae* RPKP15 e *E. hormaechei* RPEC01 também abrigavam o mesmo plasmídeo, mostrando a ocorrência do mesmo em diferentes estados do Brasil. Estes plasmídeos apresentaram maiores taxas de NCP, indicando vantagens na replicação, em comparação aos plasmídeos IncX3 encontrados em *K. pneumoniae* RPKPC04 e *E. coli* RPECLO01, sem padrões observados em relação aos valores de CIM de imipenem e meropenem. Porém, os últimos possuem maquinaria própria de conjugação e podem se transferir horizontalmente para outras bactérias sem depender de outros plasmídeos, diferente dos plasmídeos IncQ1 que só possuem o módulo de mobilização e dependente do T4SS de outros plasmídeos para essa transferência. De fato, enquanto plasmídeos conjugativos são geralmente de baixo número de cópias, plasmídeos pequenos mobilizáveis tendem a ser de alto número de cópias.<sup>150,153</sup>

Apesar da baixa diversidade de plasmídeos e ambientes genéticos carreando o gene *bla<sub>KPC</sub>*, os isolados apresentaram diferentes populações de plasmídeos e também pertenciam a diferentes espécies, o que possibilitou analisar os plasmídeos em questão em diferentes contextos. Foi observado que em 8 isolados só havia o plasmídeo IncQ1 e em outros 3, somente plasmídeos mobilizáveis ou não mobilizáveis compunham a população de plasmídeos. Assim, os plasmídeos dessas linhagens não tinham a capacidade de se transferirem horizontalmente para outras bactérias devido à ausência de um plasmídeo que codificasse um T4SS. Supõe-se que plasmídeos conjugativos possibilitaram a transferência destes plasmídeos e posteriormente foram perdidos pelas células.

O isolado *K. pneumoniae* RPKP04, apesar de abrigar um plasmídeo IncX3 de menor NCP, apresentou valores altos de CIM de imipenem e meropenem em comparação com a maioria dos isolados, assim como *K. aerogenes* BHKPC06 e *K. aerogenes* BHKPC52 que abrigam o plasmídeo IncQ1, reforçando que o NCP não reflete diretamente na CIM de carbapenêmicos nesses isolados. Porém, a população de plasmídeos destas três linhagens é similar e pode ser o principal fator nos valores mais altos de resistência a esses antibióticos. Um comportamento semelhante é observado com as *E. coli* BHKPC37 e RPECLO01 que apresentam mesmos valores de CIM e valores diferentes de NCP.

Apesar de não ter sido observada relação direta entre o NCP e os valores de CIM de carbapenêmicos nos isolados analisados, os dados indicam uma relação do NCP com a espécie

que abriga o gene *bla*<sub>KPC</sub>. Os menores valores foram observados nos isolados de *P. stuartii*, indicando que os plasmídeos IncQ1 estão presentes em uma única cópia. Estes isolados também apresentam a menor diversidade de população plasmidial poucos genes de resistência distribuídos em poucos plasmídeos, em comparação com a maioria dos outros isolados. Os valores de CIM de imipenem para essa espécie foram altos, porém o BrCAST alerta sobre o fato da atividade intrinsecamente baixa do imipenem contra *Morganella morganii*, *Proteus* spp. e *Providencia* spp.

Para corroborar com a proposta relação entre NCP dos plasmídeos IncQ1 e a espécie do isolado que abriga o plasmídeo, foi observado que os maiores valores foram encontrados nos isolados de *K. pneumoniae*, com exceção de BHKPC15, cuja população de plasmídeo é composta apenas pelo plasmídeo carreando *bla*<sub>KPC</sub>. Este fato, pode indicar uma razão para a maior incidência do gene *bla*<sub>KPC</sub> em *K. pneumoniae*.<sup>24</sup>

A conjugação do plasmídeo IncQ1 para *E. coli* J53 só foi bem-sucedida ao utilizar-se *K. pneumoniae* BHKPC10 como a linhagem doadora. O alto NCP do pBHKPC10\_3 e a presença do plasmídeo conjugativo pBHKPC10\_2 podem ter contribuído para a transferência do primeiro. Os plasmídeos conjugados não geraram alterações no *fitness* da bactéria e aumentaram significativamente os valores de CIM de carbapenêmicos na linhagem transconjugante, contribuindo para suas persistências na célula. Mais uma vez observou-se um padrão de NCP e a espécie abrigando o plasmídeo, pois o NCP em *E. coli* foi comparativamente menor em relação ao mesmo plasmídeo em *K. pneumoniae*.

Os dados obtidos neste trabalho corroboram com a literatura que classifica os plasmídeos IncQ1 como pequenos replicons, notórios por sua estabilidade, baixo impacto no *fitness* bacteriano e alto potencial de mobilização, independentemente de serem não conjugativos.<sup>148,150-151</sup>

Por fim, este trabalho detectou o isolado *E. cloacae* BHKPC28 abrigando, além do gene *bla*<sub>KPC</sub> em IncQ1, o gene *mcr-9* e ao contrário da variante *mcr-9* descrita por Martins *et al.* (2021) e por Kieffer *et al.* (2019), *E. cloacae* BHKPC28 possui uma variante do gene *mcr-9* que confere resistência às polimixinas.<sup>154-155</sup> O gene *mcr-9* estava abrigado em um plasmídeo IncHI2/IncHI2A em seu ambiente genético é composto pelo gene *rcnR*, que codifica um repressor do gene *rcnA*, que é uma bomba de efluxo de níquel e cobalto além de *pcoE* e *pcoS* que são envolvidos em resistência ao cobre. A presença destes genes sugere que esta linhagem também seja resistente a estes metais.<sup>156-157</sup> De fato, plasmídeos IncHI2/IncHI2A já foram descritos como ligados a disseminação do gene *mcr* bem como o ambiente genético abrigando

o gene.<sup>158-161</sup> O isolado *E. hormaechei* BHKPC43 abriga um plasmídeo IncHI2/IncHI2A de tamanho próximo ao pBHKPC28\_1 e ambos compartilham 99,98% de identidade e 76% de cobertura, indicando que esse plasmídeo possa ter perdido o gene *mcr-9* e seguiu se disseminando pelo hospital.

Além disso, em BHKPC28, há uma inserção de um transposon Tn5403 no gene *tnpR* do NTE<sub>KPC</sub> do pBHKPC28\_5, mas essa alteração manteve íntegra a região responsável pela replicação do plasmídeo, logo, os valores de NCP obtidos foram parecidos aos dos outros plasmídeos IncQ1 dos isolados de mesma espécie. Por fim, apesar da inserção no ambiente genético abrigando *bla*<sub>KPC</sub>, este não foi modificado diretamente e não foram observados valores de CIM de carbapenêmicos divergentes dos analisados em isolados de mesma espécie. Resta saber se a mobilidade do novo ambiente genético é alterada com a inserção deste transposon *upstream* aos genes de resistência. Por fim, uma das grandes preocupações em relação a este isolado é que, sendo pBHKPC28\_1 um plasmídeo conjugativo, este poderia possibilitar a transferência do pBHKPC28\_5 durante seu processo de conjugação, e desta maneira disseminar dois determinantes de resistência a antibióticos considerados de último recurso, além de resistência a vários outros antibióticos e metais, limitando ainda mais a possibilidade de tratamento de infecções causadas por uma bactéria como esta.

