

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA (FISIOPATOLOGIA
E TOXICOLOGIA)
ÁREA DE ANÁLISES CLÍNICAS

Aline Valério de Lima

Novas variantes de KPC em isolados do Complexo *Klebsiella pneumoniae*
resistentes à ceftazidima-avibactam

São Paulo

2023

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA (FISIOPATOLOGIA
E TOXICOLOGIA)
ÁREA DE ANÁLISES CLÍNICAS

Aline Valério de Lima

Novas variantes de KPC em isolados do Complexo *Klebsiella pneumoniae*
resistentes à ceftazidima-avibactam

Versão Original

Tese apresentada para obtenção do título de doutora; Faculdade
de Ciências Farmacêuticas; área de Análises Clínicas

Orientador: Prof. Dr. Jorge Luiz Mello Sampaio

São Paulo

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.

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha Catalográfica elaborada eletronicamente pelo autor, utilizando o programa desenvolvido pela Seção Técnica de Informática do ICMC/USP e adaptado para a Divisão de Biblioteca e Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Bibliotecária responsável pela orientação de catalogação da publicação:
Marlene Aparecida Vieira - CRB - 8/5562

L732n	Lima, Aline Valério de Novas variantes de KPC em isolados do Complexo Klebsiella pneumoniae resistentes à ceftazidima- avibactam / Aline Valério de Lima. - São Paulo, 2023. 101 p.
	Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas - Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia). Orientador: Sampaio, Jorge Luiz Mello
	1. Klebsiella pneumoniae. 2. resistência antimicrobiana. 3. ceftazidima-avibactam. 4. variantes de KPC. I. T. II. Sampaio, Jorge Luiz Mello, orientador.

Aline Valério de Lima

Novas variantes de KPC em isolados do Complexo *Klebsiella pneumoniae* resistentes à ceftazidima-avibactam; Tese para obtenção do título de doutora; Faculdade de Ciências Farmacêuticas; área de Análises Clínicas

Comissão Julgadora

Prof. Dr. Jorge Luiz Mello Sampaio
orientador/presidente

1o. examinador

2o. examinador

3o. examinador

4o. examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2024.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me guiar e sustentar em todo o tempo.

Ao meu noivo Antonio, pelo amor, companheirismo e incentivo.

Ao meu pai, Moisés, madrasta, Ana, e irmão Lucas, por sempre estarem comigo e me apoiarem em cada decisão.

Ao meu irmão Weslei e cunhada Mayla, pelo companheirismo e conselhos.

A minha irmã, Suzane, cunhado, Alberis, e sobrinhos, Kauê, Sophia e Marina, por todos os momentos de alegria que passamos em família.

As minhas amigas Marcelle, Rafaela e Carol, pelas inúmeras conversas, desabafos e palavras de incentivo.

À Suely e Darlan, professores e amigos queridos que me introduziram na carreira acadêmica e participaram da minha formação.

À técnica Fabiana e mestranda Keila, pela amizade, companheirismo e auxílio em cada etapa da realização desse projeto.

À minha querida professora Elisabete que, mesmo no momento mais difícil da sua vida, nunca deixou de me dar um conselho, palavras de incentivo e de se alegrar com as minhas conquistas. Sua força e fé me inspiram.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jorge Luiz Mello Sampaio. Palavras não serão suficientes para expressar o quanto sou grata pela oportunidade de ser orientada por um professor tão incrível. Tive o privilégio de ter ao meu lado um amigo, conselheiro, incentivador e uma pessoa que não mede esforços para dar o seu melhor sempre.

Instituto Fleury: Projeto NP 554.

CNPq: Processo: 465718/2014-0.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

“Mera mudança não é crescimento. Crescimento é a síntese de mudança e continuidade, e onde não há continuidade não há crescimento.”

C. S. Lewis

RESUMO

LIMA, A.V. Novas variantes de KPC em isolados do Complexo *Klebsiella pneumoniae* resistentes à ceftazidima-avibactam. 2023. 101f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

O Complexo *K. pneumoniae* (C-Kp) é o principal grupo de bacilos Gram-negativos responsáveis por infecções nosocomiais graves em todo o mundo e o tratamento empírico dessas infecções usualmente inclui os carbapenêmicos. O principal mecanismo de resistência a essa classe de antimicrobianos é a expressão de carbapenemases, e no Brasil, mais frequentemente as do tipo KPC. Em março de 2019 a ceftazidima-avibactam foi disponibilizada para uso clínico no Brasil, sendo amplamente utilizada no tratamento de infecções causadas por bacilos gram-negativos produtores de KPC. Diversos países já relataram a presença de *K. pneumoniae* produtores de KPC resistentes à ceftazidima-avibactam. No entanto, há poucos relatos dessa ocorrência no Brasil. O objetivo deste trabalho foi caracterizar genotipicamente e fenotipicamente isolados do C-Kp produtores de KPC, resistentes à ceftazidima-avibactam. No período de julho/2019 a julho/2021, 46 isolados do C-Kp, um por paciente, foram detectados em diferentes sítios de infecção ou culturas de vigilância de pacientes internados em hospitais privados de seis estados brasileiros. Os isolados tiveram seu genoma completo sequenciado nas plataformas MiSeq e MinION para determinação da variante alélica de *bla*_{KPC} e avaliação do seu contexto genético. As taxas de resistência ao ertapenem e à ceftazidima-avibactam foram calculadas a partir de banco de dados. A clonalidade dos isolados foi avaliada por PFGE e MLST. A localização plasmidial do gene *bla*_{KPC} foi confirmada por conjugação e/ou transformação. A concentração inibitória mínima (CIM) para betalactâmicos foi determinada por microdiluição em caldo segundo o BrCAST. Ensaios imunocromatográficos, NG-Test CARBA-5 e O.K.N.V.I. RESIST-5, foram avaliados quanto à sua performance na detecção de variantes KPC. A taxa de resistência ao ertapenem entre isolados do C-Kp aumentou 15,6% em 2019 para 27,3% em 2021. A taxa de resistência à ceftazidima-avibactam entre isolados do C-Kp resistentes ao ertapenem aumentou de 4,2% em 2019 para 17,2% em 2021. Onze isolados apresentaram novas variantes de KPC designadas KPC-103 a KPC-108 e KPC-139 a KPC-143. Os demais isolados apresentavam variantes de KPC já descritas, sendo a KPC-33 a variante mais frequente (36%). Quinze grupos clonais foram identificados, sendo que a maioria dos isolados pertencia ao ST11. O grupo clonal A foi o mais numeroso e pertencia ao ST258. A principal variante detectada nesse grupo foi a KPC-33. Diferentes grupos de incompatibilidade foram identificados em plasmídeos albergando *bla*_{KPC}, sendo os grupos IncN (n=12) e IncF, com replicons FII(K)-FIB (n=11), os grupos mais frequentes, seguido de IncX3-IncU (n=9) e IncQ1 (n=1). Dos 46 isolados resistentes à ceftazidima-avibactam, 36 foram capazes de transferir o gene *bla*_{KPC} para cepas receptoras. A maioria dos isolados foi sensível dose padrão ou sensível aumentado exposição ao meropenem e apresentaram redução significativa da CIM quando o avibactam foi adicionado ao aztreonam. O NG-Test CARBA-5 detectou 12 das 24 variantes testadas enquanto que o O.K.N.V.I. RESIST-5 detectou apenas nove variantes. A grande diversidade de variantes KPC, e a predominância do grupo clonal ST11, e da KPC-33 retratam um cenário preocupante no Brasil.

Palavras-chaves: *Klebsiella pneumoniae*, resistência antimicrobiana, ceftazidima-avibactam, variantes de KPC.

ABSTRACT

LIMA, A.V. New KPC variants in ceftazidime-avibactam-resistant *K. pneumoniae* Complex isolates. 2023. 101f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

The *K. pneumoniae* Complex (*C-Kp*) is the main group of gram-negative bacilli responsible for serious nosocomial infections worldwide and the empirical treatment of these infections usually includes carbapenems. The main mechanism of resistance to this class of antimicrobials is the expression of carbapenemases, and in Brazil, more frequently the KPC type. In March 2019, ceftazidime-avibactam was available for clinical use in Brazil, being widely used to treat infections caused by KPC-producing gram-negative bacilli. Several countries have already reported the presence of KPC-producing *K. pneumoniae* resistant to ceftazidime-avibactam; however, there are few reports of this occurrence in Brazil. This work aimed to genotypically and phenotypically characterize KPC-producing *C-Kp* isolates resistant to ceftazidime-avibactam. From July 2019 to July 2021, 46 *C-Kp* isolates, one per patient, were detected in different sites of infection or surveillance cultures from patients admitted to private hospitals in six Brazilian states. The isolates had their complete genome sequenced on the MiSeq and MinION platforms to determine the allelic variant of *bla*_{KPC} and evaluate its genetic context. Resistance rates to ertapenem and ceftazidime-avibactam were calculated from a database. The clonality of the isolates was evaluated by PFGE and MLST. The plasmid location of the *bla*_{KPC} gene was confirmed by conjugation and/or transformation. The minimal inhibitory concentrations for beta-lactams were determined by broth microdilution according to BrCAST. Immunochromatographic assays, NG-Test CARBA-5 and O.K.N.V.I. RESIST-5, were evaluated for its performance in detecting KPC variants. The resistance rate to ertapenem among *C-Kp* isolates increased from 15.6% in 2019 to 27.3% in 2021. The resistance rate to ceftazidime-avibactam among ertapenem-resistant *C-Kp* isolates increased from 4.2% in 2019 to 17.2% in 2021. Eleven isolates showed new KPC variants designated KPC-103 to KPC-108 and KPC-139 to KPC-143. The remaining isolates presented previously described KPC variants, with KPC-33 being the most common variant (36%). Fifteen clonal groups were identified, with most isolates belonging to ST11. Different incompatibility groups were identified in plasmids harboring *bla*_{KPC}, with the IncN (n=12) and IncF groups, with FII(K)-FIB(n=11) replicons, being the most frequent groups, followed by IncX3-IncU (n= 9) and IncQ1 (n=1). All IncX3-IncU plasmids were approximately 46 kb in size and were identified among isolates belonging to the largest identified clonal group (A) and ST258. The main variant detected in this group was KPC-33. Of the 46 ceftazidime-avibactam-resistant isolates, 36 were able to transfer the *bla*_{KPC} gene to recipient strains. Most isolates were susceptible standard dose or susceptible increased exposure to meropenem and showed a significant decrease in MIC when avibactam was added to aztreonam. The NG-Test CARBA-5 was able to detect 12 of the 24 variants evaluated while the O.K.N.V.I. RESIST-5 detected only nine variants. The great diversity of KPC variants, the predominance of the ST11 clonal group, and KPC-33 portray a worrying scenario in Brazil.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, antimicrobial resistance, ceftazidime-avibactam, KPC variants.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Estrutura química de betalactâmicos	15
Figura 2- Classificação molecular e funcional das principais betalactamases de bacilos gram-negativos	17
Figura 3- Variação estrutural em isoformas publicadas do Tn4401	18
Figura 4- Carbapenemases em Enterobacterales não sensíveis ao meropenem coletados globalmente e em diferentes regiões em 2018 e 2019	20
Figura 5- Estrutura química da ceftazidima e do avibactam	24
Figura 6- Percentual de variantes KPC identificadas entre isolados do Complexo K. pneumoniae resistentes à ceftazidima-avibactam.....	49
Figura 7- Eletroferograma do sequenciamento dos produtos da PCR do gene <i>bla</i> _{KPC} do isolado N4214030	50
Figura 8- Alinhamento das sequências de aminoácidos de KPC-2 com as novas variantes de KPC identificadas neste estudo	52
Figura 9- Contexto genético de <i>bla</i> _{KPC} associados a plasmídeos IncX3-IncU	56
Figura 10- Comparação de plasmídeos IncX3-IncU identificados neste estudo com o plasmídeo p1194_3 (CP089430.1)	57
Figura 11- Alinhamento de sequências nucleotídicas do Tn4401 de plasmídeos IncF com as isoformas a e b do Tn4401	58
Figura 12- Comparação de plasmídeos IncF identificados neste estudo e plasmídeo CP02158.1 com o plasmídeo IncF albergando <i>bla</i> _{KPC-139}	59
Figura 13- Comparação do plasmídeo IncF albergando <i>bla</i> _{KPC-106} com o plasmídeo p51015_CTX_M_15 (CP050379.1).....	60
Figura 14- Comparação de plasmídeos IncN (~50 kb) identificados neste estudo com o plasmídeo pKp314/11a (KX276209.1)	62
Figura 15- Comparação de plasmídeos IncN (~85 kb) identificados neste estudo com o plasmídeo pIncN (CP018887.1)	63
Figura 16- Plasmídeo IncN do isolado M5191546 albergando duas cópias de <i>bla</i> _{KPC-8} associadas ao Tn4401b	64
Figura 17- Alinhamento de sequências nucleotídicas do Tn4401 de plasmídeos IncN com as isoformas a e b do Tn4401.....	65
Figura 18- Perfil clonal dos isolados de <i>K. pneumoniae</i> e <i>K. quasipneumoniae</i> produtores KPC obtido por PFGE	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estudos publicados de variantes KPC implicadas em resistência à ceftazidima-avibactam.....	29
Tabela 2- Critérios para categorização de classes de carbapememases e isolados do Complexo K. pneumoniae resistentes à ceftazidima-avibactam.....	34
Tabela 3-Iniciadores utilizados para sequenciamento de bla _{KPC}	36
Tabela 4- Taxas de resistência ao ertapenem e à ceftazidima-avibactam e fenótipos de resistência em isolados do Complexo K. pneumoniae no período de Julho de 2019 a Julho de 2021	45
Tabela 5- Variantes KPC relacionadas com a resistência à ceftazidima-avibactam entre isolados do Complexo K. pneumoniae identificadas neste estudo	47
Tabela 6- Novas variantes de KPC identificadas neste estudo	51
Tabela 7- Características dos plasmídeos com bla _{KPC} detectados neste estudo e grupos clonais dos isolados que os albergam	54
Tabela 8- Concentrações inibitórias mínimas de Enterobacterales e variantes KPC de cepas do tipo selvagem, transconjugantes ou transformantes e cepas receptoras	70
Tabela 9- Variações observadas nas porinas de OmpK35 e OmpK36 de isolados de K. pneumoniae resistentes à ceftazidima-avibactam.....	74
Tabela 10- Performance dos testes imunocromatográficos NG-Test CARBA-5 e O.K.N.V.I. RESIST-5 na detecção de variantes KPC relacionadas com a resistência à ceftazidima-avibactam.....	76

SUMÁRIO

1 MOTIVAÇÃO	13
2 INTRODUÇÃO	14
2.1 RESISTÊNCIA AOS CARBEPENÊMICOS EM <i>Enterobacterales</i>	14
2.1.1 Mecanismo de resistência aos carbapenêmicos em <i>Enterobacterales</i> ..16	
2.1.1.1 Disseminação dos genes <i>bla</i> _{KPC} no mundo.....	19
2.1.1.2 Disseminação do gene <i>bla</i> _{KPC} no Brasil	20
2.2 DETECÇÃO DE ESPÉCIES DO COMPLEXO <i>Klebsiella pneumoniae</i>	21
2.3 DESCOBERTA E DESENVOLVIMENTO DE NOVOS ANTIMICROBIANOS	22
2.4 CEFTAZIDIMA-AVIBACTAM.....	23
2.4.1 Resistência à ceftazidima-avibactam	25
2.4.1.1 Vigilância global da resistência à ceftazidima-avibactam.....	25
2.4.1.2 Mecanismos de resistência à ceftazidima-avibactam	26
2.5 VARIANTES KPC RELACIONADAS COM A RESISTÊNCIA À CEFTAZIDIMA-AVIBACTAM.....	27
2.6 ENSAIOS IMUNOCROMATOCRÁFICOS DE FLUXO LATERAL NA DETECÇÃO DE VARIANTES DE KPC QUE CONFEREM RESISTÊNCIA À CEFTAZIDIMA-AVIBACTAM	31
3 OBJETIVOS	32
3.1 OBJETIVO GERAL	32
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
4 MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1 ANÁLISE RETROSPECTIVA PARA DETERMINAÇÃO DA TAXA DE RESISTÊNCIA A CEFTAZIDIMA-AVIBACTAM.....	33
4.2 ISOLADOS BACTERIANOS	34
4.3 TESTE FENOTÍPICO BLUE-CARBA.....	35
4.4 ISOLADOS DE <i>K. pneumoniae</i> SEM SEQUENCIAMENTO NGS	35
4.4.1 Detecção e sequenciamento de variantes <i>bla</i>_{KPC}	35
4.4.2 Identificação das espécies do complexo <i>K. pneumoniae</i>	36
4.4.3 PCR multiplex para genes de carbapenemases	36

4.5 SEQUENCIAMENTO COMPLETO DO GENOMA DE ISOLADOS RESISTENTES À CEFTAZIDIMA-AVIBACTAM.....	37
4.5.1 Sequenciamento na plataforma MiSeq - Illumina	37
4.5.1.1 Montagem de genomas, análise dos genes <i>bla_{KPC}</i> , determinação do ST e avaliação das sequências de aminoácidos de OmpK35 e OmpK36	38
4.5.2 Plataforma Nanopore - MinION	38
4.5.2.1 Montagem híbrida do genoma e análise dos plasmídeos	39
4.6 PERFIL CLONAL POR ELETROFORESE EM CAMPOS PULSADOS (PFGE) .	39
4.7 ENSAIOS DE CONJUGAÇÃO.....	40
4.8 ENSAIO DE TRANSFORMAÇÃO.....	41
4.8.1 Extração de DNA plasmidial por Birnboim	41
4.8.2 Preparo de células eletrocompetentes	42
4.8.3 Transformação em <i>Escherichia coli</i> TOP10	42
4.9 PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS BETALACTÂMICOS.....	42
4.10 PCR PARA DETECÇÃO DE GENES DE ESBL NOS TRANSCONJUGANTES ALBERGANDO NOVAS VARIANTES DE KPC IDENTIFICADAS NESTE ESTUDO	43
4.11 DESEMPENHO DE TESTES IMUNOCROMATOGRÁFICOS NA DETECÇÃO DE VARIANTES KPC	43
5 RESULTADOS	44
5.1 TAXAS DE RESISTÊNCIA AO ERTAPENEM, CEFTAZIDIMA-AVIBACTAM E FREQUÊNCIA DE CLASSES DE CARBAPENEMASES EM ISOLADOS DO COMPLEXO <i>K. pneumoniae</i>	44
5.2 AVALIAÇÃO DA PUREZA E TESTE BLUE-CARBA.....	46
5.3 ISOLADOS DE <i>K. pneumoniae</i> SENSÍVEIS À CEFTAZIDIMA-AVIBACTAM	46
5.4 ISOLADOS DO COMPLEXO <i>K. pneumoniae</i> RESISTENTES À CEFTAZIDIMA-AVIBACTAM	46
5.4.1 Identificação das espécies e frequência de variantes de KPC	46
5.4.2 Identificação de novas variantes KPC	50
5.4.3 Avaliação da presença de outros genes de betalactamases entre isolados resistentes à ceftazidima-avibactam com sequenciamento NGS	53
5.4.4 Análise dos plasmídeos que albergam variantes <i>bla_{KPC}</i>	53
5.4.4.1 Grupos de Incompatibilidade.....	53
5.4.4.2 Contexto genético de <i>bla_{KPC}</i> associados a plasmídeos IncX3-IncU	56
5.4.4.3 Contexto genético de <i>bla_{KPC}</i> associados a plasmídeos IncF	58
5.4.4.4 Contexto genético de <i>bla_{KPC}</i> associados a plasmídeos IncN.....	61

5.5 ANÁLISE DO PERFIL CLONAL DOS ISOLADOS DO COMPLEXO <i>K. pneumoniae</i> POR PFGE E MLST	66
5.6 OBTENÇÃO DE TRANSCONJUGANTES OU TRANSFORMANTES DOS ISOLADOS DO COMPLEXO <i>K. pneumoniae</i> RESISTENTES À CEFTAZIDIMA-AVIBACTAM	68
5.6.1 PCR para detecção de genes de ESBL nos transconjugantes albergando novas variantes KPC	68
5.7 PERFIL DE SENSIBILIDADE DOS ISOLADOS SELVAGENS E SEUS TRANSCONJUGANTES OU TRANSFORMANTES E TESTE BLUE-CARBA	69
5.8 AVALIAÇÃO DE MUTAÇÕES EM GENES DE PORINAS Ompk35 E Ompk36 DE ISOLADOS DE <i>K. pneumoniae</i> RESISTENTES À CEFTAZIDIMA-AVIBACTAM	74
5.9 PERFORMANCE DE TESTES IMUNOCROMATOGRÁFICOS NA DETECÇÃO DE VARIANTES KPC QUE CONFEREM FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA À CEFTAZIDIMA-AVIBACTAM	75
6 DISCUSSÃO	77
7 CONCLUSÕES	85
REFERÊNCIAS	86
ANEXO 1 – PRIMERS E CONDIÇÕES DA PCR PARA DETECÇÃO DE GENES DE ESBL NOS TRANSCONJUGANTES ALBERGANDO NOVAS VARIANTES KPC	99
ANEXO 2- CARACTERÍSTICAS DOS PLASMÍDEOS COM <i>bla</i>_{KPC} DETECTADOS NESTE ESTUDO E GRUPOS CLONAIIS POR PFGE E MLST DOS ISOLADOS QUE OS ALBERGAM	100

1 MOTIVAÇÃO

O Complexo *Klebsiella pneumoniae* é um dos principais responsáveis por infecções nosocomiais graves em todo o mundo e o tratamento empírico dessas infecções usualmente inclui os carbapenêmicos. O principal mecanismo de resistência a essa classe de antimicrobianos, nesse grupo de bactérias, é a expressão de carbapenemases, e no Brasil, mais frequentemente as do tipo *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC). Em março de 2019 foi aprovada para uso clínico no Brasil a combinação de ceftazidima com um novo inibidor de betalactamase, avibactam. Este composto tem sido utilizado com sucesso no tratamento de infecções causadas por bacilos gram-negativos produtores de KPC. A combinação ceftazidima-avibactam representa uma ferramenta terapêutica de extrema importância, pois tem sido utilizada no lugar das polimixinas, que são nefrotóxicas, têm resposta clínica pouco satisfatória e eram a principal classe de antimicrobiano utilizada no tratamento das infecções causadas por cepas produtoras de KPC.

Decorridos apenas três meses desde o início do uso clínico da ceftazidima-avibactam no Brasil, nosso grupo de pesquisa detectou dois isolados de *K. pneumoniae* produtores de variantes KPC com altos níveis de resistência à ceftazidima-avibactam em dois estados diferentes do Brasil (São Paulo e Rio Grande do Sul), em pacientes sem qualquer vínculo epidemiológico e que haviam sido tratados com ceftazidima-avibactam em função de infecção por cepa produtora de KPC e sensível à ceftazidima-avibactam. Naquele momento, não havia relatos no Brasil sobre a ocorrência dessa resistência, nem estudo recente avaliando a frequência dos diferentes alelos de *bla*_{KPC} no Brasil. Há, portanto, a necessidade de avaliarmos a diversidade de variantes de KPC presentes no Brasil, assim como caracterizar os elementos genéticos móveis que carregam os genes que codificam essas enzimas. Da mesma forma, é necessário avaliar o desempenho dos testes imunocromatográficos, utilizados cada vez mais frequentemente por laboratórios clínicos no Brasil para guiar o uso empírico de ceftazidima-avibactam, na detecção dessas variantes.

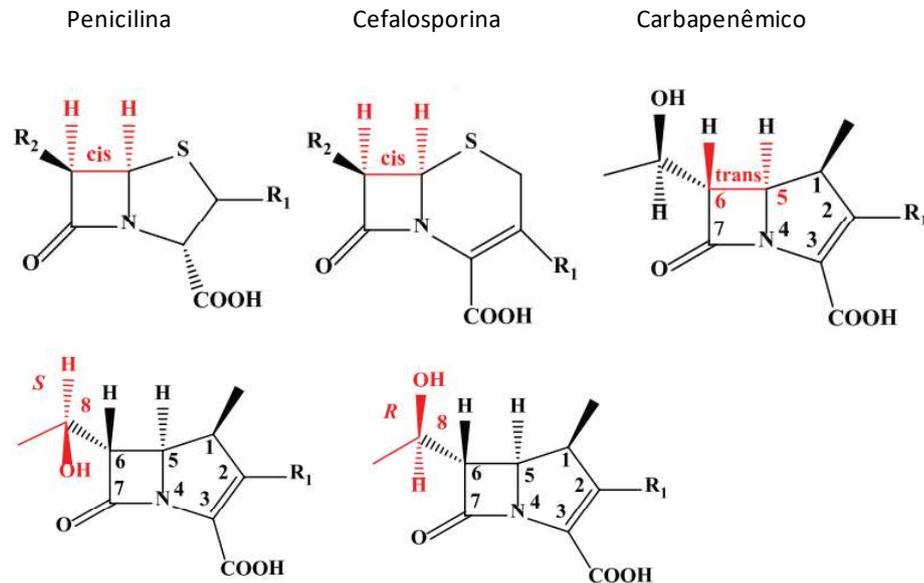
2 INTRODUÇÃO

2.1 RESISTÊNCIA AOS CARBEPENÊMICOS EM *Enterobacterales*

A ordem *Enterobacterales* compreende um grupo diverso de bacilos gram-negativos (BGN) anaeróbios facultativos, não esporulados, que pertencem à classe *Gammaproteobacteria* e são divididos em sete famílias: *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae*, *Pectobacteriaceae*, *Yersiniaceae*, *Hafniaceae*, *Morganellaceae* e *Budviciaceae*. Esse grupo de microrganismos é encontrado em nichos ecológicos diversos, como água e solo, nas plantas e no trato digestório de seres humanos e animais. Dentre estes, a família *Enterobacteriaceae* é a mais abundante e inclui uma grande variedade de bactérias patogênicas e/ou oportunistas, sendo *K. pneumoniae* a principal espécie relacionada com infecções graves e com altas taxas de resistência antimicrobiana (ADEOLU et al., 2016; SUNDARAMOORTHY et al., 2023).

Nas últimas décadas, houve um aumento na frequência de *Enterobacterales* resistentes a múltiplos antimicrobianos, favorecido pela pressão seletiva exercida pelo uso de antimicrobianos de amplo espectro no ambiente hospitalar, contribuindo para a falha terapêutica e aumento da mortalidade. Entre estes antimicrobianos, destacam-se os carbapenêmicos. Os carbapenêmicos são uma classe de betalactâmicos de amplo espectro cujo mecanismo de ação se baseia na ligação e inativação das proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs), proteínas que participam da formação do peptidoglicano da parede celular bacteriana, levando à lise e morte celular. Caracterizam-se pela presença, em sua estrutura química, do anel betalactâmico, responsável por sua ação antimicrobiana. Sua estrutura básica lembra a da penicilina, mas diferem das penicilinas pelo fato de que o enxofre é substituído por um carbono no anel insaturado de cinco membros (C1) (Figura 1). O carbono C1 desempenha um papel fundamental na potência e espectro dos carbapenêmicos, assim como sua estabilidade frente a grande parte das betalactamases. Os carbonos 5 e 6 em configuração trans também contribuem para a estabilidade frente à maioria das betalactamases e a configuração R no carbono 8 aumenta a potência do carbapenêmico (PAPP-WALLACE et al., 2011).

Figura 1- Estrutura química de betalactâmicos



Fonte: Reproduzido de Papp-Wallace et al. (2011)

Os carbapenêmicos são amplamente utilizados na prática clínica para o tratamento de infecções graves causadas por bacilos gram-negativos (TAMMA et al., 2023). *Enterobacterales* resistentes aos carbapenêmicos (ERCs) são comumente detectadas em infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) em todo o mundo, representando uma ameaça à saúde pública global. As taxas de mortalidade nas infecções causadas por esse grupo de microrganismos pode variar de 30 a 70%, sendo acima de 50% para pacientes com infecções de corrente sanguínea por isolados resistentes (WHO, 2017b).