## **5.2 Caracterização de plasmídeos carreando *bla*<sub>KPC-2</sub> e *bla*<sub>NDM-1</sub> de uma disseminação clonal de *K. pneumoniae* do ST11.**

Carbapenêmicos são antibióticos de último recurso e seu uso vêm aumentando devido à dificuldade de tratar infecções causadas por *Enterobacterales* multidroga resistentes. Esse fato tem resultado no aumento de isolados clínicos resistentes a esses antibióticos, se tornando uma ameaça a saúde pública global em decorrência das limitadas opções de tratamento.<sup>103,162</sup> Um cenário ainda pior ocorre quando há coprodução de carbapenemases, como KPC e NDM.<sup>162</sup>

Na América Latina, a primeira detecção de isolados coproduzindo KPC e NDM foi em isolados de *Enterobacter sp.* de setembro/outubro de 2013.<sup>103,163</sup> Pereira *et al.* (2015) descreveu um isolado multidroga resistente, sensível a amicacina e polimixina B, carreando *bla*<sub>KPC</sub> associado ao Tn4401b em um plasmídeo IncN de 50 kb e *bla*<sub>NDM</sub> em um plasmídeo IncA/C associado ao  $\Delta$ ISAba125 e ao gene *ble*. Ambos os genes foram associados com elementos genéticos móveis de importância epidemiológica mundial.

Desde sua primeira detecção, Argentina, Uruguai, Equador, Guatemala e Paraguai tem identificado isolados coprodutores de KPC e NDM com um aumento das taxas ocorrido entre 2020/2021.<sup>118</sup> Muitos estudos descreveram essa combinação no Brasil desde 2015, mas até o momento, nem os isolados nem os plasmídeos que carregam genes codificantes para KPC e NDM não foram caracterizados em grande detalhe.<sup>163–166</sup>

Assim, como parte deste trabalho, foram investigados molecularmente um clone ST11 de *K. pneumoniae* multidroga-resistente abrigando seis plasmídeos e 20 genes de resistência, incluindo *bla*<sub>KPC-2</sub> e *bla*<sub>NDM-1</sub>, e os plasmídeos contendo os genes codificantes para as carbapenemases foram caracterizados.

Os genes das carbapenemases dos isolados deste surto estavam presentes em diferentes plasmídeos já previamente descritos. Plasmídeos do tipo IncA/C carregando *bla*<sub>NDM-1</sub> foram previamente detectados em isolados de *Enterobacteriales* no Brasil.<sup>163</sup> Esses plasmídeos são associados a disseminação do *bla*<sub>NDM</sub>, sendo isolados de linhagens de diferentes países como Brasil, Alemanha, Romênia, Irã e Paquistão. Além disso, são usualmente maiores que pBHKPC93\_5 e pBHKPC104\_5 e amplamente disseminado.<sup>97,163,167–171</sup>

Plasmídeos IncN abrigando *bla*<sub>KPC</sub>, como os identificados em BHKPC93 e BHKPC104, já foram considerados plasmídeos “promíscuos” e têm sido detectados em diferentes hospedeiros, como humanos e cachorros.<sup>146-147</sup> Gomez-Simmonds *et al.* (2022) estudou plasmídeos IncN abrigando *bla*<sub>KPC</sub> em um centro médico da cidade de Nova Iorque e sugeriram evidências para sua transmissão horizontal multi-espécie.<sup>172</sup> Estes plasmídeos são amplamente disseminados e já foram encontrados em isolados de diferentes lugares como Brasil, Colômbia, EUA, Alemanha, Itália e Israel.<sup>147,163,172–179</sup> As análises realizadas neste estudo mostraram que um plasmídeo IncN similar abrigando *bla*<sub>KPC</sub> já estava circulando, em 2015, na *K. pneumoniae* BHKPC49 (número de acesso SAMN32643894), no mesmo hospital de onde BHKPC93 e BHKPC104 foram recuperados, como um elemento maior e pode ter genes perdidos ao longo do tempo.

Nas condições analisadas neste estudo, o número de cópias dos plasmídeos carregando *bla*<sub>KPC</sub> em BHKPC93 e BHKPC104 foram 11 vezes e 4 vezes maiores que os plasmídeos contendo *bla*<sub>NDM</sub>, o que pode ter contribuído para o fato de que somente pBHKPC93\_3 e pBHKPC104\_3 foram conjugados para *E. coli* J53. De acordo com o BrCast, os transconjugantes de *E. coli* J53 são sensíveis aos carbapenêmicos testados, mesmo sendo produtores de carbapenemases, o que poderia contribuir para a disseminação “silenciosa” desse gene de resistência antimicrobiana. O baixo número de cópias de dos plasmídeos *bla*<sub>KPC</sub> nos

transconjugantes de *E. coli* J53 poderia explicar os baixos valores de CIM comparados com BHKPC93 e BHKPC104. De acordo com outros estudos, diferentes plasmídeos em células bacterianas podem interagir e melhorar o *fitness*, replicação e transferência horizontal de genes.<sup>180-181</sup> As linhagens deste estudo abrigam seis plasmídeos, 5 dos quais carregam sistemas toxinas/antitoxinas que provavelmente contribuem para a sua manutenção na bactéria. Os plasmídeos menores pBHKPC93\_1 e pBHKPC104\_1 carreando somente um sistema T/A, podem ser vantajosos porque podem permitir que as células troquem plasmídeos sem afetar a viabilidade. Estudos mostraram a associação de uma família de toxinas com diferentes famílias de antitoxinas, sugerindo que o conceito de famílias de sistemas T/A não é adequado, abrindo a possibilidade de que genes de toxinas conhecidas possam estar associados a genes que representam novas antitoxinas e vice-versa.<sup>182-184</sup> A antitoxina HigA codificada por esses pequenos plasmídeos pode complementar antitoxinas de plasmídeos com o mesmo sistema T/A que poderiam ser perdidos, como pBHKPC93\_6 e pBHKPC104\_6, que são plasmídeos maiores e mais custosos para a célula. Apenas dois plasmídeos, 1 e 2, não foram considerados auto conjugativos. O plasmídeo 2, considerado mobilizável, provavelmente precisa compartilhar proteínas de conjugativas codificadas pelos outros plasmídeos na célula para se transferir. Apesar do potencial de serem mobilizáveis, apenas um plasmídeo foi conjugado para *E. coli* J53. O número de cópias de plasmídeos (NCP) dos plasmídeos abrigando *bla*<sub>KPC</sub> foram 11 vezes e 9 vezes maiores em *K. pneumoniae* que em *E. coli*. Então, em adição a presença de outros genes de resistência, incluindo  $\beta$ -lactamases, e mutações genes codificadores de porinas em BHKPC93 e BHKPC104, as interações entre diferentes plasmídeos podem desempenhar um papel importante na diferença do NCP e susceptibilidade aos carbapenêmicos em *E. coli* e *K. pneumoniae*, merecendo maiores investigações.



## 6 CONCLUSÕES

Dentre os 29 isolados estudados com NTE<sub>KPC</sub>:

- Somente foi detectado o gene *bla*<sub>KPC</sub> no ambiente genético NTE<sub>KPC</sub>-IId;
- NTE<sub>KPC</sub>-IId foi encontrado na maioria dos isolados em plasmídeo IncQ1 e em dois isolados em plasmídeo IncX3;
- Houve uma disseminação plasmidial do plasmídeo IncQ1 carreando o gene *bla*<sub>KPC</sub> em NTE<sub>KPC</sub>-IId durante os anos de 2009 a 2016 no Hospital Risolata Tolentino Neves de Belo Horizonte e este mesmo plasmídeo foi encontrado em dois isolados do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP;
- O plasmídeo IncX3 apresenta um NCP menor que o IncQ1 em *K. pneumoniae* e *E. coli* mas não há diferenças de CIM de imipenem e meropenem;
- IncQ1 apresenta um NCP maior em *K. pneumoniae*, o que pode estar relacionado à maior disseminação do *bla*<sub>KPC</sub> nessa espécie;
- O plasmídeo pBHKPC10\_3 foi transferido para *E. coli* J53 juntamente com pBHKPC10\_2 sem alterações do *fitness*, porém, com um NCP menor em relação a *K. pneumoniae* BHKPC10 que não resultou em alterações drásticas nos valores de CIM de imipenem e meropenem;
- *E. cloacae* BHKPC28 apresentou, dentre os plasmídeos conjugativos, o plasmídeo IncHI2/IncHI2A contendo o gene *mcr-9*, que confere resistência à polimixinas. A conjugação deste plasmídeo pode também mobilizar o plasmídeo IncQ1 disseminando ao mesmo tempo resistência a dois antibióticos considerados de último recurso.

Analisando os isolados coprodutores de KPC e NDM conclui-se que:

- Um clone de *K. pneumoniae* pertencente ao ST11 extensivamente resistente, coprodutor de KPC e NDM, causou o surto durante a pandemia de COVID-19 no HRTN.
- O clone continha o plasmídeo IncN que abrigava *bla*<sub>KPC</sub>, compartilhava uma alta identidade com outros plasmídeos da América Latina e já circulava como um elemento maior no mesmo hospital;

- O alto número de cópias do plasmídeo IncN com *bla*<sub>KPC</sub> em *K. pneumoniae* pode ter contribuído para a conjugação deste gene a *E. coli* J53;
- *E. coli* transconjugantes com IncN com *bla*<sub>KPC</sub> não sofreram alteração em seu fitness;
- A sensibilidade de *E. coli* a meropenem e imipenem, apesar do aumento dos valores de CIM, pode ser devido ao baixo número de cópias do plasmídeo que abriga *bla*<sub>KPC</sub> nesta espécie.



## REFERÊNCIAS

- 1 MOHR, K. I. History of antibiotics research. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 398, p. 237–272, 2016. DOI: 10.1007/82\_2016\_499.
- 2 HUTCHINGS, M.; TRUMAN, A.; WILKINSON, B. Antibiotics: past, present and future. **Current Opinion in Microbiology**, v. 51, p. 72–80, 2019. DOI: 10.1016/j.mib.2019.10.008.
- 3 KATZ, L.; BALTZ, R. H. Natural product discovery: past, present, and future. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 43, n. 2-3, p. 155–176, 2016.
- 4 ZINNER, S. H. Antibiotic use: present and future. **New Microbiologica**, v. 30, n. 3, p. 321–325, 2007.
- 5 COOK, M. A.; WRIGHT, G. D. The past, present, and future of antibiotics. **Science Translational Medicine**, v. 14, n. 657, 2022. DOI: 10.1126/scitranslmed.abo7793.
- 6 GUPTA, R.; SHARMA, S. Role of alternatives to antibiotics in mitigating the antimicrobial resistance crisis. **Indian Journal of Medical Research**, v. 156, n. 3, p. 464, 2022.
- 7 PEW CHARITABLE TRUSTS. **Tracking the global pipeline of antibiotics in development**. April 2020. Disponível em: <https://www.pewtrusts.org/en/research-and-analysis/issue-briefs/2020/04/tracking-the-global-pipeline-of-antibiotics-in-development>. Acesso em: 16 jul. 2023.
- 8 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **2021 antibacterial agents in clinical and preclinical development**. Geneva: WHO, 2022
- 9 CENTERS FOR DISEASE CONTROL. **Antibiotic resistance threats in the United States 2019**. Disponível em: <https://ndc.services.cdc.gov/wp-content/uploads/Antibiotic-Resistance-Threats-in-the-United-States-2019.pdf>. Acesso em: 23 jan. 2022.
- 10 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Antibiotic resistance**. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>. Acesso em 24 out. 2021.
- 11 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Ten threats to global health in 2019**. Disponível em: <https://www.who.int/vietnam/news/feature-stories/detail/ten-threats-to-global-health-in-2019>. Acesso em: 20 nov. 2021.
- 12 BOKHARY, H. *et al.* Travel-related antimicrobial resistance: a systematic review. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 6, n. 1, 2021. DOI: 10.3390/tropicalmed6010011.
- 13 O'NEILL, J. **Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations the review on antimicrobial resistance**. 2016. Disponível em: [https://amr-review.org/sites/default/files/160518\\_Final%20paper\\_with%20cover.pdf](https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf). Acesso em: 23 jan. 2022.
- 14 MARTINEZ, J. L. General principles of antibiotic resistance in bacteria. **Drug Discovery Today: technologies**, v. 11, n. 1, p. 33–39, 2014.
- 15 DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, n. 3, p. 417, 2010.