Em 2017, a Organização Mundial da Saúde (OMS) divulgou uma lista de patógenos prioritários para a pesquisa e desenvolvimento de novos antimicrobianos, onde as ERCs foram consideradas prioridade número 1 (crítico), juntamente com *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* resistentes aos carbapenêmicos. Em 2019, a resistência antimicrobiana foi considerada uma das dez principais ameaças à saúde global, sendo incluída em um plano estratégico de cinco anos da OMS – o “13th General Programme of Work”, com diversas iniciativas visando a promoção da saúde (WHO, 2017a;2020).

Em 2015, os estados membros da OMS aprovaram a criação de um Plano de Ação Global contra a resistência antimicrobiana e a criação de um sistema de vigilância (GLASS), contando com a participação de 126 países (WHO, 2022). Em 2018, o Ministério da Saúde, em parceria com a ANVISA e outros órgãos governamentais, elaborou um Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Saúde Única (PAN-BR), com o objetivo de garantir que se mantenha a capacidade de tratar e prevenir doenças infecciosas com medicamentos seguros e eficazes (BRASIL, 2019).

Em 2021, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), elaborou o Programa Nacional de Prevenção e Controle de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde, no intuito de definir metas e ações estratégicas nacionais para a prevenção e o controle das IRAS e da resistência antimicrobiana (RM) em serviços de saúde no período de 2021 a 2025 (ANVISA, 2021c).

2.1.1 Mecanismo de resistência aos carbapenêmicos em *Enterobacterales*

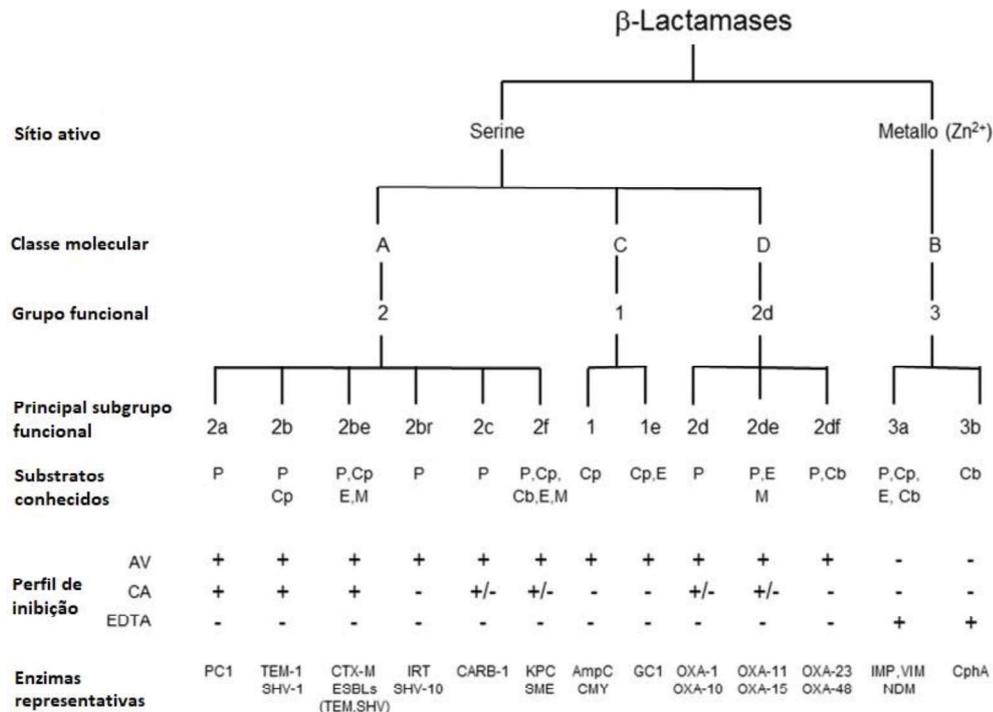
O principal mecanismo de resistência aos carbapenêmicos em *Enterobacterales* é a expressão de carbapenemases, que são betalactamases capazes de hidrolisar esta classe de antimicrobianos. Dentre as carbapenemases, as do tipo KPC são as mais frequentes em grande número de países (BRINK, 2019).

Há dois sistemas de classificação das betalactamases, que são baseadas nas características funcionais das enzimas ou em sua estrutura primária (Figura 2). A classificação estrutural, inicialmente proposta por Ambler (1980), baseia-se na sequência de aminoácidos e agrupa as betalactamases em enzimas que possuem um resíduo de serina em seu sítio ativo, em classes A, C e D. As metalobetalactamases (MBL) correspondem à classe B, e requerem pelo menos um átomo de zinco (Zn^{2+}) como cofator para a hidrólise do anel betalactâmico (AMBLER, 1980; BUSH; BRADFORD, 2020)

A classificação funcional, proposta por Bush (1989) e expandida em 1995 e 2010 por Bush e colaboradores leva em conta uma combinação de atributos bioquímicos, como perfis de substrato e inibidores, e atribuições de classes estruturais, agrupando as enzimas em grupos (1-4) e subgrupos (a-f). As enzimas com atividade de carbapenemases estão incluídas nas classes A, B e D de Ambler e dentro

dos subgrupos funcionais 2f, 2df, 3a e 3b de Bush e Jacoby (Figura 2) (BUSH; JACOBY, 2010; BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995).

Figura 2- Classificação molecular e funcional das principais betalactamases de bacilos gram-negativos



Legenda: AV: avibactam; CA: ácido clavulânico; Cb: carbapenêmico; Cp: cefalosporina; E: cefalosporina de espectro expandido; M: monobactam; P: penicilina

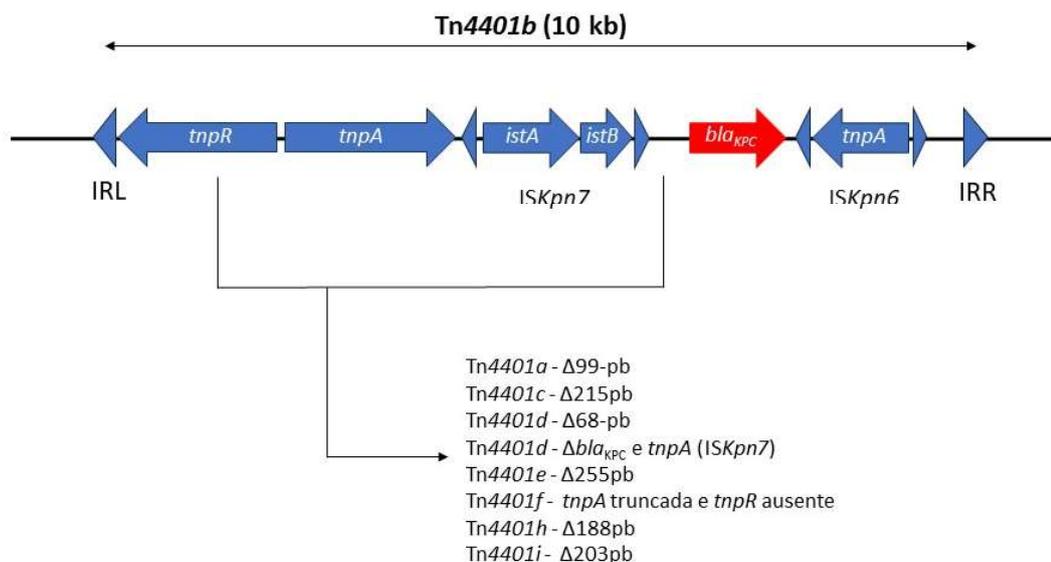
Fonte: adaptado de Bush (2018)

As enzimas do tipo KPC são carbapenemases da classe molecular A de Ambler e correspondem ao subgrupo funcional 2f de Bush e Jacoby. Possuem alto poder de hidrólise dos carbapenêmicos e cefalosporinas de amplo espectro, são em sua maioria inibidas pelo avibactam e são fracamente inibidas ou não inibidas por ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam (NAAS et al., 2017). Até o momento da elaboração deste texto, 192 variantes de KPC já foram identificadas (<http://bldb.eu/>). Um dos principais problemas relacionados à resistência antimicrobiana é o alto risco de transmissão de genes de resistência entre espécies, mediada por elementos genéticos móveis, como plasmídeos e os transpósons (WHO, 2017b). Os genes *bla*_{KPC} frequentemente se encontram localizados em plasmídeos conjugativos e associados à transpósons do tipo Tn4401, favorecendo sua rápida disseminação (LEE et al., 2016).

Um estudo bibliográfico avaliando artigos publicados entre o período de 2013 a 2018, relatando a resistência aos carbapenêmicos mediada por plasmídeos, evidenciou uma alta frequência dos genes *bla_{KPC}* (n=956, 73%). Os genes foram associados a vários grupos de plasmídeos, incluindo IncF (48%), IncN (24%), IncX (7%), A/C (7%) e L/M (3%) em diferentes gêneros e espécies de *Enterobacterales*. O tipo de plasmídeo predominante foi o IncF com replicons FIIK. Esse grupo de plasmídeos geralmente contém outros genes de resistência a antimicrobianos, como aminoglicosídeos, tetraciclina, quinolonas, trimetoprima e sulfonamidas (KOPOTSA; OSEI SEKYERE; MBELLE, 2019; LEE et al., 2016).

O transpósion Tn4401 tem um tamanho de aproximadamente 10 kb, e consiste nos seguintes genes: transposase (TnpA), resolvase (TnpR), *bla_{KPC}* e duas sequências de inserção (ISKpn6 e ISKpn7), além de duas repetições invertidas de 39pb em suas extremidades (Figura 3). Até o momento, 10 isoformas do Tn4401 já foram descritas (a-i), diferindo umas das outras por deleções de 68 a 255 pb, a montante no gene *bla_{KPC}*, em comparação com a isoforma b, que não apresenta deleção (Figura 3). As isoformas a e b são as mais disseminadas em todo o mundo (ARAUJO et al., 2018; CHERUVANKY et al., 2017).

Figura 3- Variação estrutural em isoformas publicadas do Tn4401



Fonte: Produzida pela autora.

O gene *bla_{KPC}* também pode ser encontrado em elementos genéticos móveis não-Tn4401 (NTE_{KPC}), que em sua maioria possuem genes *ISKpn6* parciais. De acordo com sua sequência de inserção à montante do gene *bla_{KPC}*, podem ser divididos em três grupos: grupo I: sem inserção; grupo II: inserção de *bla_{TEM}* truncado; grupo III: inserção de Tn 5563/IS6100 (LEE et al., 2016).

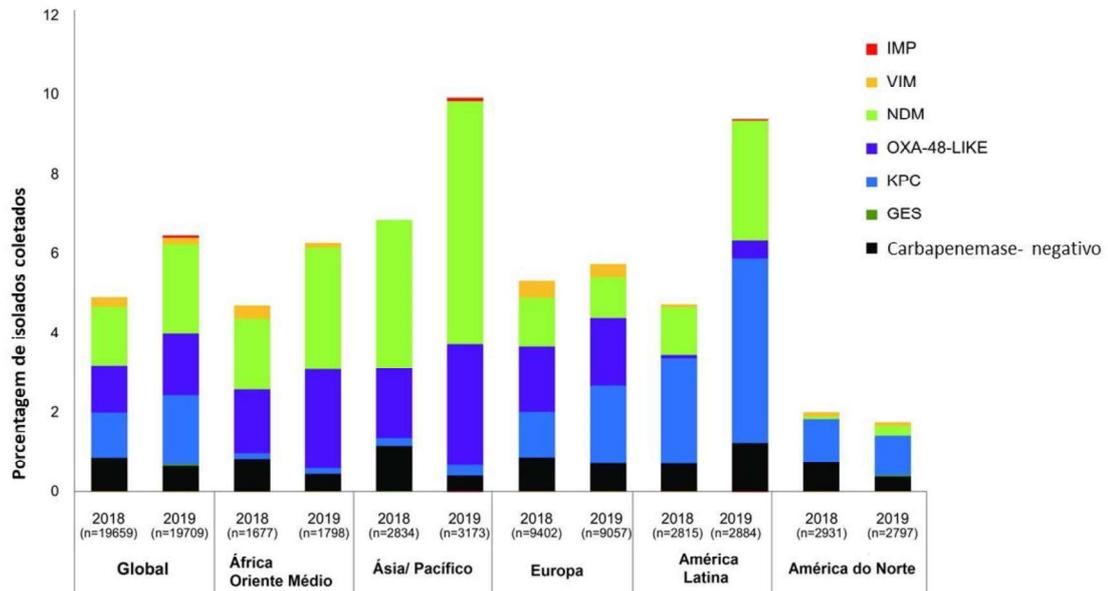
2.1.1.1 Disseminação dos genes *bla_{KPC}* no mundo

As enzimas do tipo KPC são as principais carbapenemases de classe A disseminadas na maioria dos países em todo o mundo (LEE et al., 2016; LOGAN; WEINSTEIN, 2017). Foi isolada pela primeira vez em 1996, a partir de *K. pneumoniae*, na Carolina do Norte, EUA (YIGIT et al., 2001).

A epidemiologia de *Enterobacterales* produtoras de KPC varia geograficamente. Um estudo avaliando a resistência ao meropenem em uma coleção global de 81.781 isolados de vigilância de *Enterobacterales*, coletados de pacientes em 39 países de 5 regiões geográficas, entre 2012 e 2017, demonstrou uma média de resistência de 3,3%, sendo que na América Latina a porcentagem foi de 5,3%. A resistência se deu em seu maior número por isolados de *Klebsiella pneumoniae* (76,7%). A maioria das *Enterobacterales* resistentes eram produtoras de carbapenemases do tipo KPC (47,4%) (KAZMIERCZAK et al., 2021).

Outro estudo avaliou a frequência de determinantes de resistência entre isolados de *Enterobacterales* não sensíveis ao meropenem (MEM-NS), coletados no período de 2018 a 2019, como parte do programa de Vigilância Global (ATLAS). Entre um total de 39.368 isolados, 5,7% destes eram resistentes ao meropenem. A maior taxa de resistência foi observada na Ásia/Pacífico (8,4%) e a menor na América do Norte (1,9%). Entre os isolados MEM-NS coletados, 71,5% pertenciam à espécie *K. pneumoniae*. Na América Latina, a taxa de resistência ao meropenem saltou de um percentual de 4,2% em 2018 para 8,1% em 2019 (Figura 4). O predomínio de mecanismos de resistência entre isolados MEM-NS variou por região, sendo a produção de KPC o mecanismo mais frequente na América Latina (51,9%) e América do Norte (53,6%) (ESTABROOK et al., 2023).

Figura 4- Carbapenemases em *Enterobacterales* não sensíveis ao meropenem coletados globalmente e em diferentes regiões em 2018 e 2019



Fonte: Adaptado de Estabrook et al. (2023)

A disseminação endêmica de *K. pneumoniae* produtora de KPC já foi relatada nos EUA, China, Itália, Polônia, Grécia, Israel, Brasil, Argentina, Colômbia e Taiwan, enquanto a propagação esporádica desses isolados foi observada em diversos países europeus, em países da região Ásia-Pacífico, incluindo Índia, Coreia do Sul e Austrália (LEE et al., 2016).

Os genes de carbapenemases costumam se disseminar ao redor do mundo a partir de clones dominantes em várias cepas patogênicas de sucesso. A disseminação global de *Enterobacterales* produtoras de KPC se dá em especial devido à expansão clonal de cepas de *K. pneumoniae* pertencentes ao complexo clonal 258 (CC258), sendo o tipo de sequência multilocus (ST) 258 o mais frequente (LOGAN; WEINSTEIN, 2017).

2.1.1.2 Disseminação do gene *bla*_{KPC} no Brasil

O primeiro relato de KPC no Brasil se deu em 2009, a partir de isolados de *K. pneumoniae* recuperados de quatro pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) de um hospital terciário localizado em Recife, no período de setembro a novembro de 2006 (MONTEIRO et al., 2009). Desde então, as enzimas do tipo KPC

têm sido detectadas em diversas regiões do Brasil, com predomínio de casos em *K. pneumoniae* (SAMPAIO; GALES, 2016).

As enzimas do tipo KPC são as principais carbapenemases detectadas em isolados de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos, sendo consideradas endêmicas no Brasil. Um estudo avaliando 3.085 isolados de *K. pneumoniae* recuperados de pacientes de 10 hospitais privados da Grande São Paulo, no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2015, evidenciou um importante aumento na taxa de resistência aos carbapenêmicos, de 6,8% em 2011 para 35,5% em 2015. A KPC-2 foi detectada em 96,2% dos isolados resistentes. Os isolados pertenciam ao CC258 (ST11 e ST437) (BARTOLLETTI et al., 2016).

Em 2010, um estudo semelhante, avaliando 113 isolados de *K. pneumoniae* produtoras de KPC foi conduzido a partir de 32 hospitais localizados em 12 estados brasileiros pertencentes às cinco diferentes regiões geográficas do Brasil. A disseminação do gene *bla_{KPC-2}* foi associada à dispersão de *Tn4401b*, em cepas com diferentes STs. A maioria dos isolados pertenciam ao CC258 (ST11, ST340 e ST437), carreando plasmídeos tipo IncN de 40 kb (PEREIRA et al., 2013). Estudos mais recentes também têm apontado a emergência de clone pertencente ao ST16, associado a altas taxas de mortalidade por infecção de corrente sanguínea (ANDREY et al., 2020).

Nos últimos anos a epidemiologia das carbapenemases no Brasil têm sofrido mudanças. Um estudo conduzido por Kiffer et al. (2023), avaliando a frequência de genes de carbapenemases em banco de dados de saúde pública no Brasil, no período de 2015 a 2022, evidenciou uma diminuição na detecção de *bla_{KPC}* de 74,5% em 2015 para 55,1% em 2022. Em contraste, houve um aumento da detecção de *bla_{NDM}*, de 4,1% em 2015 para 39,4% em 2022 (KIFFER et al., 2023).

2.2 DETECÇÃO DE ESPÉCIES DO COMPLEXO *Klebsiella pneumoniae*

Utilizando-se sequenciamento completo do genoma (WGS), foi verificado uma proporção substancial de isolados identificados como *K. pneumoniae* por ensaios bioquímicos ou proteômicos em laboratórios clínicos e de pesquisa, que compreendem espécies intimamente relacionadas. Essas espécies compartilham uma identidade média de nucleotídeos de 95-96% com a espécie *K. pneumoniae*. Não existe uma classificação taxonômica formal para esse grupo, contudo, são

comumente referidas na literatura como espécies do Complexo *Klebsiella pneumoniae*. Até o momento, esse grupo é composto por sete táxons distintos denominados: *K. pneumoniae (sensu stricto)* (Kp1), *K. quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* (Kp2), *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* (Kp4), *K. variicola* subsp. *variicola* (Kp3), *K. variicola* subsp. *tropica* (Kp5), *K. quasivariicola* (Kp6) e *K. africana* (Kp7). A maioria das infecções provocadas por bactérias desse complexo é causada pela espécie *K. pneumoniae* (~85%). As manifestações clínicas mais comuns incluem pneumonias e infecções do trato urinário e de feridas cirúrgicas, podendo progredir para bacteremia. Contudo, as espécies *K. variicola* e *K. quasipneumoniae* são consideradas patógenos humanos emergentes (MCDOUGALL et al., 2021; WYRES; LAM; HOLT, 2020).

As espécies do Complexo *K. pneumoniae* são intrinsicamente resistentes à ampicilina devido à expressão de genes de betalactamase (*bla*) de origem cromossômica. Esses genes variam de acordo com o filogrupo: Kp1, Kp2, Kp3 e Kp4, e abrigam os genes de betalactamase, *bla_{SHV}*, *bla_{OKP-A}*, *bla_{LEN}* e *bla_{OKP-B}*, respectivamente. O gene *bla_{SHV}* foi associado diversas vezes à sequência de inserção IS26, o que permitiu sua disseminação para outras espécies por meio da transferência horizontal mediada por plasmídeos. As variantes móveis de *bla_{SHV}* normalmente apresentam mutações pontuais que resultam em atividade de ESBL (WYRES et al., 2020).

Devido à dificuldade de diferenciação das espécies por testes fenotípicos, Fonseca et al (2017), propuseram uma PCR multiplex para a diferenciação das principais espécies desse complexo. Para isso, foram desenhados iniciadores para cada gene *bla* cromossômico correspondente: *bla_{SHV}*, *bla_{LEN}* e *bla_{OKP-A/B}* e para o gene cromossômico que os flanqueia (*deoR*), evitando a detecção de alelos *bla_{SHV}* localizados em plasmídeos. Esse ensaio tem sido uma alternativa a outros métodos moleculares, como o sequenciamento completo do genoma ou sequenciamento de genes de marcadores taxonômicos, como *rpoB*, que são testes mais onerosos.

2.3 DESCOBERTA E DESENVOLVIMENTO DE NOVOS ANTIMICROBIANOS

Com a disseminação de cepas produtoras de carbapenemases, houve uma crescente demanda pela descoberta e desenvolvimento de novos antimicrobianos, uma vez que os fármacos de escolha utilizados para o tratamento das infecções

causadas por esses isolados, como as polimixinas e aminoglicosídeos, são nefrotóxicos, têm eficácia clínica limitada e/ou ocorre emergência de resistência durante o tratamento (SHIELDS et al., 2017).

Em 9 de julho de 2012, foi apresentado nos Estados Unidos a S.3187- *Food and Drug Administration Safety and Innovation Act (FDASIA)*, Título VIII: *Generating Antibiotic Incentives Now (GAIN)*, que dispõe sobre o incentivo para o desenvolvimento de novos antimicrobianos frente à crescente ameaça de resistência antimicrobiana e a falta de opções terapêuticas. Em resposta à Lei GAIN, em setembro de 2012, o *Food and Drug Administration (FDA)*, anunciou uma força-tarefa com um grupo multidisciplinar de 19 cientistas e clínicos do *Center for Drug Evaluation and Research (CDER)* para estabelecer parcerias e colaborações no intuito de identificar áreas prioritárias e auxiliar no desenvolvimento de novos antimicrobianos (FDASIA, 2012).

Novos inibidores de betalactamases foram desenvolvidos e associados a carbapenêmicos ou cefalosporinas para o tratamento de isolados resistentes, representando uma alternativa de tratamento antimicrobiano satisfatório. Alguns antimicrobianos foram aprovados pelo FDA, como a ceftalozana-tazobactam; meropenem-vaborbactam e a ceftazidima-avibactam. A ceftazidima-avibactam foi aprovada em fevereiro de 2015 pelo FDA e em junho de 2018 pela ANVISA estando disponível para uso clínico, no Brasil, apenas em março de 2019 (CDER, 2016; DOU, 2018).

2.4 CEFTAZIDIMA-AVIBACTAM

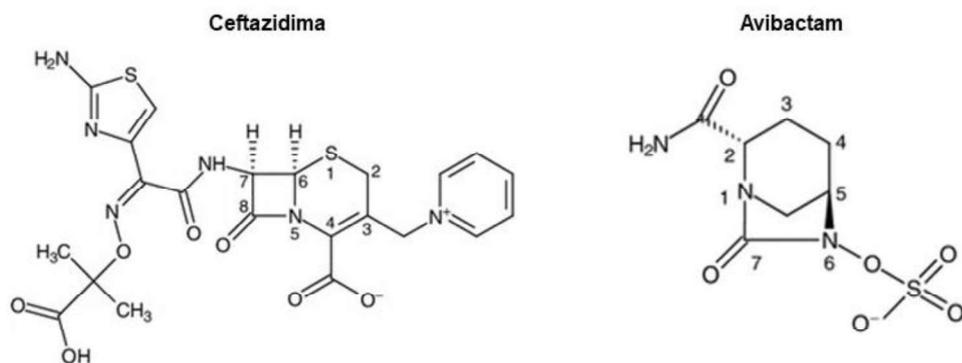
O composto ceftazidima-avibactam é uma combinação para uso intravenoso, de uma cefalosporina de terceira geração, ceftazidima, e do inibidor de betalactamases, avibactam. Possui excelente atividade “in vitro” contra muitos patógenos gram-negativos clinicamente relevantes, incluindo *Enterobacterales* produtoras de betalactamases das classes A e C de Ambler e algumas enzimas da classe D, incluindo OXA-48 e suas variantes; contudo, não tem atividade contra betalactamases de classe B (MBL), que possuem íons zinco (Zn^{+2}) no seu sítio ativo (LIVERMORE et al., 2018). Esse composto tem sido utilizado com sucesso no tratamento da maioria das infecções causadas por bacilos gram-negativos produtores de KPC. É indicado para o tratamento de infecções intra-abdominais complicadas

(IIAc), em combinação com metronidazol, infecções complicadas do trato urinário (ITUc), incluindo pielonefrite, pneumonia adquirida no hospital (PAH), e pneumonia associada à ventilação mecânica (PAV) (PFIZER, 2021).

A ceftazidima, assim como os demais betalactâmicos, caracteriza-se pela presença, em sua estrutura química, do anel betalactâmico, responsável pela sua ação antimicrobiana. As propriedades distintas dessa cefalosporina são conferidas pelas cadeias laterais ligadas à estrutura química central nas posições 3 e 7, que resultam numa maior atividade antimicrobiana contra *Enterobacterales* e *P. aeruginosa*. Esse antimicrobiano liga-se a uma variedade de PBPs, preferencialmente a PBP3 de bactérias gram-negativas, incluindo *P. aeruginosa*. A ligação da cefalosporina a PBP promove a inibição da síntese da parede celular bacteriana, levando à morte celular (TUON; ROCHA; FORMIGONI-PINTO, 2018).

O avibactam é um inibidor de betalactamases e sua estrutura química assemelha-se a de um betalactâmico. Comparando a ceftazidima com o avibactam, observa-se a presença de uma carbonila na posição 7 do avibactam que imita a carbonila da ceftazidima; um sulfato na posição 6 do avibactam que se assemelha ao grupo carboxila da ceftazidima na posição 4 e a carboxamida na posição 2 do avibactam que se alinha com a cadeia lateral de aminoacil na posição 7 da ceftazidima (Figura 5) (ZHANEL et al., 2013).

Figura 5- Estrutura química da ceftazidima e do avibactam



Fonte: Zhanel et al. (2013)

O avibactam forma uma ligação covalente com as betalactamases através da acetilação reversível da serina no sítio ativo das enzimas. Essa reversibilidade

permite que o avibactam possa ser reciclado para inibir outras betalactamases. Essa característica difere de outros inibidores de betalactamases, que formam intermediários irreversíveis da acil-enzima que se decompõe por hidrólise (LAGACE-WIENS; WALKTY; KARLOWSKY, 2014).

O avibactam também é capaz de se ligar a algumas PBPs de determinadas espécies bacterianas como *E. coli*, *Haemophilus influenzae* e *P. aeruginosa*, o que pode explicar sua atividade antibacteriana contra essas estirpes (TUON et al., 2018).

2.4.1 Resistência à ceftazidima-avibactam

2.4.1.1 Vigilância global da resistência à ceftazidima-avibactam

De acordo com relatos mundiais, as taxas de resistência de *Enterobacterales* à ceftazidima-avibactam permanecem baixas. Em um estudo avaliando a atividade desse antimicrobiano contra bacilos gram-negativos na Ásia e regiões do Pacífico, pelo Programa de Vigilância Global (INFORM), no período de 2015-2017, a taxa de resistência à ceftazidima-avibactam foi de 1,9% (WANG, Y. et al., 2020). Outro estudo conduzido pelo INFORM no mesmo período, avaliando 1.460 *Enterobacterales* não sensíveis ao meropenem, coletados globalmente, a taxa de resistência à ceftazidima-avibactam foi de 27%, sendo que América Latina e Europa apresentaram as menores taxas de resistência (12,5% e 23,2%, respectivamente), seguidos da África/Oriente Médio e Ásia (49,2% e 51,7%, respectivamente) e Oceania (88,9% - contudo apenas 18 isolados foram coletadas nessa região) (SPILIOPOULOU; KAZMIERCZAK; STONE, 2020).

Um estudo mais recente, conduzido pelo ATLAS, avaliando 8.416 *Enterobacterales*, a partir de 41 centros médicos em 10 países latino-americanos, entre o período de 2017 a 2019, a taxa de resistência à ceftazidima-avibactam foi de 1,9%, sendo que, entre os isolados não-sensíveis aos carbapenêmicos, a taxa de resistência à ceftazidima-avibactam foi de 25,3%. Entre os isolados positivos para KPC (n=364), a taxa de resistência à ceftazidima-avibactam foi de 0,5% (KARLOWSKY et al., 2021).