- 16 LIU, B.; POP, M. ARDB—antibiotic resistance genes database. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. d443, 2009. DOI: 10.1093/nar/gkn656.
- 17 ANDRADE, L. N.; DARINI, A. L. C. Bacilos gram-negativos produtores de beta-lactamases: que bla bla bla é esse? **Journal of Infection Control**, v. 6, n. 1, p. 16–25, 2017.
- 18 BUSH, K.; BRADFORD, P.  $\beta$ -Lactams and  $\beta$ -Lactamase inhibitors: an overview. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 6, n. 8, 2016. DOI: 10.1101/cshperspect.a025247.
- 19 GEORGOPAPADAKOU, N. H.; LIU, F. Y. Penicillin-binding proteins in bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 18, n. 1, p. 148, 1980.
- 20 WILLIAMS, J. D. Beta-lactamases and beta-lactamase inhibitors. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 12, Suppl. 1, 1999. DOI: 10.1016/s0924-8579(99)00085-0.
- 21 BLAIR, J. M. A. *et al.* Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 1, 2015. DOI: 10.1038/nrmicro3380.
- 22 BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of  $\beta$  MINIREVIEW updated functional classification of  $\beta$ -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 3, 2010.
- 23 NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. National Library of Medicine. **Reference gene catalog: pathogen detection**. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/refgene/#>. Acesso em: 20 nov. 2021.
- 24 KOPOTSA, K.; SEKYERE, J. O.; MBELLE, N. M. Plasmid evolution in carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: a review. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1457, n. 1, p. 61–91, 2019.
- 25 KATTAN, J. N.; VILLEGAS, M.; QUINN, J. P. New developments in carbapenems. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, n. 12, p. 1102, 2008.
- 26 TAGGAR, G. *et al.* Molecular epidemiology of carbapenemases in enterobacteriales from humans, animals, food and the environment. **Antibiotics**, v. 9, n. 10, p. 1–22, 2020.
- 27 BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Antimicrobianos: bases teóricas e uso clínico**. Disponível em: [https://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede\\_rm/cursos/rm\\_controle/opas\\_web/modulo1/carbapenens.htm](https://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/carbapenens.htm). Acesso em: 24 out. 2021
- 28 BUEHRLE, D. J. *et al.* Carbapenem-resistant pseudomonas aeruginosa bacteremia: Risk factors for mortality and microbiologic treatment failure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 1, 2017. DOI: 10.1128/AAC.01243-16.
- 29 CAI, B. *et al.* Prevalence of carbapenem-resistant gram-negative infections in the United States predominated by acinetobacter baumannii and Pseudomonas aeruginosa. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 4, n. 3, 2017. DOI: 10.1093/ofid/ofx176.
- 30 CHEN, L. *et al.* Carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae: molecular and genetic decoding HHS public access. **Trends in Microbiology**, v. 22, n. 12, p. 686–696, 2014.
- 31 QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: the versatile  $\beta$ -lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 3, 2007. DOI: 10.1128/CMR.00001-07.

- 32 GNIADEK, T. J.; CARROLL, K. C.; SIMNER, P. J. Carbapenem-resistant non-glucose-fermenting gram-negative bacilli: the missing piece to the puzzle. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 7, p. 1700, 2016.
- 33 TZOUVELEKIS, L. S. *et al.* Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 4, p. 682, 2012.
- 34 CHIKALA, R.; RATNAKAR, K.; SRITHARAN, V. A structural, epidemiological & genetic overview of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs). **Indian Journal of Medical Research**, v. 144, n. 1, p. 21–31, 2016.
- 35 DESHPANDE, L. M. *et al.* Occurrence and characterization of carbapenemase-producing enterobacteriaceae: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program (2000-2004). **Microbial Drug Resistance**, v. 12, n. 4, p. 223, 2006.
- 36 YIGIT, H. *et al.* Novel carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 4, p. 1151-61, 2001.
- 37 MUNOZ-PRICE, L. S. *et al.* Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. **Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 9, p. 785-96, 2013.
- 38 ANDRADE, L. N. *et al.* Dissemination of blaKPC-2 by the spread of *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 258 clones (ST258, ST11, ST437) and plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among Enterobacteriaceae species in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 7, p. 3579-83, 2011.
- 39 NORDMANN, P.; CUZON, G.; NAAS, T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. **Lancet Infectious Diseases**, v. 9, n. 4, p. 228-226, 2009.
- 40 SAMPAIO, J. L. M.; GALES, A. C. Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae in Brazil: focus on  $\beta$ -lactams and polymyxins. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 31–37, 2016.
- 41 MONTEIRO, J. *et al.* First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 53, n. 1, 2009. DOI: 1128/AAC.00736-08
- 42 BARTOLLETTI, 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.
- 43 KARLOWSKY, J. A. *et al.* In vitro activity of imipenem against carbapenemase-positive Enterobacteriaceae isolates collected by the SMART global surveillance program from 2008 to 2014. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, n. 6, p. 1638-1649, 2017.
- 44 KIFFER, C. R. V *et al.* A 7-Year Brazilian national perspective on plasmid-mediated carbapenem resistance in enterobacterales, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* complex and the impact of the coronavirus disease 2019 pandemic on their occurrence. **Clinical Infectious Diseases**, v. 77, Suppl 1, p. S29–S37, 2023.
- 45 WINK, P. L. *et al.* Increased frequency of bla NDM in a tertiary care hospital in southern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 299–301, 2021.

- 46 MUNOZ-PRICE, L. S.; QUINN, J. P. The spread of klebsiella pneumoniae carbapenemases: a tale of strains, plasmids, and transposons. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, n. 11, p. 1739-41, 2009.
- 47 CUZON, G. *et al.* Worldwide diversity of klebsiella pneumoniae that produces  $\beta$ -lactamase blaKPC-2 Gene. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 9, p. 1349–1356, 2010.
- 48 KITCHEL, B. *et al.* Molecular epidemiology of KPC-producing Klebsiella pneumoniae isolates in the United States: clonal expansion of multilocus sequence type 258. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 8, p. 3365-70, 2009.
- 49 SCHWABER, M. J. *et al.* Containment of a country-wide outbreak of carbapenem-resistant klebsiella pneumoniae in Israeli hospitals via a nationally implemented intervention. **Clinical Infectious Diseases**, v. 52, n. 7, p. 848-55, 2011.
- 50 CHEN, L. *et al.* Complete nucleotide sequence of a blaKPC-harboring IncI2 plasmid and its dissemination in New Jersey and New York hospitals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 10, p. 5019–5025, 2013.
- 51 COTTELL, J. L. *et al.* Functional genomics to identify the factors contributing to successful persistence and global spread of an antibiotic resistance plasmid. **BMC Microbiology**, v. 14, n. 1, 2014. DOI: 10.1186/1471-2180-14-168
- 52 CHMELNITSKY, I. *et al.* Unique genes identified in the epidemic extremely drug-resistant KPC-producing Klebsiella pneumoniae sequence type 258. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 1, p. 74-83, 2013.
- 53 ANDRADE, L. N. *et al.* Dissemination of blaKPC-2 by the spread of Klebsiella pneumoniae clonal complex 258 clones (ST258, ST11, ST437) and plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among Enterobacteriaceae species in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 7, p. 3579–3583, 2011.
- 54 TOLENTINO, F. M. *et al.* Endemicity of the high-risk clone Klebsiella pneumoniae ST340 Coproducing QnrB, CTX-M-15, and KPC-2 in a Brazilian Hospital. **Microbial Drug Resistance**, v. 25, n. 4, p. 528–537, 2019.
- 55 NAAS, T. *et al.* Genetic structures at the origin of acquisition of the  $\beta$ -lactamase blaKPC gene. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 4, p. 1257–1263, 2008.
- 56 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 and Chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 37-41, 2013.
- 57 BARRÍA-LOAIZA, C. *et al.* Molecular typing and genetic environment of the blaKPC gene in Chilean isolates of Klebsiella pneumoniae. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 4, p. 28-34, 2016. DOI: 10.1016/j.jgar.2016.01.001.
- 58 MENDES, R. E. *et al.* Carbapenem-resistant isolates of Klebsiella pneumoniae in China and detection of a conjugative plasmid (blaKPC-2 plus qnrB4) and a blaIMP-4 gene. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 52, n. 2, 2008. DOI: 10.1128/AAC.01185-07.
- 59 JIANG, Y. *et al.* Complete nucleotide sequence of Klebsiella pneumoniae multidrug resistance plasmid pKP048, carrying blaKPC-2, blaDHA-1, qnrB4, and armA. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 9, p. 3967-9, 2010.

- 60 DE BELDER, D. *et al.* Genetic diversity of KPC-producing *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia marcescens*, and *Citrobacter freundii* isolates from Argentina. **Microbial Drug Resistance**, v. 24, n. 7, p. 958-965, 2018.
- 61 SOUZA, R. C. de *et al.* Dissemination of blaKPC-2 in an NTEKPC by an IncX5 plasmid. **Plasmid**, v. 106, 2019. DOI: 10.1016/j.plasmid.2019.102446.
- 62 GALETTI, R. *et al.* A phage-like plasmid carrying blaKPC-2 Gene in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. mar, p. 572, 2019.
- 63 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 and Infectious Disease**, v. 89, n. 2, p. 164-167, 2017.
- 64 WEI, W. J. *et al.* New Delhi metallo- $\beta$ -Lactamase-mediated carbapenem resistance: origin, diagnosis, treatment and public health concern. **Chinese Medical Journal (Engl)**, v. 128, n. 14, p. 1969–1976, 2015.
- 65 YONG, D. *et al.* Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), 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. 5046–5054, 2009.
- 66 WU, W. *et al.* NDM metallo- $\beta$ -lactamases and their bacterial producers in health care settings. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 32, n. 2, 2019. DOI: 10.1128/CMR.00115-18.
- 67 NORDMANN, P. *et al.* The emerging NDM carbapenemases. **Trends in Microbiology**, v. 19, n. 12, p. 588–595, 2011.
- 68 KAZMIERCZAK, K. M. *et al.* Multiyear, multinational survey of the incidence and global distribution of metallo- $\beta$ -Lactamase-producing Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 2, p. 1067–1078, 2015.
- 69 CAMARGO, C. H. Current status of NDM-producing Enterobacterales in Brazil: a narrative review. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 3, p. 1339-1344, 2022.
- 70 CARVALHO-ASSEF, A. P. D'Á. *et al.* Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 12, p. 2956–2957, 2013.
- 71 KARLOWSKY, J. A. *et al.* In vitro activity of imipenem against carbapenemase-positive enterobacteriaceae isolates collected by the SMART global surveillance program from 2008 to 2014. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, n. 6, p. 1638, 2017.
- 72 MOCHON, A. B. *et al.* New Delhi metallo- $\beta$ -Lactamase (NDM-1)-producing *Klebsiella pneumoniae*: case report and laboratory detection strategies. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 4, p. 1667, 2011.
- 73 DIAS, V. M. C. H. *et al.* Trend analysis of carbapenem-resistant Gram-negative bacteria and antimicrobial consumption in the post-COVID-19 era: an extra challenge for healthcare institutions. **Journal of Hospital Infection**, v. 120, p. 43–47, 2022. DOI: 10.1016/j.jhin.2021.11.011.
- 74 PITOUT, J. D. D.; NORDMANN, P.; POIREL, L. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 10, p. 5873, 2015.

75 ZHANG, R. *et al.* Nationwide surveillance of clinical carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) strains in China. **EBioMedicine**, v. 19, p. 98, 2017.

76 YOON, E. J. *et al.* Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in South Korea: a report from the National Laboratory Surveillance System. **Future Microbiology**, v. 13, n. 7, p. 771–783, 2018.

77 JAIN, A. *et al.* NDM carbapenemases in the United Kingdom: an analysis of the first 250 cases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 7, p. 1777–1784, 2014.

78 GISKE, C. G. *et al.* Diverse sequence types of Klebsiella pneumoniae contribute to the dissemination of blaNDM-1 in India, Sweden, and the United Kingdom. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 5, p. 2735, 2012.

79 POIREL, L. *et al.* Emergence of metallo- $\beta$ -lactamase NDM-1-producing multidrug-resistant Escherichia coli in Australia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 11, p. 4914–4916, 2010.

80 POIREL, L.; BONNIN, R. A.; NORDMANN, P. Analysis of the resistome of a multidrug-resistant NDM-1-producing escherichia coli strain by high-throughput genome sequencing. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 9, p. 4224, 2011.

81 MUSSI, M. A.; LIMANSKY, A. S.; VIALE, A. M. Acquisition of resistance to carbapenems in multidrug-resistant clinical strains of Acinetobacter baumannii: natural insertional inactivation of a gene encoding a member of a novel family of beta-barrel outer membrane proteins. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 4, p. 1432–1440, 2005.

82 POIREL, L. *et al.* Genetic features of blaNDM-1-positive Enterobacteriaceae. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 11, p. 5403–5407, 2011.

83 RAHMAN, M. *et al.* Prevalence and molecular characterization of New Delhi metallo-Beta-Lactamases in multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa and acinetobacter baumannii from India. **Microbial Drug Resistance**, v. 24, n. 6, p. 792–798, 2018.

84 ESPINAL, P. *et al.* Dissemination of an NDM-2-producing acinetobacter baumannii clone in an Israeli rehabilitation center. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 11, p. 5396–5398, 2011.

85 BARANIAK, A. *et al.* NDM-producing Enterobacteriaceae in Poland, 2012–14: inter-regional outbreak of Klebsiella pneumoniae ST11 and sporadic cases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 1, p. 85–91, 2016.

86 KUMARASAMY, K.; KALYANASUNDARAM, A. Emergence of Klebsiella pneumoniae isolate co-producing NDM-1 with KPC-2 from India. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 1, p. 243–244, 2012.

87 WALSH, T. R. *et al.* Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. **Lancet Infectious Diseases**, v. 11, n. 5, p. 355–362, 2011.

88 ZUJIĆ ATALIĆ, V. *et al.* Diversity of carbapenemases in clinical isolates of Enterobacteriaceae in Croatia--the results of a multicentre study. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 11, p. o894–O903, 2014.