2.4.1.2 Mecanismos de resistência à ceftazidima-avibactam

A produção de metalobetalactamases é o principal mecanismo natural envolvido na resistência à ceftazidima-avibactam. Além disso, com o aumento da disseminação de metalobetalactamases, ao redor do mundo, em especial da enzima NDM-1, a presença de isolados coprodutores de NDM-1 e KPC-2 têm sido mais frequentes. Em agosto de 2021, a ANVISA emitiu uma Nota Técnica N° 05/2021, dispondo sobre medidas de prevenção e controle da disseminação de microrganismos multirresistentes, onde foram apontados perfis atípicos de resistência, incluindo a presença de isolados de *P. aeruginosa* e *Enterobacterales* coprodutores de KPC e NDM em até 8% do total de isolados positivos para esses genes. Em setembro de 2021, a mesma agência emitiu um Comunicado de Risco, alertando sobre a identificação de isolados de *P. aeruginosa* coprodutores de KPC e NDM em serviços de saúde (ANVISA, 2021a;2021b; LEE et al., 2016).

A resistência adquirida à ceftazidima-avibactam em *Enterobacterales* está também relacionada à expressão de variantes de betalactamases. Alterações em resíduos-chave nos sítios ativos das serinobetalactamases podem aumentar significativamente os valores de CIM de ceftazidima-avibactam. Diversas variantes já foram implicadas na resistência a esse composto, sendo derivadas de betalactamases como KPC-2/KPC-3; CTX-M-14/CTX-M-15; SHV-1; AmpC; VEB e OXA-48 (MOREIRA; CAIERAO, 2021; XIONG et al., 2022).

A impermeabilidade de membrana por mutações em porinas foi implicada na resistência à ceftazidima-avibactam em experimentos com nocaute (NELSON et al., 2017; SHIELDS et al., 2015). Em *K. pneumoniae*, as porinas OmpK35 e OmpK36 permitem a difusão de avibactam através da membrana externa. A resistência à ceftazidima-avibactam por impermeabilidade em *K. pneumoniae* tem sido relacionada a uma OmpK35 não funcional, decorrente de mutações do tipo *frameshift*, que resultam em códons de terminação prematuros. Além disso, foi observado que uma alteração na região L3 de OmpK36 em *K. pneumoniae* resulta em diminuição da sensibilidade à ceftazidima-avibactam (CASTANHEIRA et al., 2020)

Um estudo com mutantes e experimentos de complementação evidenciou que mutações na porina LamB contribuem para a resistência à ceftazidima-avibactam em *K. pneumoniae* produtora de variantes KPC. Também foi evidenciado que uma nova substituição de aminoácidos (L367Q) em PBP3 levou a um aumento significativo

na CIM de ceftazidima-avibactam. Por fim, esse estudo verificou que o nível de expressão de *bla*_{KPC} aumentou em quatro das seis cepas resistentes à ceftazidima-avibactam testadas, sem mutações de KPC, indicando uma provável associação entre o nível de expressão de *bla*_{KPC} e o aumento da resistência à ceftazidima-avibactam nessas cepas (GUO et al., 2021).

2.5 VARIANTES KPC RELACIONADAS COM A RESISTÊNCIA À CEFTAZIDIMA-AVIBACTAM

A acilação de ceftazidima, por KPC, causa rearranjo de três alças dessa enzima: a alça Ω (resíduos 164-179), e as alças 240 (resíduos 237-243) e 270 (resíduos 266-275), regiões que fazem fronteira com o sítio ativo da enzima (TOOKE et al., 2021). A resistência à ceftazidima-avibactam mediada por KPC tem sido associada, em sua maioria, às variantes de KPC-2 ou KPC-3, que possuem substituições de aminoácidos na região da alça Ω , selecionadas após o uso clínico da ceftazidima-avibactam. No entanto, mutações nas alças 240 e 270 também têm sido implicadas na resistência à ceftazidima-avibactam (CARATTOLI et al., 2021; MUELLER et al., 2019). Algumas variantes KPC podem apresentar múltiplas mutações nessas diferentes regiões. Um número significativo de variantes que conferem resistência à ceftazidima-avibactam apresentam inserções ou deleções de aminoácidos, associadas ou não a mutações pontuais. De maneira geral, a região do gene *bla*_{KPC} que codifica a alça Ω parece ser permissiva para inserções e deleções, a que codifica a alça 240 (237-243) apenas para deleções e a que codifica a alça 270 (266-275) apenas para inserções, sugerindo que cada estrutura exibe uma tolerância mutacional diferente (HOBSON et al., 2022).

As variantes derivadas de KPC-3 são as mais preocupantes. Essa enzima tem eficiência catalítica 9 a 30 vezes maior que a KPC-2 quando o substrato é a ceftazidima, devido à substituição de aminoácido H274Y. Essa substituição foi encontrada em variantes, como KPC-7 (M49I; H274Y), KPC-8 (V240G; H274Y), KPC-9 (V240A; H274Y), KPC-10 (P104R; H274Y) e KPC-15, todas associadas ao aumento da resistência à ceftazidima (HIDALGO-GRASS et al., 2012; MEHTA; RICE; PALZKILL, 2015; WANG, D. et al., 2014).

O primeiro relato da resistência à ceftazidima-avibactam *in vivo* se deu em 2015, a partir de um isolado de *K. pneumoniae* recuperado de um paciente admitido em um hospital da Califórnia, EUA, sem histórico de uso prévio desse antimicrobiano.

A resistência foi relacionada a um aumento no número de cópias do gene *bla*_{KPC-3} devido à transposição de Tn4401, albergando *bla*_{KPC-3}, para um segundo plasmídeo pIncX3, que albergava um segundo gene de betalactamase, *bla*_{SHV-12}. Além disso, os isolados resistentes carregavam uma OmpK35 não funcional e mutações na porina OmpK36 (HUMPHRIES et al., 2015; NELSON et al., 2017).

O primeiro relato de resistência à ceftazidima-avibactam após exposição ao fármaco se deu em 2016 após estudo retrospectivo de pacientes com infecção por ERCs que foram tratados com ceftazidima-avibactam no Centro Médico da Universidade de Pittsburgh (EUA) entre abril de 2015 e fevereiro de 2016. De 37 pacientes avaliados, três haviam sido infectados com isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC e resistentes à ceftazidima-avibactam. A resistência foi observada após 10 a 19 dias de exposição ao fármaco. Esses isolados albergavam genes de variantes de KPC-3 localizados em plasmídeos (IncFIA) e pertenciam ao ST258. Os genes *bla*_{KPC-3} do tipo selvagem e mutante foram associados a um elemento de transpóson Δ Tn1331-Tn4401d. As variantes D179Y/T243M, D179Y e V240G foram associadas à resistência à ceftazidima-avibactam aumentando a CIM ≥ 128 vezes, ≥ 16 vezes e ≥ 4 vezes, respectivamente (SHIELDS et al., 2017; SHIELDS et al., 2016).

Desde então, diversas variantes KPC têm sido descritas, apresentando substituições, inserções e/ou deleções de aminoácidos (Tabela 1). Entre elas, a mutação mais frequente é a substituição H179Y, encontrada nas variantes derivadas de KPC-3 (KPC-31) e KPC-2 (KPC-33). O ácido aspártico na posição 179 de Ambler forma uma ponte que estabiliza a alça Ω . A substituição de aminoácido nessa região resulta em uma flexibilização da alça, aumentando a afinidade das betalactamases pela ceftazidima, diminuindo a ligação ao avibactam (MOREIRA; CAIERAO, 2021; WINKLER; PAPP-WALLACE; BONOMO, 2015).

A resistência à ceftazidima-avibactam normalmente vem acompanhada de aumento da sensibilidade aos carbapenêmicos. No entanto, já foi demonstrada a presença de subpopulações diferentes que abrigam o alelo do tipo selvagem e um mutante de *bla*_{KPC-3}, que resulta numa proteína com substituição H179Y, coexistindo no mesmo isolado clínico de *K. pneumoniae*, determinando um fenótipo híbrido, resultando em resistência aos carbapenêmicos e à ceftazidima-avibactam (GAIBANI et al., 2018).

Tabela 1 - Estudos publicados de variantes KPC implicadas em resistência à ceftazidima-avibactam

Variante KPC	Terapia prévia	KPC derivada	Mutação	Espécie	Sítio isolado	País	Ano isolamento	MLST	Contexto genético	Referência
KPC-14	NÃO	KPC-2	Δ242-GT-243	<i>K.pneumoniae</i>	NR	EUA	2003	ST6	IncN/Tn4401b	Niu et al (2020)
KPC-23/KPC-9	NÃO	KPC-3	V240A	<i>K.pneumoniae</i>	Urina	Grecia	2014	ST258	IncFlk-FIB/Tn4401a	Galani et al (2019)
KPC-31	SIM	KPC-3	D179Y	<i>K.pneumoniae</i>	Urina/LBA	EUA	2015-2016	ST258	IncFIA/ΔTn1331-Tn4401d	Shields et al (2017)
KPC-44	SIM	KPC-2	259-AVYTRAPNKDDKHSE ins	<i>K.pneumoniae</i>	Sangue	Finlândia	2016	ST39	NR	Raisanen et al (2019)
KPC-28	NÃO	KPC-2	Δ242-GT-243	<i>E. coli</i>	Swab retal	França	2016	ST1288	IncN	Beyrouthy et al (2017)
KPC-33	SIM	KPC-2	D179Y	<i>K.pneumoniae</i>	LBA	Porto Rico	2016	ST307	IncA/C/Tn4401e	Giddins et al (2018)
KPC-40	SIM	KPC-3	L167_E168 dup	<i>E.hormaechei</i>	Swab retal	EUA	2017	ST407	IncN Tn5403	Munoz-Price et al (2019)
KPC-36	SIM	KPC-3	D163E	<i>K.pneumoniae</i>	Swab retal	Itália	2018	ST1519	IncN Tn4401a	Gaibani et al (2020)
KPC-53	NÃO	KPC-3	L167_E168 dup	<i>K.pneumoniae</i>	Urina (cateter)	Itália	2018	ST512	IncFLIK2/Tn4401a	Di Pilato et al (2020)
KPC-35	SIM	KPC-2	L169P	<i>K.pneumoniae</i>	Sangue	EUA	2018	NR	NR	Hemrajata e Humphries (2019)
KPC-49	SIM	KPC-3	R164S	<i>K.pneumoniae</i>	Sangue	Itália	2019	ST512	pKpQIL	Carattoli et al (2021)
KPC-29	SIM	KPC-3	D272insKDD	<i>K.pneumoniae</i>	Sangue	Itália	2019	ST512	pKpQIL	Carattoli et al (2021)
KPC-39	SIM	KPC-3	A172T	<i>K.pneumoniae</i>	Sangue	Itália	2019	ST101	FIA-FIIR-R	Carattoli et al (2021)
KPC-66	NÃO	KPC-3	L167delEL	<i>K.pneumoniae</i>	Fluido ascítico	Itália	2019	ST512/ST111	pKpQIL/FIA-FIIR-R	Carattoli et al (2021)
KPC-67	SIM	KPC-3	D272insKDDKDD	<i>K.pneumoniae</i>	Urina	Itália	2019	ST512	pKpQIL	Carattoli et al (2021)
KPC-68	SIM	KPC-3	S182insSS	<i>K.pneumoniae</i>	Sangue	Itália	2019	ST101	FIA-FIIR-R	Carattoli et al (2021)
KPC-41	SIM	KPC-3	269-Pro-Asn-Lys-270	<i>K.pneumoniae</i>	Swab retal	Itália	2019	ST395	FIA-FIIR-R	Carattoli et al (2021)
KPC-8	NÃO	KPC-3	V240G	<i>K.pneumoniae</i>	Urina	Argentina	2019	ST11	NR	Mueller et al (2019)
KPC-48	SIM	KPC-3	L169P-A172T	<i>K.pneumoniae</i>	Drenagem abdominal	Espanha	2019	NR	plasmidial	Garcia et al (2020)
KPC-79	SIM	KPC-2	ins_262_VYTRAPN	<i>K.pneumoniae</i>	Escarro	China	2019	ST11	IncFII/IncR	Cano et al (2020)
KPC-76	SIM	KPC-2	ins_262_VYTRAPN/D179Y	<i>K.pneumoniae</i>	Escarro	China	2019	ST11	IncFII/IncR	Shi et al (2022)
KPC-69	SIM	KPC-3	W165insGL	<i>K.pneumoniae</i>	Swab retal	Itália	2020	ST111	pKpQIL	Carattoli et al (2021)
KPC-70	SIM	KPC-3	D179Y; T268A	<i>K.pneumoniae</i>	Trato respiratório	Itália	2020	ST512	pKpQIL	Carattoli et al (2021)
KPC-50	NÃO	KPC-3	276-E-A76 V-277	<i>K.pneumoniae</i>	Swab retal	Suíça	2020	ST258	IncFIB	Poirel et al (2020)
KPC-51	SIM	KPC-2	D179N;Y241H;H274N	<i>K.pneumoniae</i>	Swab retal	China	2020	ST11	plasmidial	Sun et al (2020)
KPC-52	SIM	KPC-2	D179Y; 262insV	<i>K.pneumoniae</i>	LBA	China	2020	ST11	plasmidial	Sun et al (2020)

continua

Variante KPC	Terapia prévia	KPC derivada	Mutação	Espécie	Sítio isolado	País	Ano isolamento	MLST	Contexto genético	Referência
KPC-57	SIM	KPC-2	D179V	<i>K. pneumoniae</i>	Swab retal	Grécia	2020	ST39	Tn4401a/pKQIL-like	Galani et al (2021)
KPC-74	SIM	KPC-2	Δ 239-GV-240	<i>K. pneumoniae</i>	Escarro	China	2020	ST11	IncFII/R	Li et al (2021)
KPC-82	SIM	KPC-2	274-SD ins-275	<i>Citrobacter koseri</i>	Sangue	EUA	2020	NR	Cromossomo/Tn4401-like	Lebreton et al (2021)
KPC-71	SIM	KPC-2	ins_180_S	<i>K. pneumoniae</i>	Sangue	China	2020	ST11	plasmidial	Li et al (2021)
KPC-113	NÃO	KPC-2	Ins_166_G	<i>K. pneumoniae</i>	Sangue	Brasil	2020	ST16	IncFII- <i>IncFIB</i> /Tn4401b	Vásquez-Ponce et al (2023)
KPC-114	NÃO	KPC-2	Ins_180_SS	<i>K. pneumoniae</i>	Swab retal	Brasil	2020	ST11	IncNTn4401b	Vásquez-Ponce et al (2023)
KPC-78	SIM	KPC-2	D179A	<i>K. pneumoniae</i>	LCR	China	2020	ST859	IncFII/IncR	Shi et al (2022)
KPC-46	SIM	KPC-3	L168P	<i>K. pneumoniae</i>	Swab retal	Espanha	2020	ST307	IncFIIk-FIB/Tn4401a	Hernández-García et al (2022)
KPC-92	SIM	KPC-3	E167_N169delinsD	<i>K. pneumoniae</i>	Sangue	Espanha	2020	ST307	IncFIIk-FIB/Tn4401a	Hernández-García et al (2022)
KPC-86	SIM	KPC-2	D179G	<i>K. pneumoniae</i>	Vários sítios	China	2020	ST11	plasmidial	Jiang et al (2022)
KPC-87	SIM	KPC-2	GT241A	<i>K. pneumoniae</i>	Vários sítios	China	2020	ST11	plasmidial	Jiang et al (2022)
KPC-88	SIM	KPC-2	G523T	<i>K. pneumoniae</i>	Vários sítios	China	2020	ST11	plasmidial	Jiang et al (2022)
KPC-62	NR	KPC-3	L169Q	<i>K. pneumoniae</i>	Vários sítios	Espanha	2020-2021	ST307	IncFIIk-FIB/Tn4401a	Castillo-Polo (2023)
KPC-61	-	KPC-3	S171P	<i>K. pneumoniae</i>	<i>in vitro</i>	Suça	2020	-	-	Findlay et al (2021)
KPC-94	SIM	KPC-3	L169H/Del_170_N	<i>K. pneumoniae</i>	Colonização intraabdominal	Espanha	2021	ST512	plasmidial	Guzmán-Puche (2022)
KPC-95	SIM	KPC-3	A172/D179Y	<i>K. pneumoniae</i>	Swab retal	Espanha	2021	ST512	plasmidial	Guzmán-Puche (2022)
KPC-115	SIM	KPC-3	del_169-170_LN/S171P	<i>K. pneumoniae</i>	Sangue	Argentina	2021	ST11	plasmidial	Nicola et al (2022)
KPC-112	SIM	KPC-2	del_166-167_EI/del_242-243_GT	<i>K. pneumoniae</i>	Escarro	China	2021	ST15	plasmidial	Shen et al (2022)
KPC-123	SIM	KPC-2	ins179_TY/ins270_DDKHSEA	<i>Citrobacter koseri</i>	Escarro	China	2021	NR	plasmidial	Wang et al (2022)
KPC-121	NR	KPC-3	181_S dup	<i>K. pneumoniae</i>	Sangue	Itália	2021	ST512	Plasmidial	Gaibani et al (2022)
KPC-93	SIM	KPC-2	267_PNNRA_268 ins	<i>K. pneumoniae</i>	Escarro	China	2021	ST11	IncFII/IncR	Wu et al (2022)
KPC-98	NÃO	KPC-3	R164H	<i>K. pneumoniae</i>	Urina	Portugal	2021	ST13	Tn4401d	Mendes et al (2023)
KPC-109	SIM	KPC-3	ins_270_KYNKDD	<i>K. pneumoniae</i>	Trato respiratório	Itália	2021	ST512	FIIK1-FIB-Cole	Pilato et al (2023)
KPC-90	SIM	KPC-2	Ins_179_TY	<i>P. aeruginosa</i>	Swab retal	China	2022	ST463	plasmidial	Tu et al (2022)
KPC-134	SIM	KPC-2	D178A + DDNRAPNKins	<i>K. pneumoniae</i>	Escarro	China	2022	ST11	IncFII/IncR	Huang et al (2023)
KPC-145	SIM	KPC-2	T263A	<i>K. pneumoniae</i>	Feces/Drenagem abdominal	China	2022	ST11	IncFII	Chen et al (2023)

Legenda: NR: não reportado; LBA: Lavado broncoalveolar.

conclusão

2.6 ENSAIOS IMUNOCROMATOCRÁFICOS DE FLUXO LATERAL NA DETECÇÃO DE VARIANTES DE KPC QUE CONFEREM RESISTÊNCIA À CEFTAZIDIMA-AVIBACTAM

Com a mudança epidemiológica das carbapenemases no Brasil, bem como a introdução de novos antimicrobianos na prática clínica, como a ceftazidima-avibactam, que não têm ação para os produtores de MBL, a implementação de testes fenotípicos para a caracterização do tipo de carbapenemase têm sido cada vez mais frequente nos laboratórios clínicos. Há diversos testes fenotípicos descritos na literatura, que incluem: testes bioquímicos colorimétricos, como o Blue-carba, Carba-NP; testes de inativação do carbapenêmico (CIM), testes com discos combinados (EDTA, ácido fenilborônico/ácido dipicolínico e cloxacilina), testes de hidrólise dos carbapenêmicos por MALDI-ToF MS e os testes imunocromatográficos de fluxo lateral (KIFFER et al., 2023; TAMMA; SIMNER, 2018).

Atualmente, o uso de testes imunocromatográficos na prática clínica tem ganhado destaque, uma vez que apresentam algumas vantagens em relação a outras metodologias, como a rapidez na obtenção dos resultados (15-30 minutos), a facilidade na execução do teste, a elevada sensibilidade e especificidade e a capacidade na detecção da coprodução de KPC e MBL, situação na qual muitos testes fenotípicos falham (JOSA et al., 2022).

O teste imunocromatográfico tem como princípio a captura do antígeno com anticorpos monoclonais que estão fixados a uma membrana de nitrocelulose e a seguir revelação da reação com um segundo anticorpo marcado com ouro coloidal. No Brasil, há dois testes registrados na ANVISA, comercialmente disponíveis: o O.K.N.V.I. RESIST-5 (Coris-Bioconcept), capaz de detectar OXA-48-like, KPC, NDM, VIM e IMP; e o NG-Test CARBA-5 (NG-Biotech), capaz de detectar KPC, OXA-48-like, VIM, IMP e NDM (ANVISA, 2020).

A maioria dos testes fenotípicos usualmente utilizados pelos laboratórios clínicos na detecção de carbapenemases não é capaz de detectar variantes de KPC que conferem resistência à ceftazidima-avibactam (DING et al., 2021). Com relação aos testes imunocromatográficos, essa detecção depende do tipo de variante KPC. Um estudo avaliando eficácia do NG-Test CARBA-5 na detecção de carbapenemases evidenciou que esse teste não foi capaz de detectar 6 das 12 variantes de KPC incluídas nesse estudo: KPC-33, KPC-52, KPC-71, KPC-76, KPC-77, KPC-123, aos

quais, cinco destes, estavam relacionadas com a resistência à ceftazidima-avibactam (GU et al., 2023). Outro estudo avaliando diferentes métodos fenotípicos na detecção de carbapenemases verificaram que ambos os testes, NG-Test CARBA-5 e RESIST-5, falharam em detectar duas (KPC-31 e KPC-33) de três variantes KPC testadas (KPC-14, KPC-31 e KPC-33) (BIANCO et al., 2021).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar genotipicamente e fenotipicamente isolados do Complexo *K. pneumoniae* produtores de KPC, resistentes à ceftazidima-avibactam, detectados em hospitais privados do Brasil no período de julho de 2019 a julho de 2021.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar retrospectivamente as taxas de resistência ao ertapenem em isolados do Complexo *K. pneumoniae*;
2. Avaliar retrospectivamente a frequência de classes de carbapenemases em isolados do Complexo *K. pneumoniae* resistentes ao ertapenem;
3. Avaliar retrospectivamente as taxas de resistência à ceftazidima-avibactam em isolados do Complexo *K. pneumoniae*;
4. Caracterizar as variantes alélicas de *bla_{KPC}* em isolados com fenótipo de resistência à ceftazidima-avibactam;
5. Caracterizar o contexto genético das novas variantes de *bla_{KPC}* que conferem fenótipo de resistência à ceftazidima-avibactam;
6. Avaliar a clonalidade dos isolados que expressam novas variantes de *bla_{KPC}* por MLST e PFGE;
7. Avaliar o perfil de sensibilidade aos betalactâmicos dos isolados selvagens que expressam variantes de *bla_{KPC}* que conferem fenótipo de resistência à ceftazidima-avibactam, bem como seus transformantes e transconjugantes;
8. Avaliar a presença de mutações nos genes que codificam as porinas OmpK35 e OmpK36 nos isolados que expressam variantes de *bla_{KPC}* que conferem fenótipo de resistência à ceftazidima-avibactam;

9. Avaliar o desempenho dos testes imunocromatográficos, NG-Test CARBA-5 e O.K.N.V.I. RESIST-5, na detecção de variantes KPC que conferem resistência à ceftazidima-avibactam.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANÁLISE RETROSPECTIVA PARA DETERMINAÇÃO DA TAXA DE RESISTÊNCIA A CEFTAZIDIMA-AVIBACTAM

Foi realizada uma análise retrospectiva em banco de dados, referente ao período de julho/2019 a julho/2021, para calcular a taxa de resistência ao ertapenem e, dentro desse grupo, a taxa de resistência a ceftazidima-avibactam, em isolados do Complexo *K. pneumoniae* detectados em amostras clínicas de pacientes internados em 25 hospitais privados localizados em seis estados brasileiros: São Paulo, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, Distrito Federal e Paraná. A resistência ao ertapenem foi avaliada pelas unidades laboratoriais do Grupo Fleury por disco-difusão, conforme recomendações do BrCAST (<https://brcast.org.br/>). A produção de carbapenemases foi verificada por testes fenotípicos, nos isolados resistentes ao ertapenem. Foram utilizados o Blue-Carba (BC) e discos de meropenem combinados com inibidores de betalactamases (ácido fenilborônico, EDTA e cloxacilina). A identificação inicial dos isolados foi feita nas unidades laboratoriais do Grupo Fleury por espectrometria de massas utilizando-se o sistema Microflex (Bruker) ou o sistema Vitek MS (bioMérieux). Foram considerados para análise estatística o primeiro isolado do paciente. Isolados do Complexo *K. pneumoniae* resistentes ao ertapenem sem teste para ceftazidima-avibactam, mas positivos para MBL foram considerados resistentes à ceftazidima-avibactam para fins de análise estatística.

Para a caracterização de classes de carbapenemases, dentre os isolados resistente à ceftazidima-avibactam, foram considerados os critérios descritos na Tabela 2.

A significância estatística do aumento ou redução das taxas de resistência ao ertapenem, resistência à ceftazidima-avibactam e mecanismos de resistência observados nos três diferentes períodos analisados – julho a dezembro de 2019, janeiro a dezembro de 2020 e janeiro a julho de 2021 - foi avaliada utilizando-se o

teste qui-quadrado de tendência, com o software GraphPAD Prism v. 5.01 (Graph Pad Software Inc). Foram considerados significativos valores de $P \leq 0,05$.

Tabela 2- Critérios para categorização de classes de carbapememases e isolados do Complexo *K. pneumoniae* resistentes à ceftazidima-avibactam

Blue-Carba	MEM+AFB	MEM+EDTA	Classificação
pos	pos ou neg	pos	Classe B ou Classes A e B
pos	neg	neg	Classes A e B
neg	pos ou neg	neg	Variante de KPC

Legenda: MEM: meropenem; AFB: ácido fenilborônico; pos: positivo; neg: negativo

Fonte: Produzida pela autora.

4.2 ISOLADOS BACTERIANOS

Durante o período de estudo, foram armazenados a -80°C os isolados detectados na rotina das unidades laboratoriais do Grupo Fleury que preenchiam os seguintes critérios: 1- Identificação por espectrometria de massas como Complexo *K. pneumoniae*; 2- Resistência à ceftazidima-avibactam; 3- Ausência de aumento do halo de inibição para meropenem após adição de EDTA 0,1M e Blue-Carba negativo ou Blue-Carba positivo e PCR positiva para *bla*_{KPC}, mas negativa para *bla*_{NDM} e *bla*_{OXA-48-like}.

Um total de 46 isolados do Complexo *K. pneumoniae*, provenientes de amostras clínicas, foi disponibilizado pelo Grupo Fleury para este estudo. Além disso, para seis pacientes, foram incluídos isolados de *K. pneumoniae*, um por paciente, sensíveis à ceftazidima-avibactam e positivos para *bla*_{KPC}, que eram provenientes da primeira infecção, para avaliar a clonalidade em relação a seus isolados pareados, resistentes à ceftazidima-avibactam. Todos os isolados incluídos neste estudo foram avaliados quanto à pureza após cultura em CHROMagar SuperCARBA (Plastlabor).

4.3 TESTE FENOTÍPICO BLUE-CARBA

A avaliação da expressão de carbapenemases foi realizada pelo método Blue-Carba, que utiliza o azul de bromotimol como indicador de pH, uma vez que possui uma faixa de pH ideal (pH 6,8) para a maioria das betalactamases, permitindo uma abordagem direta da colônia. Em um microtubo de 1,5 mL foram adicionados 100 µL da solução BC, para controle negativo, e em outro microtubo, 100 µL da solução BC + imipenem/cilastatina (10 mg). A massa bacteriana equivalente a meia alça descartável de 10 µL foi adicionada às soluções. Os tubos foram incubados à 36°C ±1°C por até 2 horas. A interpretação foi realizada conforme descrito na publicação original de Pires, Novais e Peixe (2013). Como controles da reação, foram utilizadas as cepas de *K. pneumoniae* ATCC 700603 (controle negativo) e *K. pneumoniae* ATCC BAA1705 (controle positivo).