- 89 DZIRI, O. *et al.* Metallo- $\beta$ -lactamases and class D carbapenemases in south-east Tunisia: Implication of mobile genetic elements in their dissemination. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 52, n. 6, p. 871–877, 2018.
- 90 YOON, E. J. *et al.* New Delhi metallo-Beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in South Korea Between 2010 and 2015. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. mar, p. 571, 2018.
- 91 BOSCH, T. *et al.* Outbreak of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Dutch Hospital, with interspecies transfer of the resistance plasmid and unexpected occurrence in unrelated Health Care Centers. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, n. 8, p. 2380–2390, 2017.
- 92 RASHEED, J. K. *et al.* New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae, United States. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, n. 6, p. 870–878, 2013.
- 93 KIEFFER, N. *et al.* High prevalence of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae among Hospitalized Children in Luanda, Angola. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 10, p. 6189–6192, 2016.
- 94 BECKER, L. *et al.* Genome-based analysis of Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from German hospital patients, 2008-2014. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 7, n. 1, 2018. DOI: 10.1186/s13756-018-0352-y.
- 95 WU, W. *et al.* Characterization of an *Enterobacter cloacae* strain producing both KPC and NDM Carbapenemases by whole-genome sequencing. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 10, p. 6625–6628, 2015.
- 96 KUMARASAMY, K. K. *et al.* Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. **Lancet Infectious Diseases**, v. 10, n. 9, p. 597, 2010.
- 97 WAILAN, A. M. *et al.* Genomic characteristics of NDM-producing enterobacteriaceae isolates in Australia and their blaNDM genetic contexts. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 1, p. 136, 2016.
- 98 DOLEJSKA, M. *et al.* Complete sequencing of an IncHI1 plasmid encoding the carbapenemase NDM-1, the ArmA 16S RNA methylase and a resistance-nodulation-cell division/multidrug efflux pump. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 1, p. 34–39, 2013.
- 99 AL-BALOUSHI, A. E. *et al.* Genetic support of carbapenemases in double carbapenemase producer *Klebsiella pneumoniae* isolated in the Arabian Peninsula. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v. 65, n. 2, p. 135–150, 2018.
- 100 SARTOR, A. L. *et al.* Molecular epidemiology of NDM-1-producing Enterobacteriaceae and *Acinetobacter baumannii* isolates from Pakistan. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 9, p. 5589–5593, 2014.
- 101 POIREL, L. *et al.* NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in the Sultanate of Oman. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 2, p. 304–306, 2011.
- 102 NETIKUL, T. *et al.* Characterization of an IncN2-type blaNDM-1-carrying plasmid in *Escherichia coli* ST131 and *Klebsiella pneumoniae* ST11 and ST15 isolates in Thailand **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 11, p. 3161–3163, 2014.

- 103 QUILLES, M. G. *et al.* Unusual association of NDM-1 with KPC-2 and armA among Brazilian Enterobacteriaceae isolates. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 2, p. 174–177, 2015.
- 104 KOCSIS, E. *et al.* blaNDM-1 Carriage on IncR Plasmid in Enterobacteriaceae Strains. **Microbial Drug Resistance**, v. 22, n. 2, p. 123–128, 2016.
- 105 HO, P. L. *et al.* Identification and characterization of a novel incompatibility group X3 plasmid carrying bla NDM-1 in Enterobacteriaceae isolates with epidemiological links to multiple geographical areas in China. **Emerging Microbes & Infections**, v. 1, n. 11, 2012. DOI: 10.1038/emi.2012.37.
- 106 FENG, Y. *et al.* Characterization of Acinetobacter johnsonii isolate XBB1 carrying nine plasmids and encoding NDM-1, OXA-58 and PER-1 by genome sequencing. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 1, p. 71–75, 2016.
- 107 KING, A. M. *et al.* Aspergillomarasmine a overcomes metallo- $\beta$ -lactamase antibiotic resistance. **Nature**, v. 510, n. 7506, p. 503–506, 2014.
- 108 PEDERSEN, T. *et al.* Spread of plasmid-encoded NDM-1 and GES-5 carbapenemases among extensively drug-resistant and pandrug-resistant clinical enterobacteriaceae in durban, South Africa. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 5, 2018. DOI: 10.1128/AAC.02178-17.
- 109 PARTRIDGE, S. R. *et al.* Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 31, n. 4, 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2021.773284.
- 110 LUTGRING, J. D.; LIMBAGO, B. M. The problem of carbapenemase-producing-carbapenem-resistant-enterobacteriaceae detection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 529, 2016.
- 111 HALARY, S. *et al.* Network analyses structure genetic diversity in independent genetic worlds. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 1, p. 127-32, 2010.
- 112 RAMSAY, J. P.; FIRTH, N. Diverse mobilization strategies facilitate transfer of non-conjugative mobile genetic elements. **Current Opinion in Microbiology**, v. 38, 2017. DOI: 10.1016/j.mib.2017.03.003.
- 113 WEIN, T. *et al.* Emergence of plasmid stability under non-selective conditions maintains antibiotic resistance. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, 2019. DOI:10.1038/s41467-019-10600-7.
- 114 SAN MILLAN, A.; MACLEAN, R. C. Fitness costs of plasmids: a limit to plasmid transmission. **Microbiology Spectrum Journal Homepage**, v. 5, n. 5, 2017. DOI: 10.1128/microbiolspec.MTBP-0016-2017.
- 115 ROZALES, F. P. *et al.* Emergence of NDM-1-producing Enterobacteriaceae in Porto Alegre, Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 25, p. 79–81, 2014. DOI: 10.1016/j.ijid.2014.01.005.
- 116 SAMPAIO, J. L. M.; GALES, A. C. Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae in Brazil: focus on  $\beta$ -lactams and polymyxins. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 31–37, 2016. DOI: 10.1016/j.bjm.2016.10.002.



117 DA SILVA, I. R. *et al.* Distribution of clinical NDM-1-producing gram-negative bacteria in Brazil. **Microbial Drug Resistance**, v. 25, n. 3, p. 394–399, 2019.

118 PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. World Health Organization. **Epidemiological alert**: emergence and increase of new combinations of carbapenemases in Enterobacterales in Latin America and the Caribbean. Washington: PAHO/WHO, 2021.

119 BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Nota Técnica Nº 74/2022**. Coordenação-geral de laboratórios de saúde pública (CGLAB), Brazilian committee on antimicrobial susceptibility testing (BrCAST) e agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA). aumento na frequência de isolamento de bactérias multirresistentes, em especial dos bacilos gram-negativos (BGN) produtores da metalo-beta-lactamase “New Delhi” (NDM). Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde, 2022. Disponível em:

[http://brcast.org.br/wp-content/uploads/2022/08/SEI\\_MS-0028220258-Nota-Tecnica-NDM-ecoproducaocarbapenemase.pdf](http://brcast.org.br/wp-content/uploads/2022/08/SEI_MS-0028220258-Nota-Tecnica-NDM-ecoproducaocarbapenemase.pdf). Acesso em: 20 nov. 2022.

120 SHAKIL, S. *et al.* New Delhi Metallo- $\beta$ -Lactamase (NDM-1): an updates. **Journal of Chemotherapy**, v. 23, n. 5, p. 263–265, 2013.

121 GUIMARÃES, T. *et al.* Ceftazidime-a vibactam as salvage therapy for infections caused by Enterobacterales coresistant to carbapenems and polymyxins. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, n. 10, 2019. DOI: 10.1128/AAC.00528-19.

122 EL-SAYED AHMED, M. A. E. G. *et al.* Colistin and its role in the Era of antibiotic resistance: an extended review (2000-2019). **Emerging Microbes & Infections**, v. 9, n. 1, p. 868–885, 2020.

123 DAVIDO, B. *et al.* Ceftazidime-avibactam and aztreonam, an interesting strategy to overcome  $\beta$ -Lactam resistance conferred by Metallo- $\beta$ -lactamases in enterobacteriaceae and pseudomonas aeruginosa. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 9, 2017.

124 FALCONE, M. *et al.* Efficacy of ceftazidime-avibactam plus aztreonam in patients with bloodstream infections caused by metallo- $\beta$ -lactamase-producing enterobacterales. **Clinical Infectious Diseases**, v. 72, n. 11, p. 1871–1878, 2021.