4.4 ISOLADOS DE *K. pneumoniae* SEM SEQUENCIAMENTO NGS

Em função da disponibilidade orçamentária, 10 de 46 isolados de *K. pneumoniae* resistentes à ceftazidima-avibactam e todos os isolados de *K. pneumoniae* sensíveis à ceftazidima-avibactam (n= 6) foram analisados utilizando-se ensaios com PCR multiplex para determinação da espécie, presença de genes de carbapenemases, e caracterização da variante KPC por sequenciamento pelo método de Sanger com didesoxinucleotídeos.

4.4.1 Detecção e sequenciamento de variantes *bla_{KPC}*

A sequência nucleotídica completa do gene *bla_{KPC}* foi determinada utilizando-se os iniciadores descritos na Tabela 3. Os produtos da PCR foram purificados utilizando-se o kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification e sequenciados utilizando o kit BigDye terminator versão 3.1 no equipamento 3130XL Genetic Analyzer. As sequências nucleotídicas foram utilizadas para montagem da sequência consenso com o programa Geneious Prime (Biomatters Ltd.) A região da sequência consenso correspondente ao gene *bla_{KPC}* foi traduzida utilizando-se o programa BioEdit e a seguir foi comparada com as sequências de aminoácidos disponíveis no GenBank, utilizando-se o programa BLASTp e com banco local criado com o programa BioEdit.

Tabela 3-Iniciadores utilizados para sequenciamento de *bla_{KPC}*

Primer	Uso	Sequência 5' - 3'	Referência
5-prom- <i>bla</i> KPC-JS	PCR ^a e sequenciamento	CTAGCTCCACCTTCAAACAAGGA	Bartolleti et al (2016)
3-out- <i>bla</i> KPC-JS	PCR ^a e sequenciamento	TGGGTGGGCCAATAGATGAT	
KPC-rt-F	Sequenciamento	GATACCACGTTCCGTCTGG	Hindiyeh et al. (2008)
KPC-rt-R	Sequenciamento	GCAGGTTCCGGTTTTGTCTC	

^aCiclo de amplificação: etapa inicial: 94°C-10min; 35 ciclos: 94°C-30s, 55°C-40s e 72°C-40s; etapa final: 72°C-7 min.

4.4.2 Identificação das espécies do complexo *K. pneumoniae*

Considerando que a espectrometria de massas não permite a identificação acurada das espécies do Complexo *K. pneumoniae*, foi realizada a PCR multiplex utilizando-se os primers descritos por Fonseca et. al. (2017). O preparo da reação de PCR foi feito utilizando-se o Kit Platinum Green Hot Start PCR Master Mix (Thermo Fisher). A amplificação do produto de 995 bp indica *K. pneumoniae*, enquanto os produtos de 485 bp e 348 bp indicam, respectivamente *K. variicola* e *K. quasipneumoniae*. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1%, utilizando-se o marcador 1kb plus DNA Ladder (Thermo). Os seguintes controles foram utilizados: *K. pneumoniae* ATCC BAA1705; *Klebsiella variicola* J1061397 (coleção Grupo Fleury); *K. quasipneumoniae* CCBH16302 (FIOCRUZ).

4.4.3 PCR multiplex para genes de carbapenemases

Foram utilizadas duas reações de PCR multiplex previamente padronizadas por Pereira (2017), uma para a detecção dos genes *bla_{SPM}*, *bla_{NDM}* e *bla_{OXA-48-like}*, e outra para a detecção dos genes *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}* e *bla_{KPC}*. Foram utilizados os primers descritos na publicação de Poirel et al. (2011). Como controle interno da reação, foi utilizado um par de primers para amplificação do rRNA 16S (16S-4F: TTGGAGAGTTTGATCCTGGCTC; 16S-1525R: AAGGAG-GTGWTCARCC). Como controles positivos foram utilizadas cepas de *P. aeruginosa* produtoras de IMP-1, VIM-16 e SPM-1 (cepas gentilmente fornecidas pela Profa. Ana Cristina Gales); *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA1705, produtora de KPC, *K. pneumoniae* 11978 produtora de

OXA-48 (cepa gentilmente fornecida pelo Dr. Laurent Poirel) e *Klebsiella pneumoniae* K9105516 produtora de NDM-1 (coleção de bactérias do Grupo Fleury).

4.5 SEQUENCIAMENTO COMPLETO DO GENOMA DE ISOLADOS RESISTENTES À CEFTAZIDIMA-AVIBACTAM

4.5.1 Sequenciamento na plataforma MiSeq - Illumina

Para o sequenciamento completo do genoma de 36 isolados de *K. pneumoniae* resistentes à ceftazidima-avibactam, foi realizada a extração do DNA genômico utilizando-se os kits: Illustra bacteria genomic Prep Mini Spin Kit ou MasterPure Complete DNA and RNA Purification kit, conforme recomendações de cada fabricante. Para o preparo das bibliotecas foi utilizado o kit Nextera XT DNA Library Preparation. Em tubos de 0,2 mL foram adicionados 10 µL do Neutralize Tagment Buffer (TD), 5 µL do DNA normalizado a 0,2 ng/µL e 5 µL do Amplicon Tagment Mix (ATM). As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 280 x g a 20°C por 1 min. A seguir, foi realizada uma etapa em termociclador Veriti® Thermal Cycler (Thermo) para tagmentação do DNA e inserção de adaptadores, a uma temperatura de 55°C por 5 min e espera a 10°C. A seguir, 5 µL do Neutralize Tagment Buffer (NT) foram adicionados. As amostras foram homogeneizadas, centrifugadas a 280 x g a 20°C por 1 min e incubadas por 5 min à temperatura ambiente. Em seguida, 5 µL dos Indexes 1 e 2 do Nextera® XT Index Kit – 24 indexes, 96 samples (Illumina) foram adicionados juntamente com 15 µL do Nextera PCR Master Mix (NPM) para amplificação dos fragmentos de DNA. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 280 x g a 20°C por 1 min. Um novo ciclo de PCR foi iniciado conforme recomendações do fabricante. Após reação de PCR, as amostras foram centrifugadas a 280 x g a 20°C por 1 min. Para a purificação do DNA, 50 µL dos produtos de PCR foram adicionados em placas de PCR 96-Well, juntamente com 30 µL AMPure XP beads (Beckman Coulter). As amostras foram homogeneizadas em agitador a 1.800 rpm por 2 min e incubadas à temperatura ambiente por 5 min. A placa foi posicionada em estante magnética até que as amostras permanecessem límpidas. A seguir, os sobrenadantes foram desprezados e as esferas magnéticas purificadas em 200 µL de etanol a 80%. A placa permaneceu em repouso até completa evaporação do etanol por aproximadamente 15 min. Por fim, as amostras foram eluídas em 30 µL do Resuspension Buffer (RSB).

As bibliotecas foram validadas através da análise do tamanho médio dos fragmentos utilizando o kit Agilent High Sensitivity DNA e normalizadas para a preparação do *pool* de DNA após determinação das concentrações das bibliotecas por PCR-RT (Step One Plus), utilizando o NEBNext® Library Quantification kit (BioLabs®). O *pool* de amostras foi diluído e desnaturado a 12 pM/9pM para sequenciamento com MiSeq Reagent kit v3 – 600 cycles (Illumina) na plataforma MiSeq (Illumina). O PhiX a 1% foi utilizado como controle de qualidade do sequenciamento.

4.5.1.1 Montagem de genomas, análise dos genes *bla_{KPC}*, determinação do ST e avaliação das sequências de aminoácidos de OmpK35 e OmpK36

A montagem *De novo* dos genomas foi realizada utilizando-se o programa Geneious Prime v 8.1.9/2023 2.1. O programa CARD/RGI foi utilizado para a detecção dos genes de resistência. A caracterização das variantes KPC foi realizada utilizando-se um banco de dados local no programa BioEdit. O tipo de MLST e a confirmação das espécies foi realizada através de análises dos *contigs* no PubMLST (<https://pubmlst.org/>). A presença de mutações em porinas de *K. pneumoniae* (OmpK35 e OmpK36) foram avaliadas nas primeiras 15 cepas que tiveram seu genoma completo sequenciado, comparando-se as sequências de aminoácidos de OmpK35 e OmpK36 de isolados do C-*Kp* resistentes à ceftazidima-avibactam, com as respectivas porinas da cepa selvagem *K. pneumoniae* ATCC13883.

4.5.2 Plataforma Nanopore - MinION

Para a montagem precisa dos plasmídeos foi realizado o sequenciamento do DNA genômico no MinION (FLO-MIN106) para 23 isolados de *K. pneumoniae* resistentes à ceftazidima-avibactam. O DNA genômico foi extraído utilizando-se o MasterPure Complete DNA and RNA Purification kit. Para o preparo das bibliotecas de DNA genômico foi utilizado o Rapid Barcoding Kit (SQK-RBK004). Para cada amostra, um volume equivalente à 400 ng de DNAg foi transferido para um microtubo de 0,2mL. O volume foi ajustado para 7,5 µL com água ultrapura. A seguir, foram adicionados 2,5 µL da mistura do Fragmentation Mix RB01-12 (um para cada amostra). As amostras foram homogeneizadas delicadamente e incubadas à 30°C por

1 min e resfriadas brevemente no gelo. Um volume igual de AMPure XP foi adicionado as amostras, sendo homogeneizadas e incubadas em um agitador de tubos por 5 min em temperatura ambiente. A seguir, os tubos foram posicionados em estante magnética e o sobrenadante foi descartado. As esferas foram lavadas com 200 μ L de etanol 70% por duas vezes. O etanol foi descartado e o sedimento foi ressuspensão em 10 μ L de Tris-HCl 10 mM pH 7,5-8,0 com NaCl 50 mM. As amostras permaneceram incubadas por 2 min em temperatura ambiente. A seguir, os tubos foram novamente posicionados em estante magnética até que o eluato permanecesse límpido e incolor. Em microtubos *LowBind* de 1,5 mL foram adicionados 10 μ L do eluato mais 1 μ L do Rapid Adapter (RAP). A mistura foi homogeneizada e a seguir foi centrifugada rapidamente. Por fim, as amostras foram incubadas por 5 min em temperatura ambiente e armazenadas no gelo, onde permaneceram até o momento do sequenciamento.

4.5.2.1 Montagem híbrida do genoma e análise dos plasmídeos

Após o sequenciamento do DNA genômico no MinION, foi realizado o *basecalling* no programa Guppy e filtragem dos dados no programa Filtlong. A montagem híbrida do genoma foi realizada nas plataformas online Galaxy (<https://usegalaxy.org/>) e Galaxy Australia (<https://usegalaxy.org.au/>). A curadoria manual, determinação do grupo de incompatibilidade e análise comparativa dos plasmídeos foi feita utilizando diversas ferramentas: Geneious Prime, Artemis, BLAST, BioEdit, ISFinder, UniProt, Resfinder, PubMLST e BLAST Ring Image Generator (BRIG).

4.6 PERFIL CLONAL POR ELETROFORESE EM CAMPOS PULSADOS (PFGE)

A clonalidade dos isolados de *K. pneumoniae* foi também avaliada por PFGE, conforme descrito por Ribot et al (2006). A partir de cultura pura recente em ágar LB foram preparadas suspensões bacterianas em tampão de lise celular (100mM Tris e 100mM EDTA pH 8,0) com turbidez equivalente ao padrão 3,8 a 4,2 da escala de McFarland. Um volume de 15 μ L de proteinase K (20 mg/ml) foi adicionado à 300 μ L de cada suspensão. Após homogeneização, as suspensões bacterianas foram mantidas em banho seco a 60°C por cerca de 30 minutos. A seguir, 300 μ L de agarose

a 1% (Sigma A2929) acrescida de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 1% foram adicionados aos tubos contendo as suspensões bacterianas. As amostras foram gentilmente homogeneizadas e aplicadas nos moldes para confecção de blocos contendo o DNA bacteriano. Após solidificação, os blocos foram transferidos para uma placa de cultura de células de 24 poços contendo 2 mL de tampão de lise celular e 10 µL de proteinase K (20 mg/mL), sendo incubados a 54°C sob agitação (160 rpm) por 2h. Após incubação, os blocos foram lavados quatro vezes com água ultrapura estéril a 50°C, com intervalo de 15 min entre as lavagens. A seguir, os blocos foram estocados a 4°C em tampão TE (Tris 1M, EDTA 0,5M, pH 8,0).

Para a digestão do DNA genômico, 1/3 dos blocos foram utilizados, sendo lavados 3 vezes com 200 µL de tampão TE pré-aquecido a 35°C ± 1°C, com intervalos de 15 min entre as lavagens. A seguir, 6U da enzima XbaI (Invitrogen) foram utilizados para a digestão dos blocos em um volume total de 100 µL com incubação à 35°C ± 1°C durante a noite. Após a digestão, os blocos foram lavados com 200 µL de EDTA 0,1M e fixados no gel de agarose a 1%. Em cada gel foram incluídas duas escalas Lambda PFG Ladder (New England Biolabs). A seguir, os blocos foram submetidos à eletroforese de campos pulsados com o sistema CHEF-DRIII (Bio-Rad®) com as seguintes condições de corrida: tempo do pulso inicial: 2,1s; tempo do pulso final: 63,8s; voltagem: 6V; ângulo: 120°; tempo total de corrida: 19h; temperatura: 14°C.

A similaridade entre os perfis gerados foi avaliada utilizando-se o software BioNumerics v.7.5, com cálculo de coeficiente de Dice, com 1,25% de otimização e tolerância.

4.7 ENSAIOS DE CONJUGAÇÃO

Os ensaios de conjugação foram realizados conforme descrito por Woodall (2003). A cepa receptora *E. coli* J53 e os isolados contendo variantes *bla_{KPC}* resistentes à ceftazidima-avibactam foram inoculados em 5 mL de Caldo LB e incubados a 36°C ± 1°C sob agitação a 175 rpm até atingir o DO_{600nm} 0,5-0,7A. Em um tubo foram adicionados 900 µL do caldo com a cepa doadora e 100 µL do caldo com a cepa receptora. O tubo foi centrifugado por 2 min a 16.000 g, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento bacteriano foi homogeneizado com 100 µL de caldo LB. O sedimento foi aplicado sobre uma membrana de acetato de celulose estéril com porosidade de 0,45 µm, previamente depositado sobre o ágar LB. A placa foi incubada

a 36°C ±1°C por 18-24h. A seguir, a membrana foi lavada com 5 mL de Caldo LB e diferentes alíquotas dessa suspensão foram inoculadas em ágar LB contendo 75/125 µg/mL de azida sódica e 2 µg/mL de ceftazidima-avibactam (Torgena) ou 32 µg/mL de ampicilina para a seleção dos transconjugantes. A presença do gene *bla*_{KPC} nos transconjugantes foi confirmada por PCR como descrito no item 4.4.3.

4.8 ENSAIO DE TRANSFORMAÇÃO

4.8.1 Extração de DNA plasmidial por Birnboim

Para os isolados onde não foi possível obter o transconjugante, foram realizados experimentos de transformação bacteriana. A extração plasmidial foi realizada conforme o método de lise alcalina descrito por Birnboim e Doly (1979). Os isolados foram cultivados em ágar LB e incubados a 36°C ± 1°C por 18 a 24 horas. Para cada isolado, uma alçada cheia do crescimento bacteriano foi ressuspendida em 100 µL de solução I (20 mg/mL lisozima, 50 mM glicose, 10 mM EDTA, 25mM Tris-HCl – pH 8,0). Em seguida, foram adicionados 200 µL da solução II (0,2 N NaOH, 1% SDS) e o tubo foi homogeneizado por inversão. Após 5 min de incubação no gelo, 150 µL de solução III gelada (3M acetato de sódio – pH 4,8) foi adicionada e o tubo foi homogeneizado por inversão para precipitação do DNA cromossômico. A mistura foi incubada em gelo por 5 min, e centrifugada a 16000 x g por 5 min a 4°C e 250 µL do sobrenadante foi transferido para um microtubo limpo de 1,5 mL, onde o DNA plasmidial foi precipitado com 1 mL de etanol absoluto gelado. Após uma incubação a -20°C por 30 min, o precipitado foi coletado por centrifugação a 16.000 x g por 2 min a 4°C. Posteriormente, o sedimento foi ressuspenso em 100 µL de solução IV (0,1M acetato de sódio/ 0,05M Tris-HCl – pH 8,0) e o DNA precipitado com 200 µL de etanol absoluto gelado. O tubo foi incubado a -20°C por 10 min e centrifugado novamente. O sedimento foi ressuspenso em 30 µL de TE 1 X (10 mM TrisHCl e 1 mM EDTA pH 8,0). A concentração de DNA plasmidial foi aferida utilizando-se o Nanodrop® e as extrações foram armazenadas a -70°C.

4.8.2 Preparo de células eletrocompetentes

Células eletrocompetentes foram preparadas inoculando-se 2,5 mL de uma cultura *overnight* da cepa *E. coli* TOP10 em 250 mL de caldo LB. As células foram crescidas a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ a 150 rpm até atingir $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de aproximadamente 0,5-0,7. As células foram resfriadas em gelo por cerca de 20 min e quatro alíquotas de 45 mL foram centrifugadas a $4.000 \times g$ por 15 min a 4°C . O sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas em 45 mL de solução gelada estéril de glicerol a 10%. Uma nova centrifugação foi realizada e as células bacterianas foram lavadas com 22,5 mL de solução gelada estéril de glicerol a 10%. Os tubos foram centrifugados e 2 mL de solução gelada estéril de glicerol a 10% foram adicionados. As células foram suspendidas cuidadosamente, e a seguir foram centrifugadas e os sobrenadantes descartados. Por fim, 1 mL de solução gelada estéril de glicerol a 10% foi adicionado a cada tubo. As células foram ressuspendidas e distribuídas em alíquotas de 50 μL em microtubos de 1,5 mL. As células foram armazenadas a -80°C até o momento do uso. Para verificação da eficiência das células eletrocompetentes, o plasmídeo pBCSk(-) foi utilizado para transformar *E. coli* TOP10 por eletroporação.

4.8.3 Transformação em *Escherichia coli* TOP10

Para a transformação, foram adicionados 3 μL do DNA plasmidial em 50 μL da alíquota da célula eletrocompetente. A mistura foi homogeneizada cuidadosamente e incubada em gelo picado por aproximadamente 1 min. Foram transferidos 40 μL desta suspensão para a cubeta de 0,2 cm mantida em gelo picado, sendo posicionada imediatamente em câmara de choque onde se aplicou uma voltagem de 2,5 kV. Imediatamente após o término da eletroporação, foi adicionado 1 mL do meio SOC na cubeta, e a suspensão foi transferida para um tubo cônico de 15 mL, sendo incubado a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 1 h a 60 rpm. Foram inoculados diferentes volumes dessa suspensão em placas de ágar LB contendo 2 mg/L de ceftazidima-avibactam (Torgena). A presença do gene *bla*_{KPC} nos transformantes foi confirmada por PCR conforme descrito no item 4.4.3.

4.9 PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS BETALACTÂMICOS

Os isolados selvagens e seus transconjugantes/transformantes foram avaliados quanto ao seu perfil de sensibilidade aos antimicrobianos pela técnica de

microdiluição em caldo, conforme recomendações do Comitê Brasileiro de Testes de Sensibilidade aos Antimicrobianos (BrCAST) ou utilizando-se fitas gradiente, conforme recomendação do fabricante. As CIMs foram determinadas por microdiluição em caldo para ceftazidima, ceftazidima-avibactam, aztreonam, aztreonam-avibactam, imipenem, meropenem e ertapenem. Para cefotaxima e cefepima as CIMs foram determinadas com fitas gradientes. As cepas de referência *E. coli* ATCC 25922 e *K. pneumoniae* ATCC 700603 foram utilizadas como controle de qualidade dessa metodologia. Para aztreonam-avibactam foram utilizados os critérios interpretativos preconizados pelo BrCAST para aztreonam.

4.10 PCR PARA DETECÇÃO DE GENES DE ESBL NOS TRANSCONJUGANTES ALBERGANDO NOVAS VARIANTES DE KPC IDENTIFICADAS NESTE ESTUDO

Foram realizados ensaios de PCR para a detecção de genes de ESBL nos transconjugantes que albergavam novas variantes de KPC, identificadas neste estudo, para averiguar se apenas o gene *bla*_{KPC} foi transferido para a cepa receptora (*E. coli* J53). Os genes de ESBL pesquisados foram aqueles identificados nos isolados selvagens após análise do sequenciamento no programa CARD/RGI, conforme Tabela 7. Os primers utilizados e as condições da PCR estão descritas no Anexo I. Foram utilizados os isolados selvagens que albergavam as novas variantes de KPC como controle positivo da PCR.

4.11 DESEMPENHO DE TESTES IMUNOCROMATOGRÁFICOS NA DETECÇÃO DE VARIANTES KPC

Para avaliar a performance de testes imunocromatográficos de fluxo lateral na detecção de variantes KPC, dois kits, comercialmente disponíveis, NG-Test® CARBA-5 (NG Biotech) e O.K.N.V.I. RESIST-5 (Coris BioConcept) foram testados, com todas os isolados que expressaram diferentes variantes KPC detectadas neste estudo, conforme recomendações de cada fabricante.

5 RESULTADOS

5.1 TAXAS DE RESISTÊNCIA AO ERTAPENEM, CEFTAZIDIMA-AVIBACTAM E FREQUÊNCIA DE CLASSES DE CARBAPENEMASES EM ISOLADOS DO COMPLEXO *K. pneumoniae*

De julho de 2019 a julho de 2021, 14.298 isolados do Complexo *K. pneumoniae* foram detectados. Quando comparadas as taxas de resistência ao ertapenem nos períodos de julho a dezembro de 2019 (15,6%), janeiro a dezembro de 2020 (18,9%) e janeiro a julho de 2021 (27,3%) houve aumento significativo ($P < 0,001$). Entre os isolados resistentes ao ertapenem, houve redução da frequência de fenótipo de produção de carbapenemases de classe A de 93,7% em 2019 para 80,9% em 2021 ($P < 0,001$). Em contraste, houve aumento significativo da frequência de isolados com fenótipo de carbapenemases de classe B ou coprodução de carbapenemases de classes A e B, de 3,7% em 2019 para 14,6% em 2021 ($P < 0,001$). Foi observado aumento significativo ($P < 0,001$) da taxa de resistência à ceftazidima-avibactam entre isolados resistentes ao ertapenem, quando comparados os períodos de julho a dezembro de 2019 (4,2%), janeiro a dezembro de 2020 (5,5%) e janeiro a julho de 2021 (17,2%). Em todo o período analisado, a resistência à ceftazidima-avibactam por produção de carbapenemases de classe B ou coprodução de carbapenemases de classes B e A correspondeu a 82,7% e a resistência por produção de variantes de KPC correspondeu a 17,3%. As variantes KPC corresponderam a 12,5% (3/24), 27,4% (17/62) e 14,9% (33/221) de isolados resistentes à ceftazidima-avibactam, respectivamente, em 2019, 2020 e 2021. Não houve aumento significativo dessas frequências comparando-se os três períodos ($P = 0,329$) (Tabela 4).

Tabela 4- Taxas de resistência ao ertapenem e à ceftazidima-avibactam e fenótipos de resistência em isolados do Complexo *K. pneumoniae* no período de Julho de 2019 a Julho de 2021

Fenótipo de resistência	Total	N (%)			Valor de P ¹
		Jul-Dez 2019	Jan-Dez 2020	Jan-Jul 2021	
Todos os fenótipos	14.298	3.673	5.910	4.715	-
Resistente ao ertapenem (% ertapenem R)	2.980 (20,8%)	573 (15,6%)	1.120 (18,9%)	1.287 (27,3%)	<0,001
Resistente à CAZ-AVI (% do total / % em isolados ertapenem R)	307 (2,1%/10,3%)	24 (0,6%/4,2%)	62 (1,0%/5,5%)	221 (4,7%/17,2%)	<0,001/<0,001
Classe A de Ambler (% em isolados ertapenem R)	2.593 (87,0%)	537 (93,7%)	1.014 (90,5%)	1.042 (80,9%)	<0,001
Classe B ou Classe A e B de Ambler (% em isolados ertapenem R / % em isolados CAZ-AVI R)	254 (8,5%/82,7%)	21 (3,7%/87,5%)	45 (4,0%/72,6%)	188 (14,6%/85,1%)	<0,001/0,329
Variantes KPC resistentes à CAZ-AVI (% em isolados ertapenem R / % em isolados CAZ-AVI R)	53 (1,8%/17,3%)	3 (0,5%/12,5%)	17 (1,5%/27,4%)	33 (2,6%/14,9%)	0,001/0,329
Variantes KPC que conferem resistência à CAZ-AVI provenientes de culturas de vigilância	9	0	2	7	-

1- Valor de P obtido com teste qui-quadrado de tendência.

2- CAZ-AVI – ceftazidima-avibactam; R – resistente.

Fonte: Produzida pela autora.

5.2 AVALIAÇÃO DA PUREZA E TESTE BLUE-CARBA

Todos os isolados recuperados para estudo (n=46) foram avaliados quanto à pureza após cultura em ágar SuperCARBA. Foram detectados três isolados (P3, P7 e P9) que apresentaram colônias mistas de *K. pneumoniae*, sensíveis e resistentes à ceftazidima-avibactam. Os isolados resistentes dos pacientes 2 e 7 haviam sido reportados na rotina do laboratório como sensíveis à ceftazidima-avibactam (Tabela 8).

A pesquisa de carbapenemases pelo teste Blue-Carba foi negativa para todos os isolados resistentes à ceftazidima-avibactam, com exceção dos isolados M5191546 e N4214030, que apresentaram Blue-Carba positivo. Para os isolados pareados de *K. pneumoniae*, sensíveis à ceftazidima-avibactam, o teste Blue-Carba foi positivo (Tabela 8).

5.3 ISOLADOS DE *K. pneumoniae* SENSÍVEIS À CEFTAZIDIMA-AVIBACTAM

Todos os seis isolados pareados disponíveis para este estudo, sensíveis à ceftazidima-avibactam, pertenciam à espécie *K. pneumoniae*. Apenas o gene *bla_{KPC}* foi identificado nestes isolados após a PCR multiplex para a detecção dos principais genes de carbapenemases. A sequência nucleotídica completa de *bla_{KPC}* evidenciou que seis isolados eram produtores de KPC-2 (P2, P3, P7, P9 e P14) e um isolado era produtor de KPC-3 (P1) (Tabela 8)

5.4 ISOLADOS DO COMPLEXO *K. pneumoniae* RESISTENTES À CEFTAZIDIMA-AVIBACTAM

5.4.1 Identificação das espécies e frequência de variantes de KPC

Todos os isolados do Complexo *K. pneumoniae* resistentes à ceftazidima-avibactam e produtores de variantes KPC (n=46), eram da espécie *K. pneumoniae*, com exceção do isolado M8153373 (P16), identificado como *K. quasipneumoniae* (Tabela 5). Após análises do perfil alélico das variantes KPC, foi verificado que 35 isolados albergavam variantes de KPC já descritas na literatura: KPC-8 (n=1); KPC-14 (n=2); KPC-25 (n=1); KPC-31 (n=2); KPC-33 (n=18); KPC-35 (n=1); KPC-44 (n=1);

KPC-61 (n=2); KPC-68 (n=1); KPC-71 (n=1); KPC-78 (n=1) KPC-81 (n=1) e KPC-90 (n=3), sendo KPC-33 a variante mais frequente (36%). Outras 11 novas variantes KPC foram identificadas (Tabela 5 e Figura 6).

Tabela 5- Variantes KPC relacionadas com a resistência à ceftazidima-avibactam entre isolados do Complexo *K. pneumoniae* identificadas neste estudo

Paciente	ID	Data coleta	Espécie	KPC variante
P1	MV940851	14/07/2019	<i>Kp</i>	KPC-31
P2	L1315312-2	31/07/2019	<i>Kp</i>	KPC-103*
P2	L2304797	24/08/2019	<i>Kp</i>	KPC-103*
P3	L6132350	13/12/2019	<i>Kp</i>	KPC-90
P4	L7202969	20/01/2020	<i>Kp</i>	KPC-90
P5	L8263415	19/02/2020	<i>Kp</i>	KPC-33
P6	L9034133	28/02/2020	<i>Kp</i>	KPC-61
P7	X0200730-2	26/07/2020	<i>Kp</i>	KPC-25
P7	M5282978	24/09/2020	<i>Kp</i>	KPC-105*
P8	M4114532	11/08/2020	<i>Kp</i>	KPC-61
P9	M6284360-1	27/10/2020	<i>Kp</i>	KPC-107*
P10	M5191546	14/09/2020	<i>Kp</i>	KPC-8
P11	M7173549	12/11/2020	<i>Kp</i>	KPC-104*
P12	M7213934	17/11/2020	<i>Kp</i>	KPC-139*
P13	M7233093	17/11/2020	<i>Kp</i>	KPC-81
P14	M8143992	25/12/2020	<i>Kp</i>	KPC-14
P15	M8161891	15/12/2020	<i>Kp</i>	KPC-33
P16	M8153373	15/12/2020	<i>Kqp</i>	KPC-25
P17	M9171130	05/01/2021	<i>Kp</i>	KPC-108*
P18	N0244028	19/02/2021	<i>Kp</i>	KPC-106*
P19	N1062450	05/03/2021	<i>Kp</i>	KPC-33
P20	N0194414	05/03/2021	<i>Kp</i>	KPC-140*
P21	N1301621	25/03/2021	<i>Kp</i>	KPC-90
P22	N2053077	05/04/2021	<i>Kp</i>	KPC-33
P23	N2192196	14/04/2021	<i>Kp</i>	KPC-141*
P24	N2233293	19/04/2021	<i>Kp</i>	KPC-33
P25	N3041884	22/04/2021	<i>Kp</i>	KPC-33
P26	N2251932	25/04/2021	<i>Kp</i>	KPC-78
P27	N3073609	03/05/2021	<i>Kp</i>	KPC-33
P28	N3114796	11/05/2021	<i>Kp</i>	KPC-33
P29	N3182918	12/05/2021	<i>Kp</i>	KPC-142*
P30	N3133201	13/05/2021	<i>Kp</i>	KPC-31
P31	M3214378	15/05/2021	<i>Kp</i>	KPC-71

continua

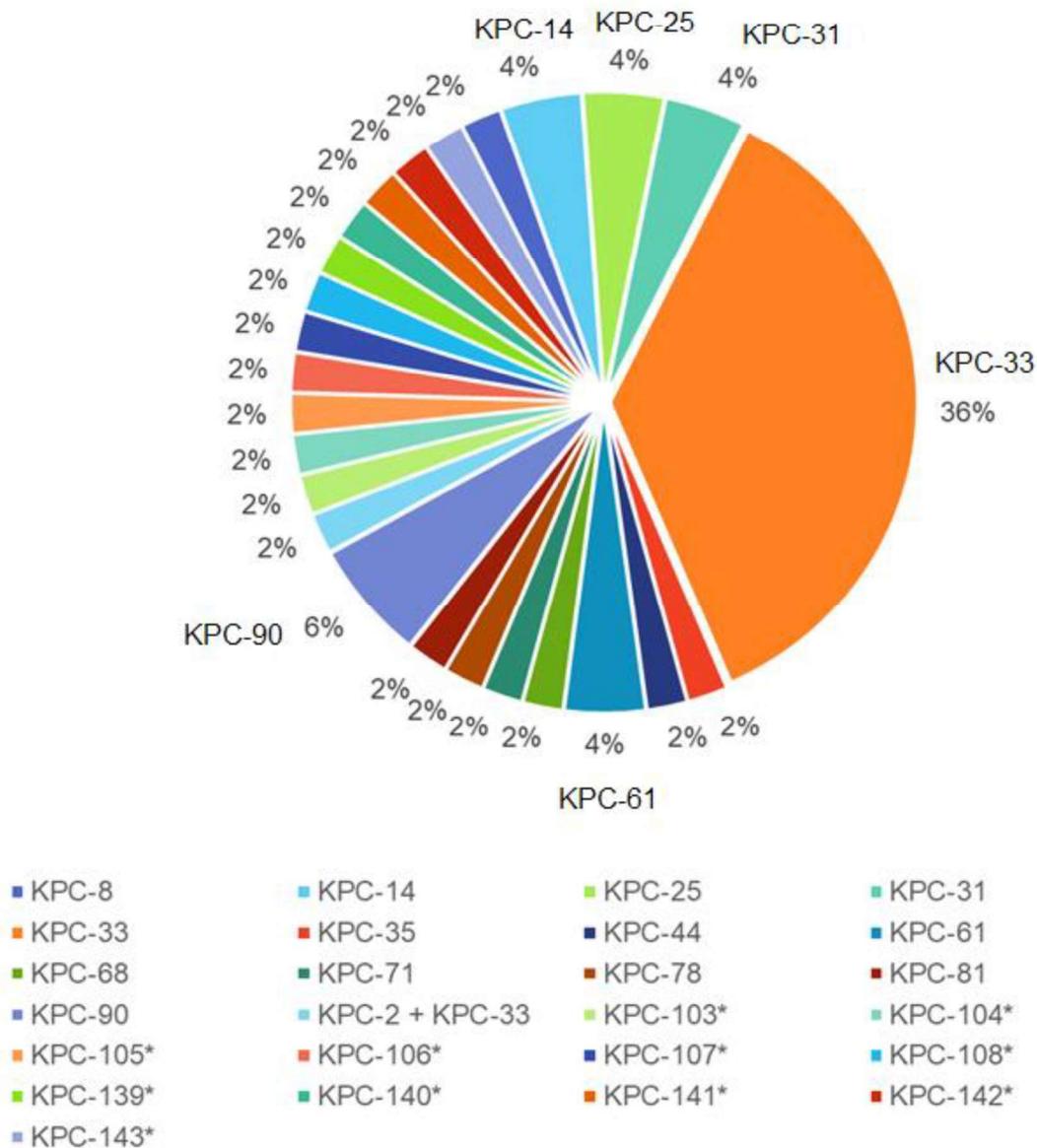
P32	N4043220	01/06/2021	<i>Kp</i>	KPC-68
P33	N4034288	03/06/2021	<i>Kp</i>	KPC-33
P34	N4103871	05/06/2021	<i>Kp</i>	KPC-143*
P35	N4213107	20/06/2021	<i>Kp</i>	KPC-33
P36	N4214030	21/06/2021	<i>Kp</i>	KPC-33 e KPC-2
P37	N4292977	22/06/2021	<i>Kp</i>	KPC-33
P38	N5023179	25/06/2021	<i>Kp</i>	KPC-33
P39	N4293546	30/06/2021	<i>Kp</i>	KPC-33
P40	N5061391	05/07/2021	<i>Kp</i>	KPC-33
P41	N5062754	06/07/2021	<i>Kp</i>	KPC-33
P42	N5071671	07/07/2021	<i>Kp</i>	KPC-35
P43	N5194041	14/07/2021	<i>Kp</i>	KPC-33
P44	N5221210	22/07/2021	<i>Kp</i>	KPC-33
P45	N5221227	22/07/2021	<i>Kp</i>	KPC-44
P46	N5303358	30/07/2021	<i>Kp</i>	KPC-14

conclusão

Legenda: *Kp*: *Klebsiella pneumoniae*; *Kqp*: *Klebsiella quasipneumoniae*; (*): novas variantes descritas neste estudo.

Fonte: Produzida pela autora.

Figura 6- Percentual de variantes KPC identificadas entre isolados do Complexo *K. pneumoniae* resistentes à ceftazidima-avibactam

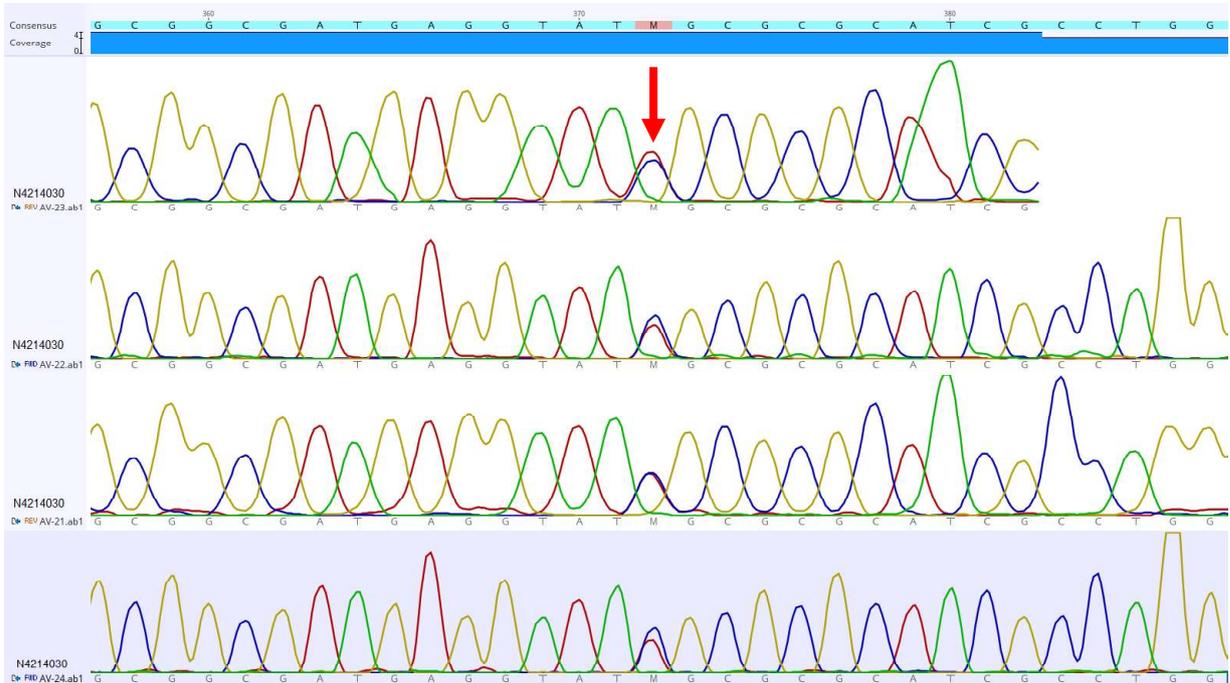


Legenda: (*): variantes detectadas neste estudo.

Fonte: Produzida pela autora.

O isolado N4214030 (P36), Blue-Carba positivo, apresentou as variantes KPC-33 e KPC-2 coexistindo no mesmo isolado clínico. Esta coexistência na mesma célula bacteriana foi comprovada pela observação da presença de dois picos distintos superpostos no eletroferograma no sequenciamento de Sanger dos produtos da PCR para sequenciamento completo do gene *bla_{KPC}* (Figura 7).

Figura 7- Eletroferograma do sequenciamento dos produtos da PCR do gene *bla_{KPC}* do isolado N4214030



Nota: A seta vermelha indica a duplicação dos picos no eletroferograma.

Fonte: Figura gerada no programa Geneious Prime pela autora.

5.4.2 Identificação de novas variantes KPC

Onze novas variantes de KPC foram identificadas neste estudo e as sequências nucleotídicas completas dos genes que as codificam foram depositadas no GenBank, sendo denominadas como *bla_{KPC}*-103 a *bla_{KPC}*-108 (OP503887-OP503891) e *bla_{KPC}*-139 a *bla_{KPC}*-143 (OL445423-OL445428) (Tabela 6).

Tabela 6- Novas variantes de KPC identificadas neste estudo

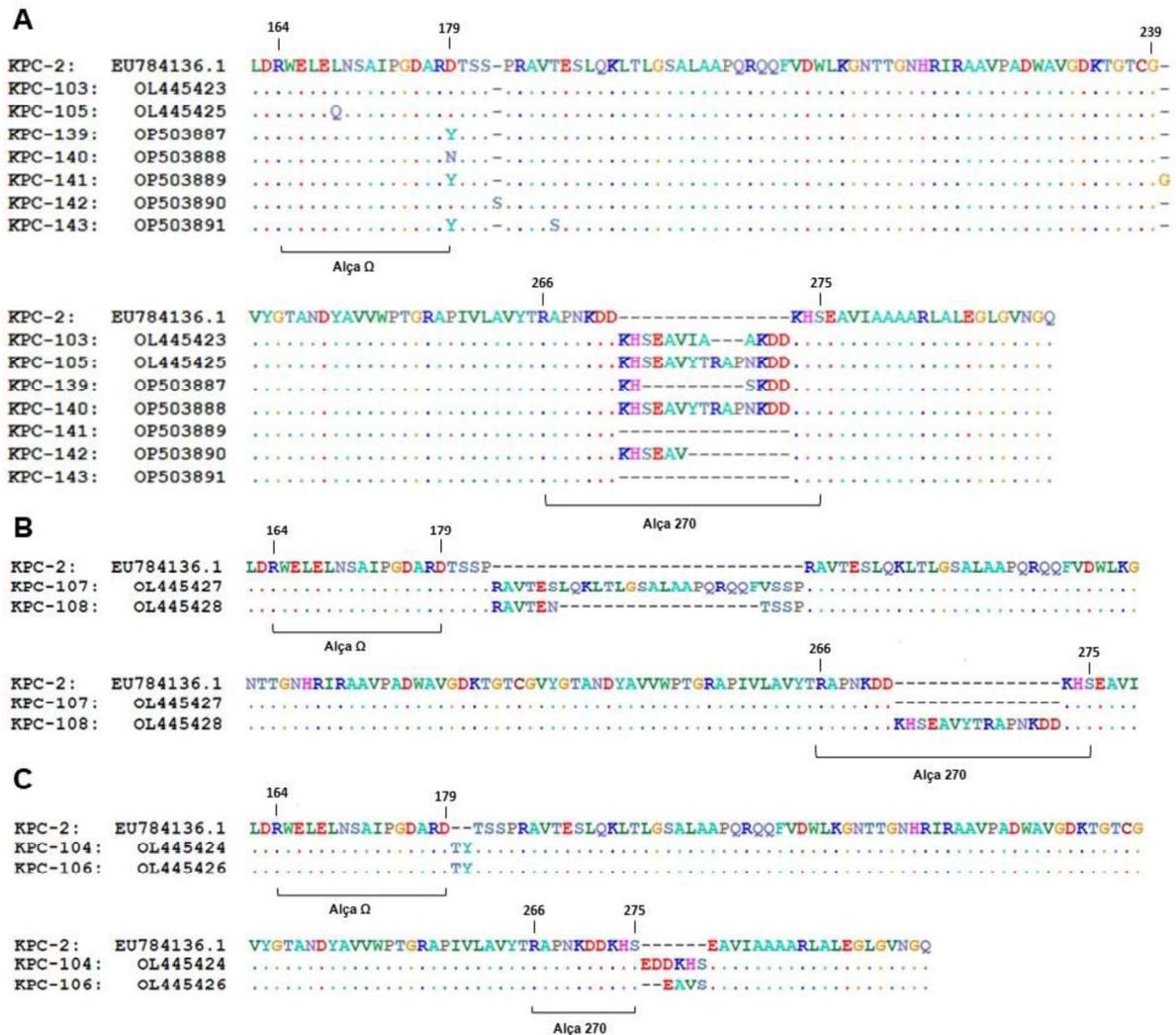
ID	Variante KPC	Número GenBank	Alteração na sequência de aminoácidos
L2304797	KPC-103	OL445423	Ins_271_KHSEAVIAAKDD
M7173549	KPC-104	OL445424	Ins_179_TY; Ins_271_KHSEDD
M5282978	KPC-105	OL445425	L169Q; Ins_271_KHSEAVYTRAPNKDD
N0244028	KPC-106	OL445426	Ins_179_TY; Ins_273_SEAV
M6284360	KPC-107	OL445427	Ins_196_SALAAPQRQQFVSSPRAVTESLQKLTGLG
M9171130	KPC-108	OL445428	Ins_183_RAVTENTSSP; Ins_271_KHSEAVYTRAPNKDD
M7213934	KPC-139	OP503887	D179Y; Ins_271_KHSEKDD
N0194414	KPC-140	OP503888	D179N; Ins_271_KHSEAVYTRAPNKDD
N2192196	KPC-141	OP503889	D179Y; Ins_239_G
N3182918	KPC-142	OP503890	Ins_182_S; Ins_271_KHSEAV
N4103871	KPC-143	OP503891	D179Y; T187S

Fonte: Produzida pela autora.

Todas as novas variantes de KPC foram derivadas de KPC-2, pois não possuem a substituição H274Y, presente na KPC-3. A substituição D179Y estava presente em três das 11 novas variantes encontradas neste estudo (Figura 8A). A KPC-140 apresentou uma substituição de aminoácidos nessa mesma região (D179N) (Figura 8A). As variantes KPC-107 e KPC-108 apresentaram substituições de aminoácidos próximos à alça Ω (Figura 8B) e as variantes KPC-104 e KPC-106 apresentaram uma inserção de dois aminoácidos na posição 179 de Ambler (D179_TY) (Figura 8C).

Oito das onze novas variantes de KPC apresentaram duplicações de aminoácidos adjacentes ao ponto de inserção, dentro ou próximo da alça 270 (Figura 8). Apenas a KPC-141 apresentou substituição na alça 240 (ins_239G) (Figura 8A).

Figura 8- Alinhamento das seqüências de aminoácidos de KPC-2 com as novas variantes de KPC identificadas neste estudo



A – Alinhamento das seqüências parciais de aminoácidos das KPCs 103, 105, 139, 140, 141, 142 e 143 com KPC-2; B - Alinhamento das seqüências parciais de aminoácidos das KPCs 107 e 108 com KPC-2; C- Alinhamento das seqüências parciais de aminoácidos das KPCs 104 e 106 com KPC-2.

Fonte: Produzida pela autora.

5.4.3 Avaliação da presença de outros genes de betalactamases entre isolados resistentes à ceftazidima-avibactam com sequenciamento NGS

Nenhum outro gene de carbapenemase foi detectado nos isolados resistentes à ceftazidima-avibactam com sequenciamento NGS. Apenas genes de ESBL foram identificados, sendo: *bla*_{TEM-1} (n=20); *bla*_{CTX-M-14} (n=7); *bla*_{CTX-M-15} (n=6); *bla*_{OXA-1} (n=5); *bla*_{OXA-2} (n=6); *bla*_{LAP-2} (n=4); *bla*_{SHV-5} (n=1) e *bla*_{TEM-84} (n=1). Os isolados L6132350 e N0244028 apresentaram os genes *bla*_{CTX-M-15} e *bla*_{TEM-1}, respectivamente, no mesmo plasmídeo de *bla*_{KPC} (Tabela 7).

5.4.4 Análise dos plasmídeos que albergam variantes *bla*_{KPC}

5.4.4.1 Grupos de Incompatibilidade

Diferentes grupos de incompatibilidade foram detectados entre os isolados resistentes à ceftazidima-avibactam com sequenciamento NGS, sendo IncN (n=12) e IncF com replicons FII(K) e/ou FIB (n=12) os grupos mais frequentes, seguido de IncX3-IncU (n=9) e IncQ1 (n=1). Não foi possível identificar o grupo de incompatibilidade dos plasmídeos que albergam os genes *bla*_{KPC} em três isolados, sequenciados apenas na plataforma Illumina. O isolado N4214030, além de apresentar um plasmídeo com replicons IncFII(K)-FIB, albergando a variante *bla*_{KPC-33}, também apresentou um plasmídeo (ColRNAI) de 19,2 kb albergando *bla*_{KPC-2} (Tabela 7 e Anexo 2).

Os plasmídeos IncX3-IncU foram associados, em sua maioria, a isolados do ST258, detectados em SP. Os plasmídeos IncN foram detectados a partir de isolados recuperados nos Estados de SP e RS. A maioria desses isolados pertencia ao ST11. Os plasmídeos IncF foram detectados apenas em hospitais do estado de São Paulo, sendo associados a isolados pertencentes aos grupos clonais ST11 (n=7), ST512 (n=2), e ST16 (n=2) (Tabela 7 e Anexo 2).

Tabela 7- Características dos plasmídeos com *bla_{KPC}* detectados neste estudo e grupos clonais dos isolados que os albergam

ID	GI/Replicons	Tamanho (pb)	KPC variante	Estado	ST	Genes de BL colocados com <i>bla_{KPC}</i>	Outros genes de BL	NGS
M4114532	IncFIB	104.699	KPC-61	SP	ST11	-	<i>bla_{SHV-11}</i> ; <i>bla_{TEM-1}</i> ; <i>bla_{CTX-M-2}</i> ; <i>bla_{OXA-2}</i>	Illumina/MinION
N3133201	IncFII(K)	ND	KPC-31	SP	ST512	ND	<i>bla_{SHV-11}</i> ; <i>bla_{TEM-84}</i>	Illumina
N4043220	IncFII(K)	ND	KPC-68	SP	ST512	ND	<i>bla_{SHV-11}</i> ; <i>bla_{TEM-1}</i>	Illumina
N4034288	IncFII(K)	ND	KPC-33	SP	ST11	ND	<i>bla_{SHV-11}</i> ; <i>bla_{OXA-2}</i> ; <i>bla_{CTX-M-2}</i> ; <i>bla_{TEM-1}</i>	Illumina
L7202969	IncFII(K)	ND	KPC-90	SP	ST11	ND	<i>bla_{SHV-11}</i> ; <i>bla_{TEM-1}</i> ; <i>bla_{CTX-M-15}</i> ; <i>bla_{OXA-1}</i> ; <i>bla_{LAP-2}</i>	Illumina
N1301621	IncFII(K)	ND	KPC-90	SP	ST16	ND	<i>bla_{SHV-1}</i> ; <i>bla_{CTX-M-15}</i>	Illumina
M7213934	IncFII(K)-IncFIB	115.778	KPC-139*	SP	ST11	-	<i>bla_{SHV-11}</i> ; <i>bla_{TEM-1}</i> ; <i>bla_{OXA-2}</i>	Illumina/ MinION
L6132350	IncFII(K)-IncFIB	114.951	KPC-90	SP	ST11	<i>bla_{TEM-1}</i>	<i>bla_{SHV-11}</i> ; <i>bla_{CTX-M-15}</i> ; <i>bla_{OXA-1}</i> ; <i>bla_{LAP-2}</i>	Illumina/ MinION
N2251932	IncFII(K)-IncFIB	114.932	KPC-78	SP	ST11	-	<i>bla_{SHV-11}</i>	Illumina/ MinION
M7173549	IncFII(K)-IncFIB	112.442	KPC-104*	SP	ST11	-	<i>bla_{SHV-11}</i> ; <i>bla_{TEM-1}</i> ; <i>bla_{OXA-2}</i>	Illumina/ MinION
N0244028	IncFII(K)-IncFIB	211.359	KPC-106*	SP	ST16	<i>bla_{CTX-M-15}</i>	<i>bla_{SHV-1}</i>	Illumina/ MinION
N4214030	IncFII(K)-IncFIB ColRNAI	114.933 19.206	KPC-33 KPC-2	SP	ST11	-	<i>bla_{SHV-11}</i> ; <i>bla_{CTX-M-2}</i> ; <i>bla_{OXA-2}</i>	Illumina/ MinION
N1062450	IncN	ND	KPC-33	SP	ST11	ND	<i>bla_{SHV-11}</i>	Illumina
N0194414	IncN	46.577	KPC-140*	RJ	ST11	-	<i>bla_{SHV-11}</i>	Illumina/ MinION
M3214378	IncN	ND	KPC-71	RJ	ST11	ND	<i>bla_{SHV-11}</i>	Illumina
N5221227	IncN	ND	KPC-44	RJ	ST11	ND	<i>bla_{SHV-11}</i>	Illumina
M5191546	IncN	102.430	KPC-8	SP	ST11	-	<i>bla_{SHV-11}</i> ; <i>bla_{TEM-1}</i>	Illumina/ MinION
M8143992	IncN	56.206	KPC-14	SP	ST11	-	<i>bla_{SHV-11}</i> ; <i>bla_{LAP-2}</i>	Illumina/ MinION

Continua

N4103871	IncN	47.969	KPC-143*	SP	ST11	-	<i>bla</i> _{SHV-11} ; <i>bla</i> _{OXA-1} ; <i>bla</i> _{LAP-2}	llumina/ MinION
MV940851	IncN	75.949	KPC-31	RS	ST11	-	<i>bla</i> _{SHV-11} ; <i>bla</i> _{TEM-1}	llumina/ MinION
L8263415	IncN	85.230	KPC-33	RS	ST11	-	<i>bla</i> _{SHV-11} ; <i>bla</i> _{TEM-1} ; <i>bla</i> _{CTX-M-2}	llumina/ MinION
L9034133	IncN	85.280	KPC-61	RS	ST11	-	<i>bla</i> _{SHV-11}	llumina/ MinION
N2053077	IncN	ND	KPC-33	SP	ST11	ND	<i>bla</i> _{SHV-11} ; <i>bla</i> _{TEM-1} ; <i>bla</i> _{CTX-M-2}	llumina
N5071671	IncN	84.456	KPC-35	SP	ST16	-	<i>bla</i> _{SHV-1}	llumina/ MinION
N3114796	IncQ1	ND	KPC-33	SP	ST11	ND	<i>bla</i> _{SHV-11}	llumina
M6284360	IncX3/IncU	46.544	KPC-107*	SP	ST258	-	<i>bla</i> _{SHV-11} ; <i>bla</i> _{TEM-1} ; <i>bla</i> _{CTX-M-14}	llumina/ MinION
M7233093	IncX3/IncU	46.359	KPC-81	SP	ST258	-	<i>bla</i> _{SHV-11} ; <i>bla</i> _{TEM-1} ; <i>bla</i> _{CTX-M-14}	llumina/ MinION
N2192196	IncX3/IncU	46.623	KPC-141*	SP	ST258	-	<i>bla</i> _{SHV-11} ; <i>bla</i> _{TEM-1} ; <i>bla</i> _{CTX-M-14}	llumina/ MinION
N3182918	IncX3/IncU	46.481	KPC-142*	SP	ST258	-	<i>bla</i> _{SHV-11} ; <i>bla</i> _{TEM-1} ; <i>bla</i> _{CTX-M-14}	llumina/ MinION
N4213107	IncX3/IncU	46.362	KPC-33	SP	ST258	-	<i>bla</i> _{SHV-11} ; <i>bla</i> _{TEM-1} ; <i>bla</i> _{CTX-M-14}	llumina/ MinION
M9171130	IncX3/IncU	46.493	KPC-108*	DF	ST258	-	<i>bla</i> _{SHV-11} ; <i>bla</i> _{TEM-1} ; <i>bla</i> _{CTX-M-14}	llumina/ MinION
L2304797	IncX3/IncU	46.300	KPC-103*	SP	ST258	-	<i>bla</i> _{SHV-11} ; <i>bla</i> _{TEM-1} ; <i>bla</i> _{CTX-M-14}	llumina/ MinION
X0200730	IncX3/IncU	ND	KPC-25	SP	ST16	ND	<i>bla</i> _{SHV-1} ; <i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>bla</i> _{OXA-1}	llumina
M5282978	IncX3/IncU	46.665	KPC-105*	SP	ST16	-	<i>bla</i> _{SHV-1} ; <i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>bla</i> _{OXA-1}	llumina/ MinION
N5303358	NT	ND	KPC-14	SP	ST11	ND	<i>bla</i> _{SHV-11} ; <i>bla</i> _{TEM-1}	llumina
M8161891	NT	ND	KPC-33	SP	ST11	ND	<i>bla</i> _{SHV-11} ; <i>bla</i> _{OXA-2} ; <i>bla</i> _{TEM-1}	llumina
M8153373	NT	ND	KPC-25	SP	ST367	ND	<i>bla</i> _{SHV-5} ; <i>bla</i> _{OKP}	llumina

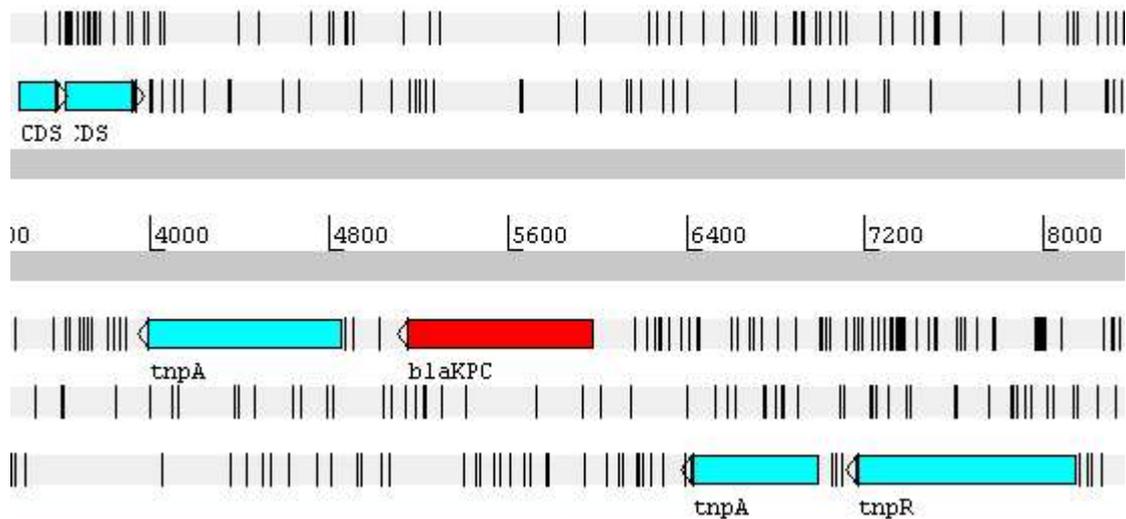
conclusão

Legenda: GI: grupo de incompatibilidade; NT: não tipável; (*): novas variantes descritas neste estudo; NGS: Sequenciamento de Nova Geração; ST - Tipo de sequência definido por tipagem de sequência multiflocos; ND – não determinado; BL - betalactamase.
Fonte: Produzida pela autora.