125 LIMA, K. de O. *et al.* A simple disk pre-diffusion test to predict in vitro aztreonam/avibactam activity against NDM-producing Klebsiella pneumoniae complex. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 28, p. 49–52, 2022.

126 YAMANO, Y.; YAMANO, Y. In vitro activity of cefiderocol against a broad range of clinically important gram-negative bacteria. **Clinical Infectious Diseases**, v. 69, Suppl. 7, p. S544–S551, 2019.

127 ABDUL-MUTAKABBIR, J. C. *et al.* Cefiderocol: a novel siderophore cephalosporin against multidrug-resistant gram-negative pathogens. **Pharmacotherapy: journal of human pharmacology and drug therapy**, v. 40, n. 12, p. 1228–1247, 2020.

128 SANSONE, P. *et al.* Cefiderocol for Carbapenem-resistant bacteria: handle with care! a review of the real-world evidence. **Antibiotics**, v. 11, n. 7, p. 904, 2022.

129 BIANCO, G. *et al.* Occurrence of multi-carbapenemases producers among carbapenemase-producing Enterobacterales and in vitro activity of combinations including cefiderocol, ceftazidime-avibactam, meropenem-vaborbactam, and aztreonam in the COVID-19 era. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 41, n. 4, p. 573–580, 2022.

- 130 MARAKI, S. *et al.* In vitro activity of newer  $\beta$ -lactam/ $\beta$ -lactamase inhibitor combinations, cefiderocol, plazomicin and comparators against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates. **Journal of Chemotherapy**, p. 1–5, 2023. DOI: 10.1080/1120009X.2023.2170906.
- 131 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.
- 132 ISO 20776-1:2019 - susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices — part 1: broth micro-dilution reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases. Disponível em: <https://www.iso.org/standard/70464.html>. Acesso em 16 jul. 2023.
- 133 WOODALL, C. A. DNA transfer by bacterial conjugation. **Methods in Molecular Biology**, v. 235, p. 61–65, 2003.
- 134 ŠKULJ, M. *et al.* Improved determination of plasmid copy number using quantitative real-time PCR for monitoring fermentation processes. **Microbial Cell Factories**, v. 7, n. 1, p. 1–12, 2008.
- 135 VUOTTO, C. *et al.* Biofilm formation and antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* urinary strains. **Journal of Applied Microbiology**, v. 123, n. 4, p. 1003–1018, 2017.
- 136 D'APOLITO, D. *et al.* Phenotypical and molecular assessment of the virulence potential of KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* ST392 clinical isolates. **Microbiological Research**, v. 240, p. 126551, 2020.
- 137 DIANCOURT, L. *et al.* Multilocus Sequence Typing of *Klebsiella pneumoniae* Nosocomial Isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 8, p. 4178, 2005.
- 138 SOUZA, R. C. *et al.* Dissemination of blaKPC-2 in an NTEKPC by an IncX5 plasmid. **Plasmid**, v. 106, 2019. DOI: 10.1016/j.plasmid.2019.102446.
- 139 MELLO, S. S. *et al.* A mutation in the glycosyltransferase gene *lafB* causes daptomycin hypersusceptibility in *Enterococcus faecium*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 75, n. 1, p. 75, 2020.
- 140 CARRASCO, L. D. de M. *et al.* Polymyxin resistance among XDR ST1 carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clone expanding in a Teaching Hospital. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, 2021. DOI: 10.3389/fmicb.2021.622704.
- 141 BORALLI, C. M. S. *et al.* Characterization of blaKPC-2 and blaNDM-1 Plasmids of a *K. pneumoniae* ST11 Outbreak Clone. **Antibiotics**, v. 12, n. 5, p. 926, 2023.
- 142 CHEN, F. J. *et al.* The roles of mutations in *gyrA*, *parC*, and *ompK35* in fluoroquinolone resistance in *Klebsiella pneumoniae*. **Microbial Drug Resistance**, v. 9, n. 3, p. 265–271, 2004.
- 143 AKYA, A. *et al.* The impact of mutations in topoisomerase genes and the plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) determinants on the resistance to fluoroquinolones in *Klebsiella pneumoniae*. **Archives of Clinical Infectious Diseases**, v. 12, n. 4, p. 57290, 2017.
- 144 AL MANA, H. *et al.* Whole-genome sequencing for molecular characterization of carbapenem-resistant enterobacteriaceae causing lower urinary tract infection among pediatric patients. **Antibiotics**, v. 10, n. 8, p. 972, 2021.

- 145 ÖZAD DÜZGÜN, A. From Turkey: first report of KPC-3- and CTX-M-27-producing multidrug-resistant klebsiella pneumoniae ST147 clone carrying *OmpK36* and *OmpK37* porin mutations. **Microbial Drug Resistance**, v. 27, n. 9, p. 1265–1270, 2021.
- 146 SELLERA, F. P. *et al.* Detection of IncN-pST15 one-health plasmid harbouring bla KPC-2 in a hypermucoviscous Klebsiella pneumoniae CG258 isolated from an infected dog, Brazil. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 68, n. 6, p. 3083, 2021.
- 147 RADA, A. M. *et al.* Dynamics of blaKPC-2 dissemination from non-CG258 Klebsiella pneumoniae to other enterobacteriales via IncN plasmids in an area of high endemicity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, n. 12, 2020. DOI: 10.1128/AAC.01743-20.
- 148 CAMPOS, P. A. *et al.* Early dissemination of IncQ1 plasmids in KPC-2-producing Klebsiella pneumoniae CG258. **Microbial Drug Resistance**, v. 25, n. 8, p. 1257–1259, 2019.
- 149 CERDEIRA, L. T. *et al.* Small IncQ1 and Col-like Plasmids harboring blaKPC-2 and Non-Tn4401 elements (NTEKPC-IIId) in high-risk lineages of Klebsiella pneumoniae CG258. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, n. 3, 2019. DOI: 10.1128/AAC.02140-18.
- 150 FUGA, B. *et al.* Genomic data reveals the emergence of an IncQ1 small plasmid carrying blaKPC-2 in Escherichia coli of the pandemic sequence type 648. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 25, p. 8, 2021.
- 151 CAMPANA, E. H. *et al.* Description of a new non-Tn4401 element (NTEKPC-IIe) harboured on IncQ plasmid in Citrobacter werkmanii from recreational coastal water. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 29, p. 207–211, 2022.
- 152 DE LIMA, G. J. *et al.* Identification of plasmid IncQ1 and NTEKPC-IIId harboring bla KPC-2 in isolates from Klebsiella pneumoniae infections in patients from Recife-PE, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 53, p. 1–5, 2020.
- 153 GARCILLÁN-BARCIA, M. P.; ALVARADO, A.; DE LA CRUZ, F. Identification of bacterial plasmids based on mobility and plasmid population biology. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 35, n. 5, p. 936–956, 2011.
- 154 KIEFFER, N. *et al.* Mcr-9, an inducible gene encoding an acquired phosphoethanolamine transferase in escherichia coli, and its origin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, n. 9, 2019. DOI: 10.1128/AAC.00965-19.
- 155 MARTINS, W. M. B. S. *et al.* BKC-2, a new BKC variant detected in MCR-9.1-producing enterobacter hormaechei subsp. xiangfangensis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 65, n. 3, 2021. DOI: 10.1128/AAC.01193-20.
- 156 BLAHA, D. *et al.* The Escherichia coli metallo-regulator RcnR represses rcnA and rcnR transcription through binding on a shared operator site: Insights into regulatory specificity towards nickel and cobalt. **Biochimie**, v. 93, n. 3, p. 434–439, 2011.
- 157 LI, Y. *et al.* Characterization of the global distribution and diversified plasmid reservoirs of the colistin resistance gene mcr-9. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–10, 2020.
- 158 LIU, Z. *et al.* Co-occurrence of blaNDM-1 and mcr-9 in a conjugative IncHI2/HI2A plasmid from a bloodstream infection-causing carbapenem-resistant klebsiella pneumoniae. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 756201, 2021.