5.4.4.2 Contexto genético de *bla*_{KPC} associados a plasmídeos IncX3-IncU

Oito isolados albergavam variantes *bla*_{KPC} associadas a plasmídeos de aproximadamente 46 kb. Esses plasmídeos pertenciam a um grupo híbrido de incompatibilidade (IncX3-IncU). O gene *bla*_{KPC} nesses isolados foi associado a um elemento genético não-Tn4401 (NTE_{KPC}) (Figura 9).

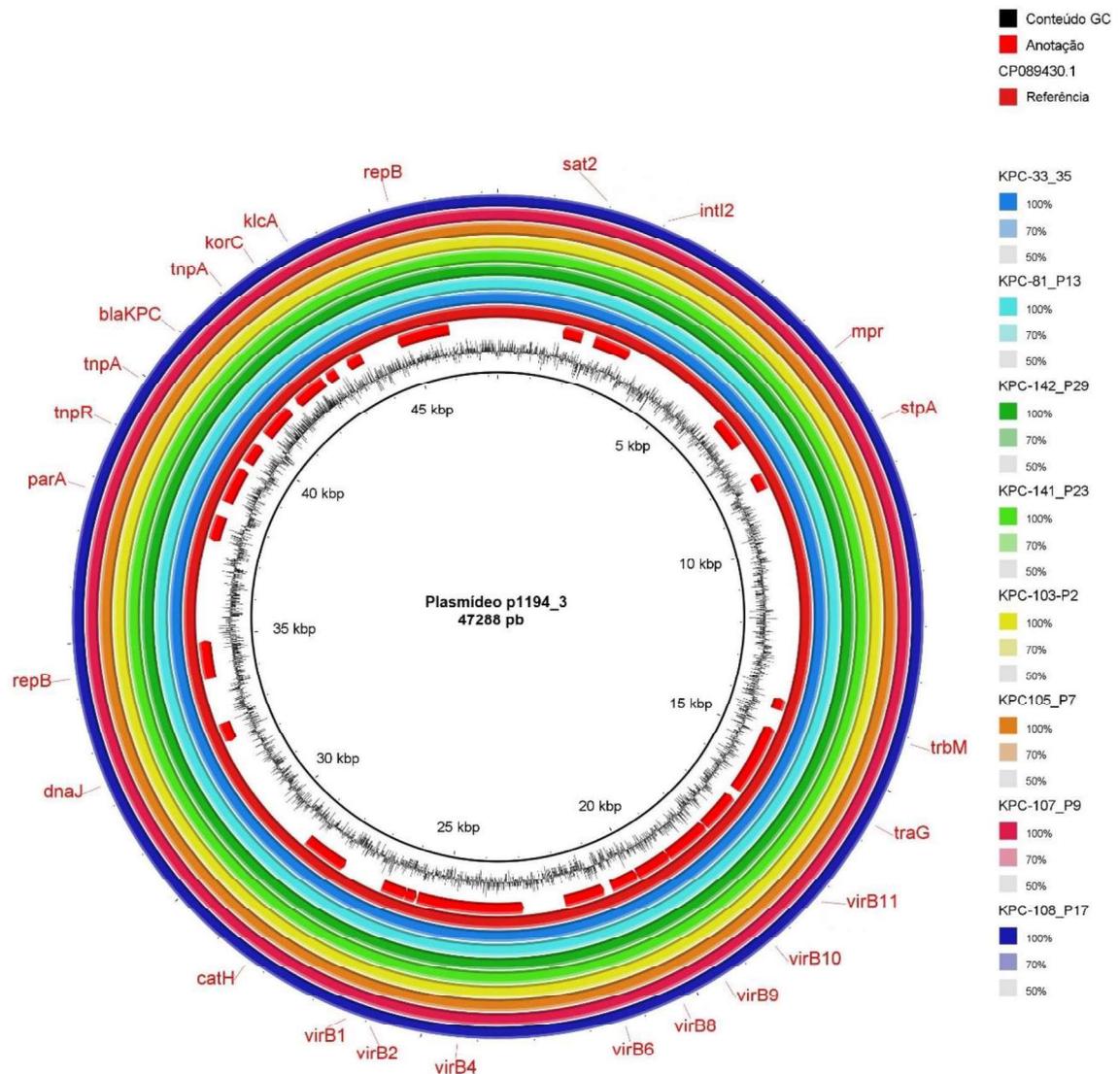
Figura 9- Contexto genético de *bla*_{KPC} associados a plasmídeos IncX3-IncU



Fonte: Figura gerada no programa Artemis pela autora.

Quando os plasmídeos IncX3-IncU detectados neste estudo foram comparados no BLAST, eles apresentaram maior cobertura (100%) e identidade de nucleotídeos (99,9% a 100%) com um plasmídeo de *K. pneumoniae* detectado em São Paulo (CP089430.1). A similaridade entre esses plasmídeos foi visualizada no programa BRIG (Figura 10).

Figura 10- Comparação de plasmídeos IncX3-IncU identificados neste estudo com o plasmídeo p1194_3 (CP089430.1)



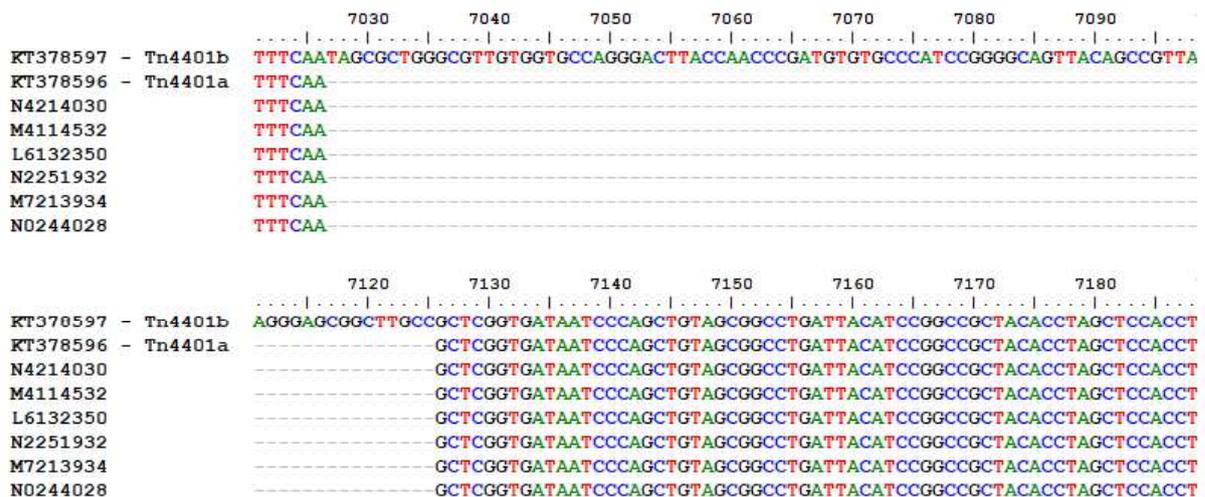
Nota: A sequência nucleotídica do plasmídeo p1194_3 (CP089430.1) (em vermelho) foi comparada com os plasmídeos do grupo de incompatibilidade IncX3-IncU detectados neste estudo. As cores na legenda indicam a porcentagem de identidade quando comparado com o plasmídeo p1194_3.

Fonte: Figura gerada no programa BRIG pela autora.

5.4.4.3 Contexto genético de *bla*_{KPC} associados a plasmídeos IncF

Cinco isolados albergavam *bla*_{KPC}, associados ao Tn4401. Quando as sequências nucleotídicas do transpóson foram comparadas com isoformas conhecidas do Tn4401, as sequências apresentaram identidade com a isoforma Tn4401a e pertenciam ao grupo de incompatibilidade IncF (Figura 11).

Figura 11- Alinhamento de sequências nucleotídicas do Tn4401 de plasmídeos IncF com as isoformas a e b do Tn4401

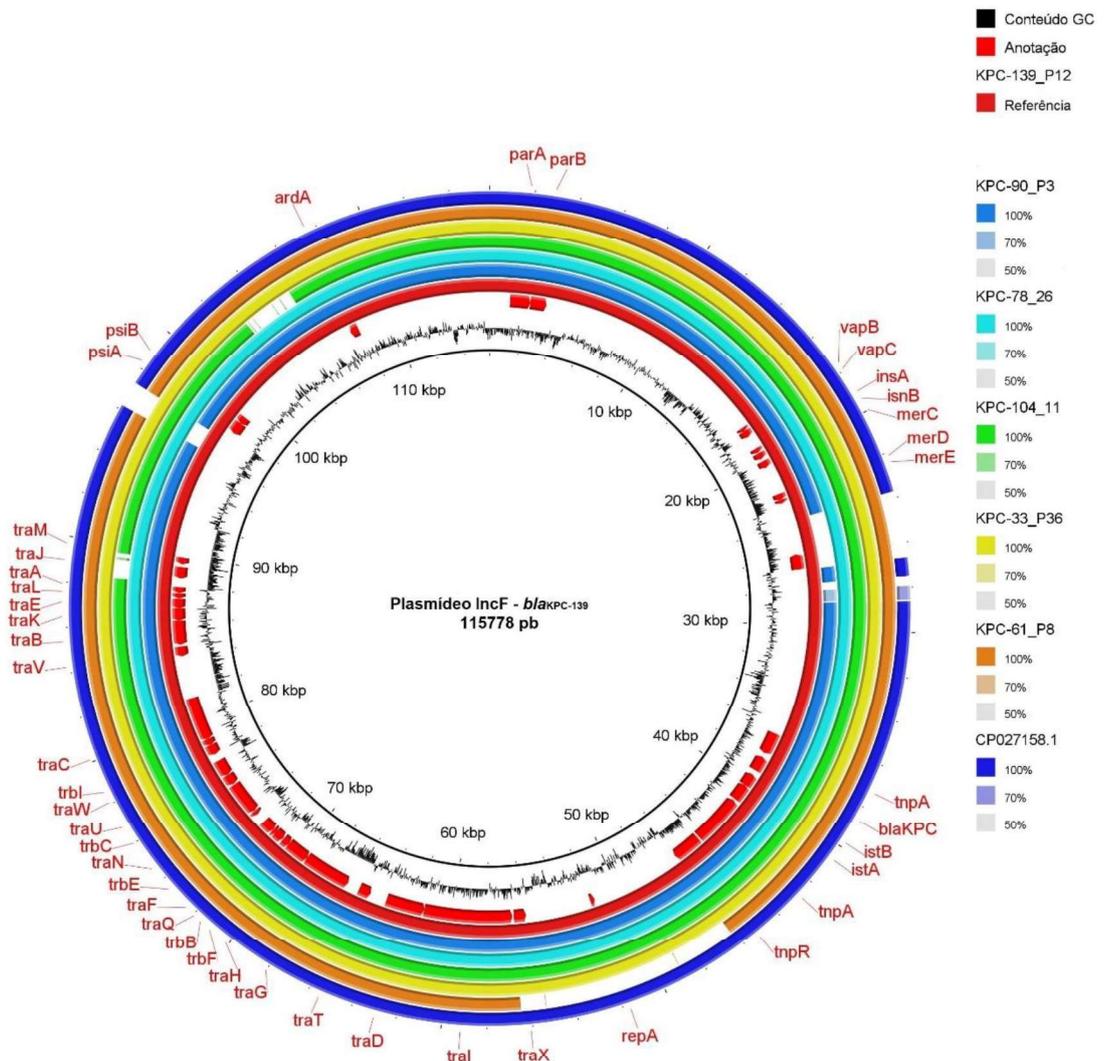


Nota: O alinhamento evidencia a região de deleção (98pb) identificada à montante do gene *bla*_{KPC} do Tn4401a

Fonte: Figura gerada no programa BioEdit pela autora.

Os plasmídeos IncF, de aproximadamente 112kb, apresentaram maior cobertura (87-100%) e identidade de nucleotídeos (>99%) com um plasmídeo (~113kb), proveniente de uma cepa de *K. pneumoniae* detectada nos EUA (CP027158.1) (Figura 12).

Figura 12- Comparação de plasmídeos IncF identificados neste estudo e plasmídeo CP02158.1 com o plasmídeo IncF albergando *bla*_{KPC-139}



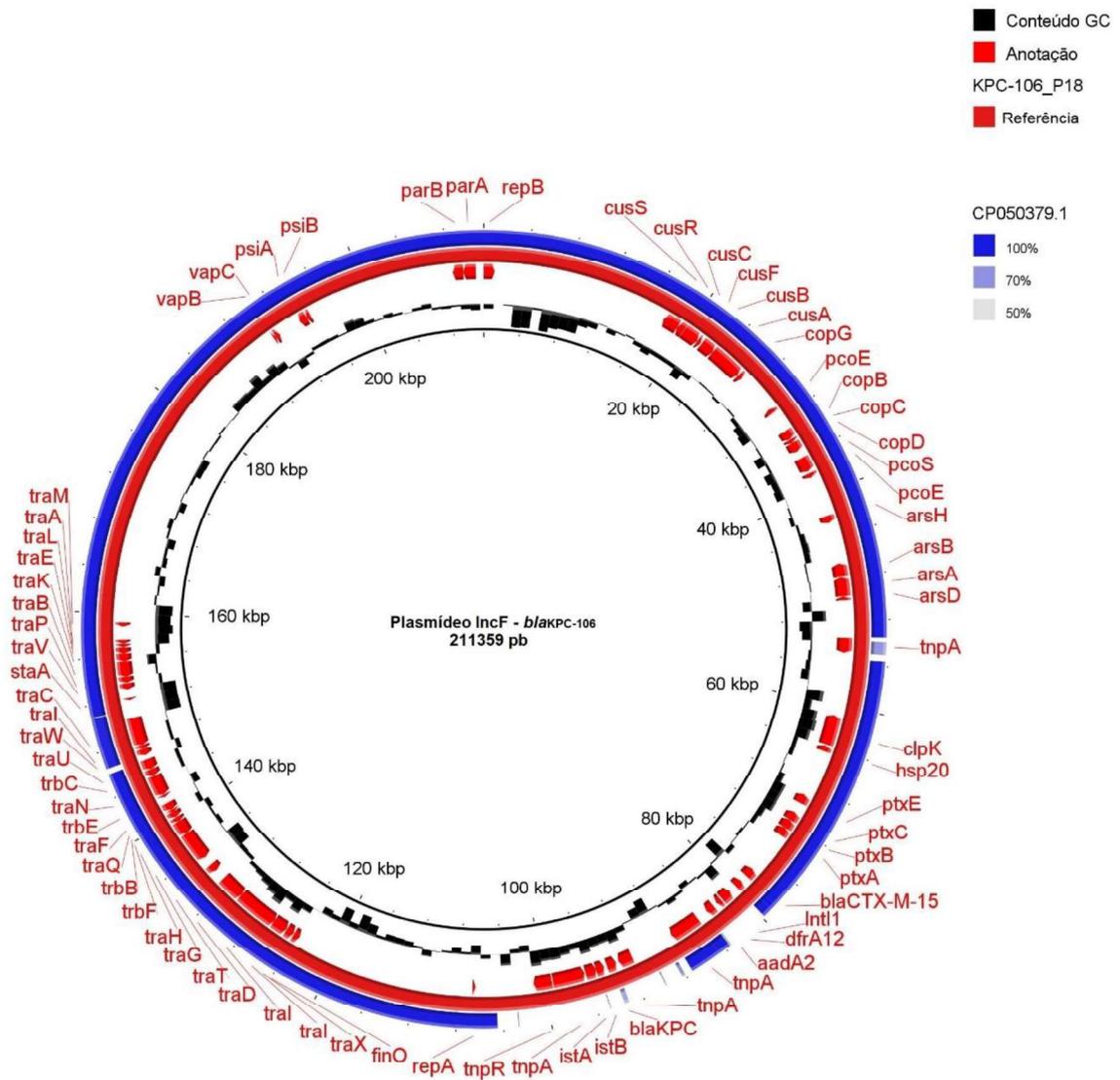
Nota: A sequência nucleotídica do plasmídeo que alberga o gene *bla*_{KPC-139} (em vermelho) foi comparada com os demais plasmídeos do mesmo grupo de incompatibilidade IncF detectados neste estudo e com o plasmídeo CP02158.1 detectado nos EUA. As cores na legenda indicam a porcentagem de identidade quando comparado com o plasmídeo IncF-*bla*_{KPC-139}

Fonte: Figura gerada no programa BRIG pela autora.

Um isolado resistente à ceftazidima-avibactam (N0244028), albergando o gene *bla*_{KPC-106}, apresentou um plasmídeo de 211 kb. Quando comparado às sequências disponíveis no GenBank, utilizando-se o BLAST, esse plasmídeo apresentou alta cobertura (88%) e identidade (99,9%) com plasmídeo p51015_CTX_M_15 (CP050379.1) detectado nos Estados Unidos da América. A diferença observada foi a inserção do Tn4401 e outros dois genes de resistência

(*aadA2* e *dfrA12*) presentes em integron de classe 1 (Figura 13) em uma região onde havia três genes de betalactamase presentes: *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{TEM-1} e *bla*_{OXA-1}.

Figura 13- Comparação do plasmídeo IncF albergando *bla*_{KPC-106} com o plasmídeo p51015_CTX_M_15 (CP050379.1)



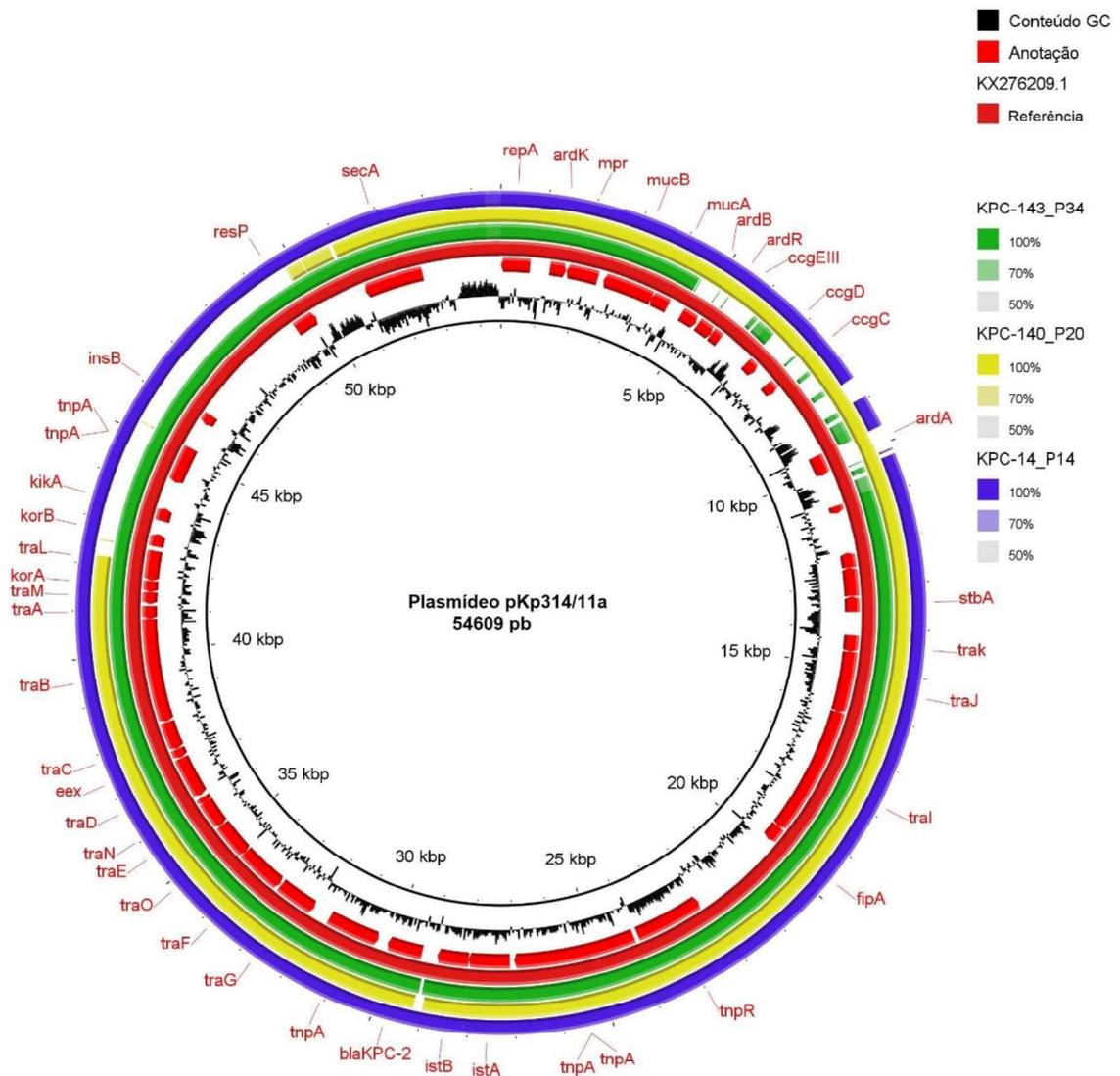
Nota: A sequência nucleotídica do plasmídeo que alberga o gene *bla*_{KPC-106} foi comparada com o plasmídeo p51015_CTX_M_15. As cores na legenda indicam a porcentagem de identidade quando comparado com o plasmídeo IncF-*bla*_{KPC-106}.

Fonte: Figura gerada no programa BRIG pela autora.

5.4.4.4 Contexto genético de *bla*_{KPC} associados a plasmídeos IncN

Oito isolados carregavam plasmídeos contendo *bla*_{KPC} associados ao Tn4401 e pertenciam ao grupo de incompatibilidade IncN. Três plasmídeos (~50 kb) apresentaram maior similaridade e cobertura com um plasmídeo IncN (54,6 kb) de *K. pneumoniae*, albergando *bla*_{KPC-2}, detectado em São Paulo (KX276209.1). (Figura 14). Outros cinco plasmídeos (~86 kb) apresentaram maior similaridade com um plasmídeo IncN (123,2 kb), detectado em um isolado clínico de *K. pneumoniae* no Rio de Janeiro (CP018887.1), albergando *bla*_{KPC-2}. (Figura 15).

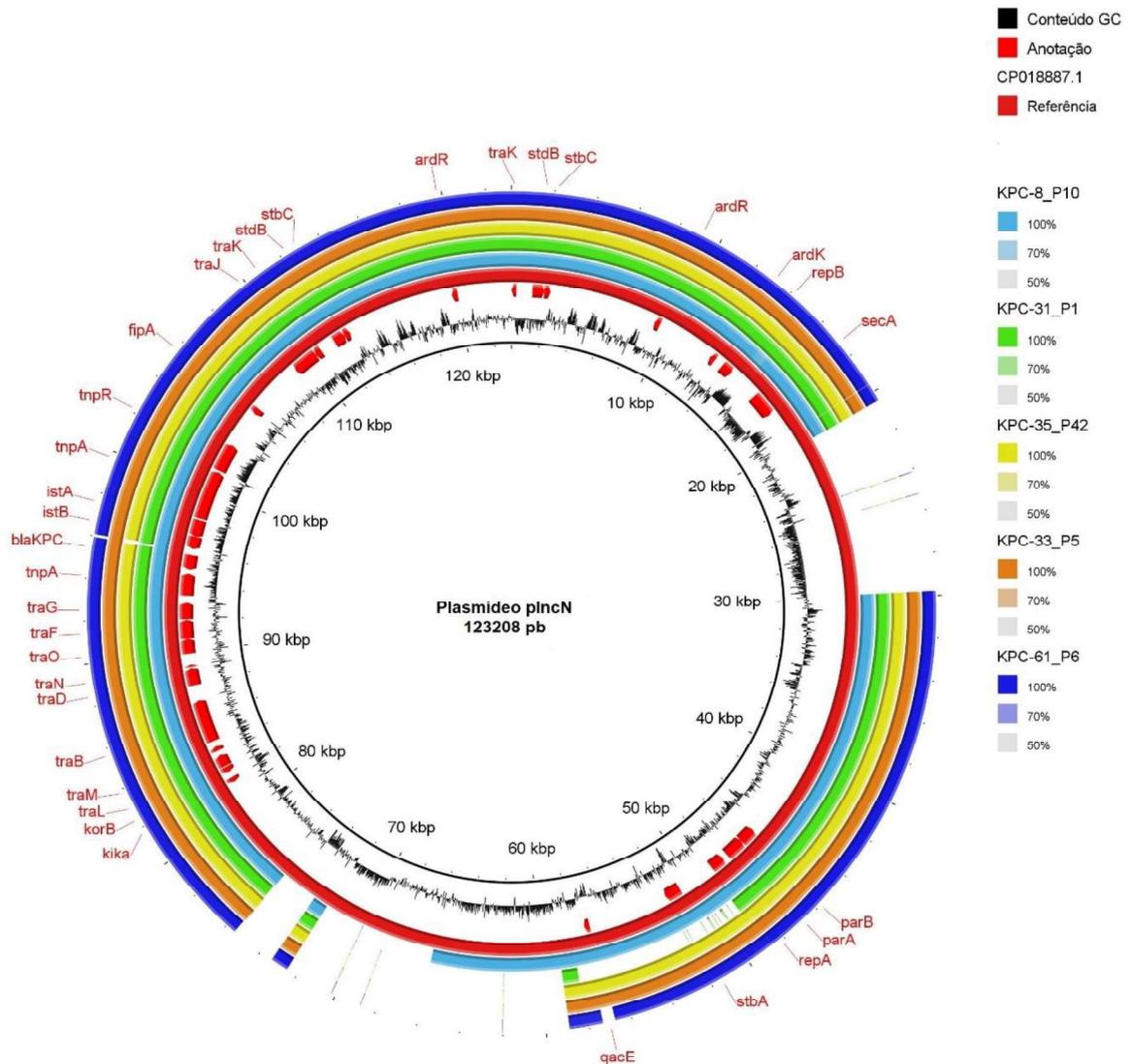
Figura 14- Comparação de plasmídeos IncN (~50 kb) identificados neste estudo com o plasmídeo pKp314/11a (KX276209.1)



Nota: A sequência nucleotídica do plasmídeo pKp314/11a (em vermelho) foi comparada com plasmídeos IncN (~50kb) detectados neste estudo. As cores na legenda indicam a porcentagem de identidade quando comparado com o plasmídeo pKp314/11a.

Fonte: Figura gerada no programa BRIG pela autora.