- 159 TYSO, G. H. *et al.* The *mcr-9* gene of salmonella and *Escherichia coli* is not associated with Colistin resistance in the United States. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, n. 8, 2020. DOI: 10.1128/AAC.00573-20.
- 160 BITAR, I. *et al.* Detection of Five *mcr-9*-Carrying Enterobacterales isolates in four Czech Hospitals. *mSphere*, v. 5, n. 6, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1128/msphere.01008-20>.
- 161 GALETTI, R. *et al.* pST15-IncHI2 plasmids co-harboring *mcr-9* and several other antibiotic resistance genes in heavy metal tolerant *Enterobacter cloacae* complex isolates from hospital infections. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 31, p. 187–188, 2022.
- 162 VÁSQUEZ-PONCE, F. *et al.* Detecting KPC-2 and NDM-1 Coexpression in *Klebsiella pneumoniae* complex from human and animal hosts in south America. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 5, 2022. DOI: 10.1128/spectrum.01159-22.
- 163 PEREIRA, P. S. *et al.* Coproduction of NDM-1 and KPC-2 in *Enterobacter hormaechei* from Brazil. **Microbial Drug Resistance**, v. 21, n. 2, p. 234–236, 2015.
- 164 VIVAS, R. *et al.* Prevalence of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase - and New Delhi metallo-beta-lactamase-positive *K. pneumoniae* in Sergipe, Brazil, and combination therapy as a potential treatment option. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 53, p. 1–8, 2020.
- 165 FIRMO, E. F. *et al.* Association of *bla*NDM-1 with *bla*KPC-2 and aminoglycoside-modifying enzyme genes among *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Serratia marcescens* clinical isolates in Brazil. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 21, p. 255–261, 2020.
- 166 DE OLIVEIRA, É. M. *et al.* High plasmid variability, and the presence of IncFIB, IncQ, IncA/C, IncHI1B, and IncL/M in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* with *bla* KPC and *bla* NDM from patients at a public hospital in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 53, p. 1–8, 2020.
- 167 GRUBER, T. M. *et al.* Pathogenicity of pan-drug-resistant *Serratia marcescens* harbouring *bla*NDM-1. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 4, p. 1026–1030, 2015.
- 168 VILLA, L. *et al.* IncA/C Plasmid carrying *bla*NDM-1, *bla*CMY-16, and *fosA3* in a *Salmonella enterica* Serovar Corvallis strain isolated from a migratory wild bird in Germany. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 10, p. 6597, 2015.
- 169 MOLNÁR, S. *et al.* Dissemination of NDM-1 carbapenemase-producer *Providencia stuartii* strains in Romanian hospitals: a multicentre study. **Journal of Hospital Infection**, v. 103, n. 2, p. 165–169, 2019.
- 170 SOLGI, H. *et al.* Emergence of carbapenem resistant *Escherichia coli* isolates producing *bla*NDM and *bla*OXA-48-like carried on IncA/C and IncL/M plasmids at two Iranian university hospitals. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 55, p. 318–323, 2017. DOI: 10.1016/j.meegid.2017.10.003.
- 171 QAMAR, M. U. *et al.* Clonal relatedness and plasmid profiling of extensively drug-resistant New Delhi metallo-β-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. **Future Microbiology**, v. 16, n. 4, p. 229–239, 2021.

- 172 GOMEZ-SIMMONDS, A. *et al.* Population structure of blaKPC-harbouring IncN plasmids at a New York City medical centre and evidence for multi-species horizontal transmission. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 77, n. 7, p. 1873–1882, 2022.
- 173 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. 598, p. 910–915, 2017. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.03.207.
- 174 PÉREZ-CHAPARRO, P. J. *et al.* Complete nucleotide sequences of two blaKPC-2-bearing IncN Plasmids isolated from sequence type 442 Klebsiella pneumoniae clinical strains four years apart. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 5, p. 2958–2960, 2014.
- 175 CARATTOLI, A. *et al.* Complete nucleotide sequence of the IncN plasmid pKOX105 encoding VIM-1, QnrS1 and SHV-12 proteins in Enterobacteriaceae from Bolzano, Italy compared with IncN plasmids encoding KPC enzymes in the USA. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 10, p. 2070–2075, 2010.
- 176 WEINGARTEN, R. A. *et al.* Genomic analysis of hospital plumbing reveals diverse reservoir of bacterial plasmids conferring carbapenem resistance. **mBio**, v. 9, n. 1, 2018. DOI: 10.1128/mBio.02011-17.
- 177 SCHWEIZER, C. *et al.* Plasmid-mediated transmission of KPC-2 carbapenemase in Enterobacteriaceae in critically ill patients. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. Feb., p. 276, 2019.
- 178 YAO, Y. *et al.* Complete nucleotide sequence of a Citrobacter freundii plasmid carrying KPC-2 in a unique genetic environment. **Genome Announcements**, v. 2, n. 6, 2014. DOI: 10.1128/genomeA.01157-14
- 179 BITAR, I. *et al.* Interplay among IncA and blaKPC-Carrying Plasmids in Citrobacter freundii. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, n. 5, 2019. DOI: 10.1128/AAC.02609-18.
- 180 HORNE, T.; ORR, V. T.; HALL, J. P. How do interactions between mobile genetic elements affect horizontal gene transfer? **Current Opinion in Microbiology**, v. 73, p. 102282, 2023.
- 181 GAMA, J. A.; ZILHÃO, R.; DIONISIO, F. Plasmid interactions can improve plasmid persistence in bacterial populations. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 2033, 2020.
- 182 GUGLIELMINI, J.; VAN MELDEREN, L. Bacterial toxin-antitoxin systems. **Mobile Genetic Elements**, v. 1, n. 4, p. 283–306, 2011.
- 183 LEPLAE, R. *et al.* Diversity of bacterial type II toxin-antitoxin systems: a comprehensive search and functional analysis of novel families. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. 13, p. 5513–5525, 2011.
- 184 ANANTHARAMAN, V. & ARAVIND, L. New connections in the prokaryotic toxin-antitoxin network: relationship with the eukaryotic nonsense-mediated RNA decay system. **Genome Biology**, v. 4, n. 12, 2003. DOI: 10.1186/gb-2003-4-12-r81.