Figura 15- Comparação de plasmídeos IncN (~85 kb) identificados neste estudo com o plasmídeo plncN (CP018887.1)

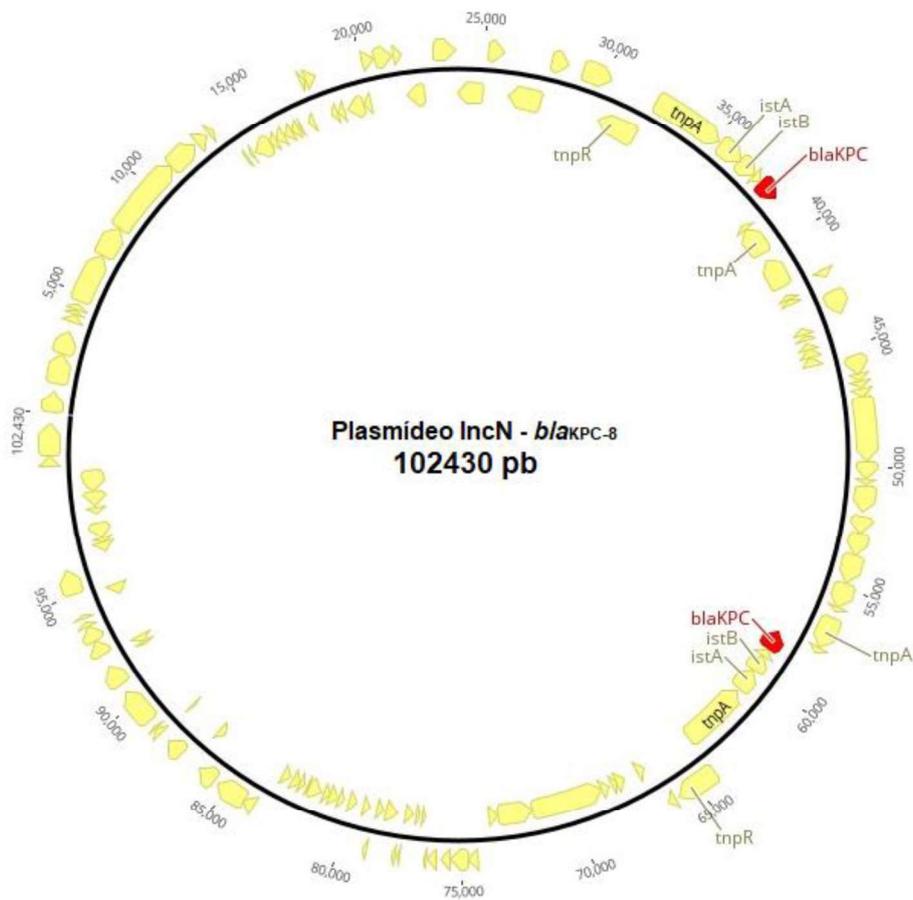


Nota: A sequência nucleotídica do plasmídeo plncN (em vermelho) foi comparada com plasmídeos IncN (~85kb) detectados neste estudo. As cores na legenda indicam a porcentagem de identidade quando comparado com o plasmídeo plncN.

Fonte: Figura gerada no programa BRIG pela autora.

O isolado M5191546 apresentou duas cópias da variante *bla*_{KPC-8} em seu plasmídeo, com inserção do *Tn4401b*, um na fita principal de DNA e a outra cópia na fita complementar (Figura 16).

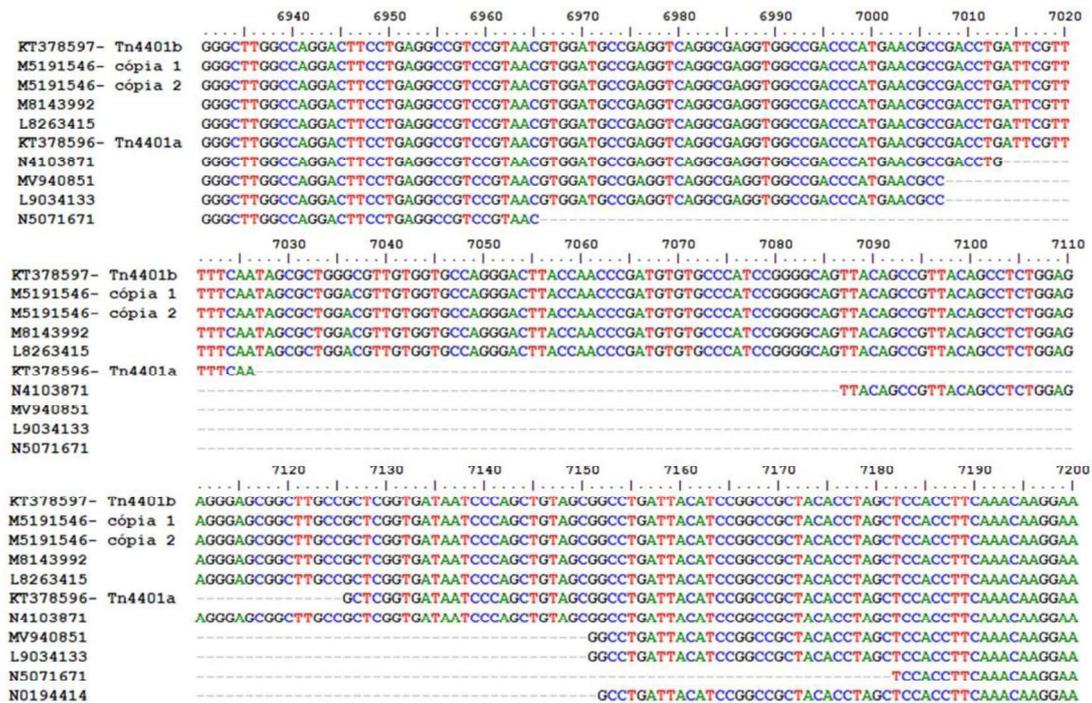
Figura 16- Plasmídeo IncN do isolado M5191546 albergando duas cópias de *bla*_{KPC-8} associadas ao *Tn4401b*



Fonte: Figura gerada no programa Geneious Prime pela autora.

O alinhamento das seqüências nucleotídicas do Tn 4401 (plasmídeos IncN) com as isoformas a e b do Tn 4401 evidenciou que os genes *bla_{KPC}* foram associados a diferentes isoformas desse transpósion (Figura 17).

Figura 17- Alinhamento de seqüências nucleotídicas do Tn4401 de plasmídeos IncN com as isoformas a e b do Tn4401



Nota: O alinhamento evidencia a região de deleção identificada à montante do gene *bla_{KPC}*: Tn4401b, P10, P14, P5: sem deleção; Tn4401a: Δ98pb; P34: Δ73pb; P1 e P6: Δ134pb; P42: Δ213; P20: Δ154.

Fonte: Figura gerada no programa BioEdit pela autora.

5.5 ANÁLISE DO PERFIL CLONAL DOS ISOLADOS DO COMPLEXO *K. pneumoniae* POR PFGE E MLST

Quando os perfis de PFGE dos seis isolados pareados, com fenótipos divergentes de sensibilidade à ceftazidima-avibactam, foram comparados, mostraram-se indistinguíveis (Figura 18).

O perfil clonal por PFGE foi avaliado para todos os isolados de *K. pneumoniae* resistentes à ceftazidima-avibactam. O grupo clonal A foi o mais numeroso, sendo detectado em amostras de 15 pacientes e em oito hospitais, localizados nas cidades de São Paulo (n=10), Campinas (n=4) e Brasília (n=1). A maioria desses isolados pertenciam ao complexo clonal ST258 (n=12). Outros dois isolados (P32 e P30), pertenciam ao ST512, sendo detectados em hospitais distintos. A variante mais frequente identificada nesse grupo foi a KPC-33 (n = 8). Três isolados resistentes à ceftazidima-avibactam, detectados a partir de três pacientes distintos, apresentaram perfis idênticos, sendo detectados em um mesmo hospital, em Campinas. Os três isolados albergavam o gene *bla*_{KPC-33} (Figura 18).

O grupo clonal B (ST11) foi detectado em isolados recuperados a partir de um único hospital, no Rio de Janeiro. Também fazia parte desse grupo, um isolado clínico (P19) recuperado de paciente atendido em um hospital localizado em São Paulo (Figura 18).

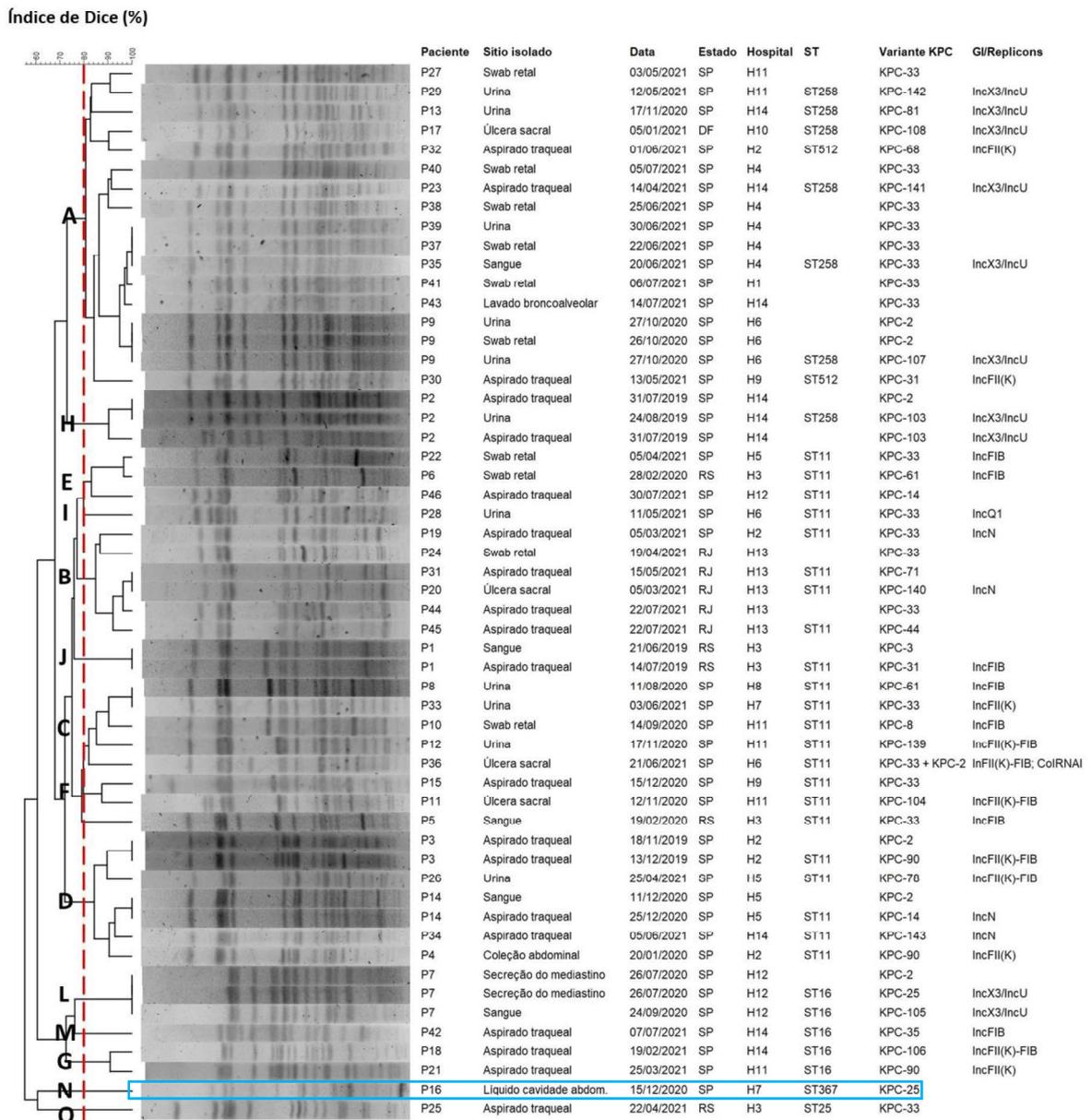
O grupo clonal E (ST11) foi detectado nas cidades de São Paulo (P22 e P46) e Porto Alegre (P6) (Figura 18).

Os grupos clonais C, D, F, G e H, e I foram detectados apenas em São Paulo, em diferentes hospitais e pertenciam ao ST11 (C, D, F e I), ST16 (G) e ST258 (H). (Figura 18).

Dois isolados do ST11, categorizados como grupos clonais J e K, foram detectados a partir de um mesmo hospital em Porto Alegre (RS) (Figura 18).

Os isolados pertencentes ao ST16 foram detectados apenas em SP, em diferentes grupos clonais (G, L e M). O grupo clonal O continha um único isolado (P25) recuperado em hospital de Porto Alegre, e pertencia ao ST25. O único isolado da espécie *K. quasipneumoniae* (P16) foi agrupado em grupo clonal distinto de todos os demais e pertencia ao ST367 (Figura 18).

Figura 18- Perfil clonal dos isolados de *K. pneumoniae* e *K. quasipneumoniae* produtores KPC obtido por PFGE



Legenda: As letras A à O indicam grupos clonais. ST - Tipo de sequência definido por tipagem de sequência multilocus. GI: Grupo de incompatibilidade. Grupos clonais definidos por índice de similaridade de Dice \geq 80%. O único isolado da espécie *K. quasipneumoniae* está destacado azul.

Fonte: Figura gerada no programa Bionumerics pela autora.

5.6 OBTENÇÃO DE TRANSCONJUGANTES OU TRANSFORMANTES DOS ISOLADOS DO COMPLEXO *K. pneumoniae* RESISTENTES À CEFTAZIDIMA-AVIBACTAM

Dos 46 isolados resistentes à ceftazidima-avibactam, 36 foram capazes de transferir o seu material genético, contendo o gene *bla*_{KPC}, para a cepa receptora *E. coli* J53 através da conjugação, confirmando a localização plasmidial do gene *bla*_{KPC} nesses isolados. A confirmação da localização plasmidial do isolado L6132350 (P3) foi realizada por eletroporação de plasmídeo, da cepa selvagem para a cepa receptora *E. coli* TOP10 eletrocompetente. Para 10 isolados, não foi possível obter transconjugantes/transformantes. Contudo, o gene *bla*_{KPC} estava associado a plasmídeos nesses isolados, conforme análises do sequenciamento (Tabela 8). Não foi possível verificar a localização plasmidial do gene *bla*_{KPC} do isolado N5221210 (P44), pois o sequenciamento completo do genoma deste isolado não foi realizado.

5.6.1 PCR para detecção de genes de ESBL nos transconjugantes albergando novas variantes KPC

Visando avaliar a necessidade de clonagem e possível interferência de outros genes de betalactamases nos resultados de CIM, foram realizados ensaios de PCR para detecção de genes de ESBL nos transconjugantes resistentes à ceftazidima-avibactam que albergavam novas variantes de KPC. Após a PCR, foi verificado que todos os transconjugantes carregavam apenas o gene *bla*_{KPC}, com exceção dos transconjugantes TCN0244028 e TCN2192196, que foram positivos para os genes *bla*_{CTX-M-15} e *bla*_{TEM-1}, respectivamente. O gene *bla*_{CTX-M-15} estava presente no mesmo plasmídeo de *bla*_{KPC} do seu isolado selvagem enquanto o gene *bla*_{TEM-1} foi encontrado em um outro plasmídeo de aproximadamente 78kb.

5.7 PERFIL DE SENSIBILIDADE DOS ISOLADOS SELVAGENS E SEUS TRANSCONJUGANTES OU TRANSFORMANTES E TESTE BLUE-CARBA

O perfil de sensibilidade aos carbapenêmicos e cefalosporinas foi determinado para todos os isolados incluídos nesse estudo. A maioria dos isolados resistentes à ceftazidima-avibactam apresentaram resultado sensível dose padrão ou sensível aumentando a exposição para imipenem e meropenem e resistência para o ertapenem e cefalosporinas de 3^a e 4^a gerações (Tabela 8). Todos esses isolados apresentaram teste Blue-Carba negativo. O isolado M5191546, produtor de KPC-8, foi resistente aos carbapenêmicos (>32 mg/L) e à ceftazidima-avibactam (64 mg/L) e apresentou positividade para o teste Blue-Carba. Outro isolado (N4214030 - P36), apresentou duas variantes de KPC (KPC-33 e KPC-2), também resistentes aos carbapenêmicos (>32 mg/L) e à ceftazidima-avibactam (128 mg/L) e com teste Blue-Carba positivo. Um dado interessante foi que os isolados selvagens de *K. pneumoniae*, resistentes à ceftazidima-avibactam e positivos para *bla*_{KPC}, tiveram a redução da CIM₉₀ para aztreonam de ≥64 mg/L para 2 mg/L, quando este foi combinado com o avibactam. Apenas um isolado (N5303358 – P46), apresentou CIM de 16 mg/L para a combinação aztreonam-avibactam. As CIMs obtidas com transformantes e transconjugantes para a ceftazidima-avibactam variaram de 2 a 64 mg/L, enquanto os valores obtidos para os carbapenêmicos foi ≤0,5mg/L. Todos os transformantes e transconjugantes apresentaram teste Blue-Carba negativo, com exceção do transconjugante TC M5191546 (P10), que apresentou Blue-Carba positivo. Esse transconjugante albergava *bla*_{KPC-8} e apresentou CIM 8mg/L para os carbapenêmicos (Tabela 8).

Tabela 8- Concentrações inibitórias mínimas de *Enterobacteriales* e variantes KPC de cepas do tipo selvagem, transconjugantes ou transformantes e cepas receptoras

Paciente	ID	Espécie	KPC variante	BC	CAZ	CAZ-AVI	ATM	ATM-AVI	MEM	IPM	ETP	PM	CT
P1	MV931658	<i>Kp</i>	KPC-3	PO	256	2	≥64	0,5	>256	64	>32	>256	>256
	MV940851	<i>Kp</i>	KPC-31	NE	>256	64	8	2	8	0,5	>32	96	48
	TC MV940851	<i>E. coli</i>	KPC-31	NE	128	32	2	0,5	≤0,25	≤0,25	≤0,25	1,5	2
P2	L1315312-1	<i>Kp</i>	KPC-2	PO	64	1	≥64	0,5	>256	64	>32	>256	>256
	L1315312-2	<i>Kp</i>	KPC-103*	NE	256	128	≥64	1	>256	>256	>32	>256	>256
	L2304797	<i>Kp</i>	KPC-103*	NE	128	64	≥64	0,5	16	16	>32	>256	>256
	TC L2304797	<i>E. coli</i>	KPC-103*	NE	128	16	8	0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	1	1,5
P3	L5184742	<i>Kp</i>	KPC-2	PO	128	2	≥64	1	16	16	>32	>256	>256
	L6132350	<i>Kp</i>	KPC-90	NE	>256	128	≥64	1	0,25	2	2	48	>256
P4	TF L6132350	<i>E. coli</i>	KPC-90	NE	>256	32	4	0,5	≤0,25	≤0,25	≤0,25	2	1,5
	L7202969	<i>Kp</i>	KPC-90	NE	>256	128	≥64	2	0,125	≤0,25	8	12	128
P5	L8263415	<i>Kp</i>	KPC-33	NE	128	16	≥64	0,125	8	1	>32	>256	>256
	TC L8263415	<i>E. coli</i>	KPC-33	NE	128	8	8	0,5	≤0,25	≤0,25	≤0,25	2	2
P6	L9034133	<i>Kp</i>	KPC-61	NE	64	32	1	0,25	8	4	>32	96	64
	TC L9034133	<i>E. coli</i>	KPC-61	NE	128	8	4	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	0,5	2
	X0200730-1	<i>Kp</i>	KPC-2	PO	256	2	≥64	0,5	32	32	>32	>256	>256
P7	X0200730-2	<i>Kp</i>	KPC-25	NE	128	32	≥64	1	1	≤0,25	16	>256	>256
	M5282978	<i>Kp</i>	KPC-105*	NE	256	256	≥64	2	2	32	>32	>256	>256
	TC M5282978	<i>E. coli</i>	KPC-105*	NE	128	32	1	0,5	≤0,25	≤0,25	≤0,25	1	1
	TC X0200730-2	<i>E. coli</i>	KPC-25	NE	64	2	8	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	0,5	1
P8	M4114532	<i>Kp</i>	KPC-61	NE	128	64	≥64	1	8	0,5	>32	>256	>256
	M6263533	<i>Kp</i>	KPC-2	PO	64	4	≥64	0,5	256	64	>32	>256	>256
P9	M6284360-1	<i>Kp</i>	KPC-107*	NE	>256	64	≥64	2	64	32	>32	>256	>256
	M6284360-2	<i>Kp</i>	KPC-2	PO	32	2	≥64	2	>256	64	>32	>256	>256

continua

	TC M6284360	<i>E. coli</i>	KPC-107*	NE	256	16	16	0,5	≤0,25	≤0,25	0,5	1,5	4
P10	M5191546	Kp	KPC-8	PO	>256	64	≥64	4	256	128	>32	>256	>256
	TC M5191546	<i>E. coli</i>	KPC-8	PO	>256	32	≥64	1	8	8	8	256	>256
P11	M7173549	Kp	KPC-104*	NE	>256	256	2	2	2	0,5	8	>256	16
	TC M7173549	<i>E. coli</i>	KPC-104*	NE	256	64	1	0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	2	2
P12	M7213934	Kp	KPC-139*	NE	>256	256	4	2	4	≤0,25	8	64	32
	TC M7213934	<i>E. coli</i>	KPC-139*	NE	64	32	4	≤0,25	≤0,25	≤0,25	0,5	2	2
P13	M7233093	Kp	KPC-81	NE	>256	32	≥64	0,5	4	0,5	16	128	>256
	TC M7233093	<i>E. coli</i>	KPC-81	NE	256	8	32	0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	4	4
P14	M8123829	Kp	KPC-2	PO	64	1	≥64	0,25	>256	16	>32	>256	>256
	M8143992	Kp	KPC-14	NE	>256	16	≥64	2	2	2	>32	96	32
P15	TC M8143992	<i>E. coli</i>	KPC-14	NE	128	4	8	0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	2	2
	M8161891	Kp	KPC-33	NE	>256	64	8	0,5	2	≤0,25	16	64	>256
P16	TC M8161891	<i>E. coli</i>	KPC-33	NE	256	8	2	≤0,25	≤0,25	≤0,25	2	2	16
	M8153373	Kp	KPC-25	NE	256	8	≥64	0,5	1	≤0,25	0,5	4	32
P17	TC M8153373	<i>E. coli</i>	KPC-25	NE	128	8	64	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	4	4
	M9171130	Kp	KPC-108*	NE	>256	>256	≥64	2	4	1	>32	>256	>256
P18	TC M9171130	<i>E. coli</i>	KPC-108*	NE	128	16	2	0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	1,5	2
	N0244028	Kp	KPC-106*	NE	256	128	≥64	1	1	0,5	16	>256	>256
P19	TC N0244028	<i>E. coli</i>	KPC-106*	NE	256	32	≥64	≤0,25	≤0,25	0,5	≤0,25	64	>256
	N1062450	Kp	KPC-33	NE	>256	128	16	1	4	≤0,25	>32	64	>256
P20	N0194414	Kp	KPC-140*	NE	>256	256	32	2	2	0,5	16	64	>256
	TC N0194414	<i>E. coli</i>	KPC-140*	NE	128	32	2	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	1	8
P21	N1301621	Kp	KPC-90	NE	>256	256	≥64	2	4	≤0,25	8	>256	>256
	TC N1301621	<i>E. coli</i>	KPC-90	NE	>256	16	≥64	0,25	≤0,25	0,5	≤0,25	32	>256
P22	N2053077	Kp	KPC-33	NE	256	16	≥64	0,5	4	0,5	>32	>256	>256
	TC N2053077	<i>E. coli</i>	KPC-33	NE	128	8	0,5	≤0,25	≤0,25	0,25	0,25	3	3
P23	N2192196	Kp	KPC-141*	NE	>256	256	≥64	2	1	≤0,25	4	64	>256
	TC N2192196	<i>E. coli</i>	KPC-141*	NE	256	32	≥64	0,25	≤0,25	0,5	≤0,25	8	>256
P24	N2233293	Kp	KPC-33	NE	>256	128	16	1	4	≤0,25	>32	128	64

continuação

	TC N2233293	<i>E. coli</i>	KPC-33	NE	256	8	2	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	1	6
P25	N3041884	Kp	KPC-33	NE	>256	32	≥64	0,5	4	1	>32	>256	>256
	TC N3041884	<i>E. coli</i>	KPC-33	NE	128	8	2	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	1,5	4
P26	N2251932	Kp	KPC-78	NE	>256	32	4	0,5	2	≤0,25	8	16	8
	TC N2251932	<i>E. coli</i>	KPC-78	NE	128	16	1	0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	3	3
P27	N3073609	Kp	KPC-33	NE	>256	32	≥64	0,25	1	≤0,25	4	96	>256
	TC N3073609	<i>E. coli</i>	KPC-33	NE	256	16	2	0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	6	6
P28	N3114796	Kp	KPC-33	NE	256	16	4	0,25	0,06	0,5	0,25	4	3
	N3182918	Kp	KPC-142*	NE	>256	256	32	1	2	≤0,25	4	>256	>256
P29	TC N3182918	<i>E. coli</i>	KPC-142*	NE	64	64	1	0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	4	8
	N3133201	Kp	KPC-31	NE	>256	128	≥64	0,5	1	≤0,25	16	48	>256
P31	M3214378	Kp	KPC-71	NE	>256	128	4	0,5	4	≤0,25	8	6	8
	TC M3214378	<i>E. coli</i>	KPC-71	NE	128	8	1	0,125	≤0,25	≤0,25	≤0,25	2	2
P32	N4043220	Kp	KPC-68	NE	>256	256	4	1	1	0,5	4	16	12
	TC N4043220	<i>E. coli</i>	KPC-68	NE	64	16	1	0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	1	1,5
P33	N4034288	Kp	KPC-33	NE	>256	64	≥64	0,5	4	≤0,25	>32	>256	>256
	N4103871	Kp	KPC-143*	NE	>256	64	16	0,5	0,125	≤0,25	0,5	16	12
P34	TC N4103871	<i>E. coli</i>	KPC-143*	NE	256	16	2	0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	6	4
	N4213107	Kp	KPC-33	NE	>256	32	≥64	0,5	1	≤0,25	>32	>256	>256
P35	TC N4213107	<i>E. coli</i>	KPC-33	NE	256	8	2	≤0,25	≤0,25	0,5	≤0,25	1,5	1
	N4214030	Kp	KPC-2 e KPC-33	PO	>256	128	≥64	1	>256	256	>32	>256	>256
P37	N4292977	Kp	KPC-33	NE	>256	32	≥64	0,25	2	≤0,25	8	256	>256
	TC N4292977	<i>E. coli</i>	KPC-33	NE	128	8	1	0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	2	2
P38	N5023179	Kp	KPC-33	NE	>256	32	≥64	0,25	2	≤0,25	16	>256	>256
	TC N5023179	<i>E. coli</i>	KPC-33	NE	256	32	2	0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	6	6
P39	N4293546	Kp	KPC-33	NE	>256	32	≥64	0,25	2	≤0,25	8	>256	>256
	TC N4293546	<i>E. coli</i>	KPC-33	NE	256	16	2	0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	4	4
P40	N5061391	Kp	KPC-33	NE	>256	32	≥64	0,25	1	≤0,25	8	256	>256
	TC N5061391	<i>E. coli</i>	KPC-33	NE	64	8	2	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	1,5	1,5
P41	N5062754	Kp	KPC-33	NE	256	128	≥64	0,5	1	≤0,25	8	64	192

	TC N5062754	<i>E. coli</i>	KPC-33	NE 64	32	1	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	1,5	1,5
P42	N5071671	Kp	KPC-35	NE >256	8	32	0,5	2	≤0,25	>32	64	64	
	TC N5071671	<i>E. coli</i>	KPC-35	NE >256	8	8	≤0,25	≤0,25	≤0,25	0,25	4	8	
P43	N5194041	Kp	KPC-33	NE >256	128	≥64	1	4	0,5	16	>256	>256	
	TC N5194041	<i>E. coli</i>	KPC-33	NE 256	8	2	0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	1	12	
P44	N5221210	Kp	KPC-33	NE >256	128	16	0,5	4	≤0,25	16	32	32	
	N5221227	Kp	KPC-44	NE >256	128	≥64	1	>32	16	128	64	48	
P45	TC N5221227	<i>E. coli</i>	KPC-44	NE 64	8	16	≤0,25	≤0,25	0,5	≤0,25	3	4	
P46	N5303358	Kp	KPC-14	NE >256	>256	≥64	16	8	1	32	48	48	
C1	<i>E. coli</i> J53	<i>E. coli</i>	-	NE 0,5	≤0,25	0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	0,032	0,032	
C2	<i>E. coli</i> TOP10	<i>E. coli</i>	-	NE 0,5	0,5	0,25	0,25	≤0,25	≤0,25	≤0,25	0,047	0,064	

conclusão

Abreviação: BC: Blue-Carba; Kp: *Klebsiella pneumoniae*; Kqp: *Klebsiella quasipneumoniae*; (*): novas variantes descritas neste estudo; CAZ: ceftazidima; CAZ-AVI: ceftazidima-avibactam; MEM: meropenem; IPM: imipenem; ETP: ertapenem; PM: cefepime; CT: cefotaxima. Um TC antes do ID isolado indica um transconjugante; um TF antes de ID isolado indica um transformante.

Fonte: Produzida pela autora.

5.8 AVALIAÇÃO DE MUTAÇÕES EM GENES DE PORINAS OmpK35 E OmpK36 DE ISOLADOS DE *K. pneumoniae* RESISTENTES À CEFTAZIDIMA-AVIBACTAM

Os quinze primeiros isolados de *K. pneumoniae* resistentes à ceftazidima-avibactam, que tiveram seu genoma sequenciado, foram avaliados quanto à presença de mutações nos genes que codificam as porinas OmpK35 e OmpK36. Comparando-se as sequências de aminoácidos, traduzidas das sequências nucleotídicas, de OmpK35 e OmpK36, com as respectivas porinas da cepa selvagem *K. pneumoniae* ATCC13883, foi verificada a presença de mutações do tipo *frameshift*, levando à leitura de um códon de parada prematuro nas porinas OmpK35 da maioria dos isolados. Esse tipo de mutação também foi observado no gene da porina OmpK36 do isolado L8263415 (P5). Diversas modificações na porina OmpK36 foram observadas nos isolados de *K. pneumoniae* resistentes à ceftazidima-avibactam avaliados, sendo a inserção de glicina e aspartato (GD), localizada na porção L3 da proteína, entre as posições 134 e 135, a principal modificação observada (Tabela 9).

Tabela 9- Variações observadas nas porinas de OmpK35 e OmpK36 de isolados de *K. pneumoniae* resistentes à ceftazidima-avibactam

Isolado	Espécie	Variante KPC	OmpK35	OmpK36	CAZ-AVI (mg/L)	MPM (mg/L)
M8143992	<i>Kp</i>	KPC-14	WT	Sem alteração L3	16	2
MV940851	<i>Kp</i>	KPC-31	WT	GD ins	64	8
L8263415	<i>Kp</i>	KPC-33	145-stop	17-stop	16	8
N2053077	<i>Kp</i>	KPC-33	WT	GD ins	16	4
N4213107	<i>Kp</i>	KPC-33	89-stop	GD ins	32	1
N5071671	<i>Kp</i>	KPC-35	288-stop	SD ins	8	2
L9034133	<i>Kp</i>	KPC-61	145-stop	GD ins	32	8
M4114532	<i>Kp</i>	KPC-61	145-stop	GD ins	64	8
L6132350	<i>Kp</i>	KPC-90	WT	Sem alteração L3	128	0,25
L2304797	<i>Kp</i>	KPC-103	89-stop	GD ins	64	16
M7173549	<i>Kp</i>	KPC-104	145-stop	GD ins	2	256
M5282978	<i>Kp</i>	KPC-105	288-stop	D ins	256	2
N0244028	<i>Kp</i>	KPC-106	288-stop	GD ins	128	1
M6284360-1	<i>Kp</i>	KPC-107	89-stop	GD ins	64	64
M9171130	<i>Kp</i>	KPC-108	89-stop	GD ins	>256	4

Fonte: Produzida pela autora.

5.9 PERFORMANCE DE TESTES IMUNOCROMATOGRÁFICOS NA DETECÇÃO DE VARIANTES KPC QUE CONFEREM FENÓTIPO DE RESISTÊNCIA À CEFTAZIDIMA-AVIBACTAM

Vinte e quatro diferentes variantes KPC foram testadas para análise da performance dos testes NG-Test CARBA-5 e O.K.N.V.I. RESIST-5 na detecção de variantes KPC que conferem fenótipo de resistência à ceftazidima-avibactam.

O NG-Test CARBA-5 não foi capaz de detectar 12 das 24 variantes KPC dos isolados testados: KPC-31, KPC-33, KPC-68, KPC-71, KPC-78, KPC-90, KPC-104, KPC-106, KPC-139, KPC-141, KPC-142 e KPC-143. Para as demais variantes (n=12), o teste apresentou positividade (Tabela 10).

Com relação ao O.K.N.V.I. RESIST-5, o teste não foi capaz de detectar 15 das 24 variantes KPC dos isolados testados: KPC-31, KPC-33, KPC-68, KPC-71, KPC-78, KPC-90, KPC-104, KPC-105, KPC-106, KPC-108, KPC-139, KPC-140, KPC-141, KPC-142 e KPC-143. Para as demais variantes (n=9), o teste apresentou positividade (Tabela 10).

Ambos os testes apresentaram performances similares na detecção de variantes KPC. A negatividade do teste ocorreu, sobretudo, em variantes que apresentaram mutação na posição 179 de Ambler, principal região relacionada a mutações de variantes KPC que conferem fenótipo de resistência à ceftazidima-avibactam (Tabela 10).

Tabela 10- Performance dos testes imunocromatográficos NG-Test CARBA-5 e O.K.N.V.I. RESIST-5 na detecção de variantes KPC relacionadas com a resistência à ceftazidima-avibactam

Variante KPC	KPC derivada	Alterações na sequência de aminoácidos	MEM (mg/L)	CAZ-AVI (mg/L)	Blue-Carba	NG-Test Carba 5®	RESIST-5 O.O.K.N.V.®
KPC-8	KPC-3	V240G	256	64	POS	KPC	KPC
KPC-25	KPC-2	ins166_EL	1	8	NEG	KPC	KPC
KPC-14	KPC-2	Δ242-GT-243	2	16	NEG	KPC	KPC
KPC-105*	KPC-2	L169Q; Ins_271_15aa	2	256	NEG	KPC	NE
KPC-35	KPC-2	L169P	2	8	NEG	KPC	KPC
KPC-140*	KPC-2	D179N; Ins_271_15aa	2	256	NEG	KPC	NE
KPC-81	KPC-2	ΔF173	4	32	NEG	KPC	KPC
KPC-108*	KPC-2	Ins_183_10aa; Ins_271_15aa	4	>256	NEG	KPC	NE
KPC-61	KPC-3	S171P	8	32	NEG	KPC	KPC
KPC-103*	KPC-2	Ins_271_12aa	16	64	NEG	KPC	KPC
KPC-107*	KPC-2	Ins_196_28aa	64	64	NEG	KPC	KPC
KPC-44	KPC-2	ins_259-15aa	≥64	128	NEG	KPC	KPC
KPC-143*	KPC-2	D179Y; T187S	0.125	64	NEG	NE	NE
KPC-90	KPC-2	Ins_180_YT	0.25	128	NEG	NE	NE
KPC-68	KPC-3	ins_182_SS	1	256	NEG	NE	NE
KPC-106*	KPC-2	Ins_279_TY; Ins_273_SEAV	1	128	NEG	NE	NE
KPC-141*	KPC-2	D179Y; Ins_239_G	1	256	NEG	NE	NE
KPC-78	KPC-2	D179A	2	32	NEG	NE	NE
KPC-104*	KPC-2	Ins_179_TY; Ins_271_6aa	2	256	NEG	NE	NE
KPC-142*	KPC-2	Ins_182_S; Ins_271_6aa	2	256	NEG	NE	NE
KPC-71	KPC-2	ins_182_S	4	128	NEG	NE	NE
KPC-139*	KPC-2	D179Y; Ins_271_6aa	4	256	NEG	NE	NE
KPC-31	KPC-3	D179Y	8	64	NEG	NE	NE
KPC-33	KPC-2	D179Y	8	16	NEG	NE	NE

Legenda: Kp: *Klebsiella pneumoniae*; Kqp: *Klebsiella quasipneumoniae*; (*): novas variantes descritas neste estudo.

Nota: As células destacadas em azul evidenciam as divergências de resultados encontrados entre os resultados obtidos com as duas marcas de testes imunocromatográficos avaliados.

Fonte: Produzida pela autora.

6 DISCUSSÃO

A resistência aos carbapenêmicos é um problema grave e crescente em todo o mundo. Neste estudo, foi observado que houve aumento estatisticamente significativo da taxa de resistência ao ertapenem em isolados do Complexo *K. pneumoniae* detectados em hospitais privados do Brasil. Em 2019, a taxa de resistência ao ertapenem foi de 15,6% enquanto em 2021 essa taxa foi de 27,3%. Essas taxas são inferiores àquela descrita por Tuon e colaboradores – 45,6% - avaliando isolados coletados nos anos de 2016 a 2017 em laboratórios hospitalares da Bahia, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, e São Paulo (TUON et al., 2020). Dois fatores podem ter contribuído para essa diferença: um viés de coleta de isolados ou o número limitado de isolados (n=193) utilizado no estudo de Tuon e colaboradores em comparação com este estudo (n=14.298).

Entre isolados do Complexo *K. pneumoniae* resistentes ao ertapenem, foi observado neste estudo um aumento estatisticamente significativo da taxa de resistência à ceftazidima-avibactam de 4,2% em 2019 para 17,2% em 2021. Esses dados indicam que a introdução da ceftazidima-avibactam em uso clínico no Brasil coincidiu com um aumento progressivo na taxa de resistência a este antimicrobiano no Complexo *K. pneumoniae*. O estudo INFORM com *Enterobacterales* isoladas no período de 2015 a 2017, em sua maioria por *Klebsiella* spp., mostrou uma taxa de resistência à ceftazidima-avibactam, entre isolados resistentes a carbapenêmicos, de 12,5% na América Latina, mas trata-se de período anterior ao início do seu uso clínico no Brasil. No mesmo período, a taxa de resistência na Europa foi de 23,2% e na Ásia essa taxa foi de 51,7% (SPILIOPOULOU et al., 2020). A pressão seletiva gerada pelo uso do antimicrobiano e a disseminação de clones produtores de MBL têm sido apontadas em diversos estudos como fatores que afetam as taxas de resistência à ceftazidima-avibactam (KIFFER et al., 2023; ROSSOLINI; STONE, 2020; WISE et al., 2023).

Neste estudo, observamos que houve uma redução estatisticamente significativa da taxa de isolados produtores de carbapenemases de classe A e aumento da frequência de isolados produtores de carbapenemases de classe B ou classes A e B de Ambler. Esses achados são consistentes com a publicação de Kiffer e colaboradores que evidenciaram aumento significativo de frequência de genes de

carbapenemases de classe B e redução da frequência de *bla*_{KPC} em *Enterobacterales* recentemente (KIFFER et al., 2023).

Uma grande diversidade de variantes de KPC foram detectadas neste estudo. Dentre elas, as variantes KPC-8, KPC-14, KPC-31, KPC-33, KPC-35, KPC-44, KPC-61, KPC-68, KPC-71, KPC-78, KPC-81 e KPC-90 já foram implicadas na resistência à ceftazidima-avibactam (DING et al., 2023). Para a variante KPC-25, o fenótipo descrito em publicações recentes é de sensibilidade à ceftazidima-avibactam (GU et al., 2023; HOBSON et al., 2020).

Foram detectadas onze novas variantes KPC neste estudo, sendo depositadas no GenBank como KPC-103 a KPC-108 e KPC-139 a KPC-143. Essas novas variantes apresentaram modificações próximo à alça Ω e alça-270, regiões comumente relacionadas com a resistência à ceftazidima-avibactam (CARATTOLI et al., 2021; LEBRETON et al., 2021; MUELLER et al., 2019).

A variante KPC mais frequente observada neste estudo foi a KPC-33. Essa variante foi descrita pela primeira vez a partir de um isolado de *K. pneumoniae* recuperado de um paciente após 12 dias de exposição à ceftazidima-avibactam em Porto Rico (GIDDINS et al., 2018). A KPC-33 é a variante de KPC-2 mais frequente em todo o mundo. Em relação a variantes derivadas de KPC-3, a variante mais frequente é a KPC-31 (DING et al., 2023). Ambas as variantes apresentam a substituição H179Y, principal mutação relacionada com a resistência à ceftazidima-avibactam (MOREIRA; CAIERAO, 2021).

A maioria dos isolados produtores de variantes de KPC pertencia ao CC258 (ST11 e ST258). Esse achado é consistente com diversas publicações que descrevem o CC258 como o complexo clonal mais disseminado em todo o mundo (LOGAN; WEINSTEIN, 2017; SHROPSHIRE et al., 2022). Além disso, as cepas pertencentes ao ST11 foram consideradas o principal reservatório de variantes KPC que conferem fenótipo de resistência à ceftazidima-avibactam na China (LIU et al., 2022).

Neste estudo, foram detectados quatro isolados que pertenciam ao ST16. Este clone é considerado emergente e associado a altas taxas de mortalidade no estado de São Paulo (ANDREY et al., 2020). Em nosso estudo, apesar do clone ST16 ter sido detectado exclusivamente no estado de São Paulo, estava presente em três hospitais distintos, o que é consistente com a descrição de clone emergente na literatura.

Neste estudo, um único isolado de *K. pneumoniae* pertencia ao ST25. Alguns trabalhos têm relatado a emergência de cepas hipermucóides de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos e pertencentes ao ST25 (CEJAS et al., 2019; JURE et al., 2021; VELOSO et al., 2023); entretanto não avaliamos essa característica fenotípica em nosso estudo.

O único isolado de *K. quasipneumoniae* identificado neste estudo pertencia ao ST367. Três isolados clínicos de *K. quasipneumoniae* tipo capsular K1 e pertencentes ao ST367 foram relatados na China. Esses isolados apresentaram um plasmídeo albergando *bla*_{KPC} coexistindo com um plasmídeo contendo vários genes de virulência (XIE et al., 2022). Não encontramos, na literatura indexada, publicação descrevendo a ocorrência de variante de KPC, associada com a resistência à ceftazidima avibactam, em *K. quasipneumoniae*.

O perfil clonal por PFGE dos seis isolados pareados, com perfis de sensibilidade divergentes à ceftazidima-avibactam, foram idênticos, evidenciando que as variantes de KPC de isolados pareados se originaram de mutações ocorridas no gene *bla*_{KPC} albergado pelas cepas sensíveis à ceftazidima-avibactam. Os achados deste estudo confirmam os disponíveis na literatura, a exemplo da primeira descrição de KPC-31 após uso de ceftazidima-avibactam (SHIELDS et al., 2016). Outro dado consistente com a análise por PFGE foi que em isolados recuperados da primeira infecção, sensíveis à ceftazidima-avibactam, apresentaram uma cultura mista, com isolados resistentes à ceftazidima-avibactam em menor quantidade.

Em nosso estudo, quinze grupos clonais foram identificados por PFGE. O grupo clonal A foi o mais numeroso, sendo detectado em isolados de 15 pacientes, em oito hospitais distintos, localizados nos Estados de SP e DF. A maioria desses isolados pertencia ao ST258 e albergava o gene *bla*_{KPC} em um plasmídeo híbrido, IncX3-IncU.

Apesar do tamanho muito semelhante (\approx 46 kb) de todos os plasmídeos IncX-IncU, eles albergavam diferentes variantes, todas derivadas de *bla*_{KPC-2}. Esse achado sugere que a disseminação desses plasmídeos foi anterior à ocorrência de mutações gerando variantes de *bla*_{KPC}. Outra evidência que suporta esta interpretação é que esses plasmídeos IncX3-IncU foram altamente similares a um plasmídeo de mesmo grupo de incompatibilidade, albergando *bla*_{KPC-2}, detectado a partir de um isolado clínico de *K. pneumoniae*, envolvido em surto de resistência à colistina no Brasil (FUGA et al., 2020). Além disso, outros plasmídeos IncX3-IncU, albergando

bla_{KPC-2}, foram detectados no Brasil em isolados de *E. coli*, recuperados a partir infecção urinária comunitária ou fontes ambientais (DIAS et al., 2022; LOPES et al., 2022).

Neste estudo, 36% das variantes KPC eram KPC-33. Apenas uma fração desses isolados teve o seu genoma completo sequenciado, mas o gene *bla_{KPC-33}* foi detectado em diferentes grupos de incompatibilidade de plasmídeos (IncF, IncN, IncQ, IncX3/IncU). Em contraste, o gene *bla_{KPC-33}* foi mais frequentemente detectado em isolados do clone A, o que indica que essa maior frequência decorre predominantemente de disseminação clonal e não disseminação de plasmídeos. Digno de nota, uma única mutação em *bla_{KPC-2}* gera *bla_{KPC-33}*, resultando na substituição H179Y. Isso é uma das possíveis explicações para a maior frequência de *bla_{KPC-33}* entre as variantes detectadas neste estudo e para o fato de que *bla_{KPC-33}* é a variante mais detectada em todo o mundo, nos locais onde *bla_{KPC-2}* é mais frequente (HOBSON et al., 2022).

Os dois grupos de incompatibilidade mais frequentemente detectados em nosso estudo foram IncN e IncF, mas esses plasmídeos albergavam uma grande diversidade de variantes de *bla_{KPC}*. Isso indica, assim como foi observado com plasmídeos IncX3/IncU, que a disseminação de plasmídeos que albergam *bla_{KPC}* é anterior à ocorrência de mutações que geraram as novas variantes de *bla_{KPC}*.

O Tn4401a foi a isoforma mais frequentemente detectada entre isolados albergando variantes *bla_{KPC}* em nosso estudo, estando associadas a plasmídeos de grupo de incompatibilidade IncF. A disseminação de *bla_{KPC-2}* a partir de plasmídeos IncFII contendo a isoforma Tn4401a já foi evidenciada no Brasil (ANDRADE et al., 2011). Um estudo recente sobre vigilância genômica de *Klebsiella* spp. multirresistente, no período de 2007 a 2020, evidenciou que dois terços dos isolados de *Klebsiella* spp., albergando *bla_{KPC-2}*, estavam associados a isoforma Tn4401a e associados a plasmídeos IncF (DAVID et al., 2023). Nossos achados são consistentes ao descrito na literatura, onde observa-se que as isoformas a e b do Tn4401 são as mais disseminadas ao redor do mundo (ARAUJO et al., 2018).

O isolado M5191546 apresentou duas cópias da variante *bla_{KPC-8}* em seu plasmídeo, com inserção do Tn4401b, um na fita principal de DNA e a outra cópia na fita complementar. Diferente dos isolados com as demais variantes, este mantém a capacidade de hidrolisar imipenem, pois apresentou positividade para o teste blue-carba e apresentou CIM elevada para os carbapenêmicos (>32mg/L) e ceftazidima-

avibactam (64mg/L). Essa variante difere de KPC-3 por uma única substituição de aminoácidos (V240G). A KPC-8 foi descrita pela primeira vez associada a um surto de *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos em um hospital em Porto Rico, sendo detectada em cinco isolados (GREGORY et al., 2010). Em 2019, essa variante foi associada pela primeira vez com a resistência à ceftazidima-avibactam. Três isolados, produtores de KPC-8, foram identificados a partir de amostras de urina de pacientes sem uso prévio da ceftazidima-avibactam em Buenos Aires, Argentina. Essas variantes apresentaram CIM de 16mg/L para ceftazidima-avibactam e seu transconjugante CIM 1mg/L (GARCIA et al., 2020). É possível que a duplicidade do gene *bla*_{KPC-8} em nosso isolado, tenha contribuído com o aumento da CIM para a ceftazidima-avibactam.

A nova variante, KPC-106, foi encontrada associada ao Tn4401, em um plasmídeo albergando outros três genes de resistência: *bla*_{CTX-M-15}; e os genes *aadA2* e *dfrA12* em um integron de classe 1. O plasmídeo apresentou alta similaridade com um plasmídeo detectado em um isolado de *K. pneumoniae*, recuperado de um paciente internado em um hospital em Praga, em 2019. Esse plasmídeo apresentava replicons tipo IncFII-IncFIB, e albergava três genes de betalactamase: *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{TEM-1B}. (CHUDEJOVA et al., 2021). CTX-M-15 é uma das ESBL mais disseminadas em *Enterobacterales*, e frequentemente associadas a plasmídeos IncFIB (BEVAN; JONES; HAWKEY, 2017; ROCHA-GRACIA et al., 2022; VILLA et al., 2010). A inserção de *bla*_{KPC} pela transposição do Tn4401 em um plasmídeo originalmente relacionado com a disseminação de genes de ESBL gera uma preocupação do ponto de vista epidemiológico.

Os isolados do Complexo *K. pneumoniae* resistentes à ceftazidima-avibactam apresentaram aumento da sensibilidade para os carbapenêmicos. Esses achados são corroborados por diversos trabalhos, onde observou-se que a resistência à ceftazidima-avibactam normalmente é acompanhada de aumento da sensibilidade aos carbapenêmicos pela seleção de mutantes *bla*_{KPC} de baixa afinidade para esses antimicrobianos (GAIBANI et al., 2018; MUELLER et al., 2019). Um dado interessante foi que a maioria dos isolados resistentes à ceftazidima-avibactam apresentaram sensibilidade para a nova combinação de aztreonam-avibactam, evidenciando que a atividade desse inibidor não foi alterada para essa coleção de isolados. Alguns autores têm demonstrado que as variantes de KPC apresentam maior afinidade pela ceftazidima, diminuindo a chance de ligação com avibactam e não a redução de sua

afinidade (MOREIRA; CAIERAO, 2021). Isso explica as CIMs elevadas para aztreonam isoladamente, mas baixas para aztreonam na presença de avibactam observadas neste estudo. Resultados semelhantes foram evidenciados em um recente estudo com mutantes *in vitro* (FINDLAY et al., 2021).

A maioria dos transconjugantes apresentou CIMs que variaram entre 16 e 64mg/L para ceftazidima-avibactam, evidenciando que essas variantes KPC possuem uma eficiência catalítica aumentada para a ceftazidima e não são inibidas pelo avibactam, quando em associação com a ceftazidima, levando a resistência a este composto. Outros transconjugantes albergando variantes de KPC-14, KPC-25, KPC-35, KPC-44, KPC-61, KPC-71, apresentaram um discreto aumento da CIM ($\leq 0,25$ para 2 a 8 mg/L), com padrão de sensibilidade, sugerindo que outros mecanismos de resistência à ceftazidima-avibactam possam estar envolvidos. Além disso, os transconjugantes albergando variantes KPC-33 apresentaram CIMs que variaram de 8 a 32 mg/L, sugerindo que possa haver variação no número de cópias e expressão dos genes *bla*_{KPC} nesses isolados.

Dentre os isolados de *K. pneumoniae* resistentes à ceftazidima-avibactam avaliados quanto à presença de mutações nos genes que codificam as porinas OmpK35 e OmpK36, incluindo algumas variantes KPC (KPC-61, KPC-33, KPC-61 KPC-14, KPC-35), cujos seus transconjugantes apresentaram discreto aumento da CIM para ceftazidima-avibactam, a maioria apresentou mutações do tipo *frameshift*, que resultaram em um stop códon prematuro e truncamento da porina OmpK35. A OmpK35 truncada não apresenta o resíduo C-terminal importante (fenilalanina) necessário para sua inserção na membrana externa, portanto, são usualmente disfuncionais. Esse tipo de mutação tem sido comumente observado em isolados de *K. pneumoniae* (ST258) produtores de KPC. Além disso, diversas modificações na porina OmpK36 foram observadas. A principal modificação foi uma duplicação de glicina e aspartato (GD) nas posições 134 e 135 da porção L3 da proteína. Alteração na região L3 de OmpK36 em *K. pneumoniae* já foi relacionada à diminuição da sensibilidade para ceftazidima-avibactam (CASTANHEIRA et al., 2020). Um estudo publicado por Wong et al (2019) evidenciou que inserção de GD em L3 de OmpK36 resultou em uma conformação de alça estendida que se interpõe no canal da porina, reduzindo seu diâmetro em 26%. Não é possível afirmar, no entanto, se essas mutações contribuíram com o aumento das CIMs para ceftazidima-avibactam em nossa coleção de isolados.

O surgimento de novas variantes KPC têm sido um desafio ao diagnóstico laboratorial. Os testes moleculares atualmente em uso nos laboratórios diagnósticos não são capazes de diferenciar variantes *bla*_{KPC}. A presença de novas variantes KPC pode ser desconhecida por muitos laboratórios que não dispõem de métodos moleculares de diagnóstico. A avaliação da frequência dessas novas variantes representam um impacto do ponto de vista epidemiológico. Para avaliar esse impacto, discos de ceftazidima-avibactam foram incluídos nos antibiogramas de *Enterobacterales* e nas culturas de vigilância de todos os hospitais colaboradores deste projeto. É certo que a maioria das variantes KPC estão associadas ao aumento da sensibilidade aos carbapenêmicos, no entanto, ainda torna-se fundamental o controle da disseminação dessas variantes no ambiente hospitalar. Estudos apontaram que subpopulações de *K. pneumoniae* produtoras de KPC, com diferentes perfis de resistência, podem ocorrer simultaneamente após o tratamento com a ceftazidima-avibactam. (BIANCO et al., 2020; GAIBANI et al., 2018). Além disso, a coexistência de plasmídeos albergando diferentes variantes KPC é uma preocupação. Em nosso estudo, o isolado N4214030 (P36) apresentou dois plasmídeos distintos, IncFII(K)-FIB e ColRNAI, albergando as variantes *bla*_{KPC-33} e *bla*_{KPC-2}, respectivamente, resultando em resistência aos carbapenêmicos e à ceftazidima-avibactam.

Testes imunocromatográficos têm sido cada vez mais procurados pelos laboratórios clínicos, em vista da rapidez, facilidade e eficácia do método na detecção de carbapenemases. Em nosso estudo, foram avaliados dois testes, comercialmente disponíveis no Brasil para a detecção de carbapenemases, o NG-Test CARBA-5 e o O.K.N.V.I RESIST-5. Ambos os testes apresentaram performances similares na detecção de variantes KPC. A negatividade do teste ocorreu em variantes que apresentaram mutações próximo à alça ômega, em especial naquelas variantes apresentando a mutação D179Y. Um estudo semelhante foi conduzido por Gu et al (2023). Onze variantes KPC foram avaliadas no NG-Test CARBA-5 (KPC-25, KPC-33, KPC-35, KPC-51, KPC-52, KPC-71, KPC-76, KPC-77, KPC-78, KPC-93 e KPC-123). O teste foi negativo para isolados produtores de seis dessas variantes (KPC-33, KPC-52, KPC-71, KPC-76, KPC-77, KPC-123). A maioria dessas variantes apresentaram a substituição D179Y. Curiosamente, a variante apresentando a substituição D179N (KPC-51), apresentou teste positivo (GU et al., 2023). Em nosso estudo, uma variante que continha a substituição D179N, foi positiva para KPC no NG-

Test CARBA-5 e negativa no RESIST-5. Um resultado discordante foi que um isolado produtor de KPC-78 (D179A) no estudo de Gu et al (2023) apresentou resultado positivo para KPC e em nosso estudo o teste foi negativo em ambos os testes comerciais.

O fato de que algumas variantes KPC que conferem resistência à ceftazidima-avibactam são detectadas pelos testes imunocromatográficos é preocupante, pois no Brasil em alguns hospitais esses testes têm sido utilizados para orientar tratamento empírico com ceftazidima-avibactam. Uma alternativa seria combinar o uso do teste imunocromatográfico com o teste Blue-Carba, pois as variantes que conferem resistência à ceftazidima-avibactam, em sua maioria, não hidrolisam imipenem. Mesmo assim, pode haver expressão de KPC-8 que confere resistência à ceftazidima-avibactam ou coexpressão de KPC-2 e KPC-33. Nossos achados evidenciam que no Brasil é desaconselhável utilizar os testes imunocromatográficos para guiar uso de ceftazidima-avibactam sem o resultado do teste de sensibilidade.

7 CONCLUSÕES

1. Houve um aumento na taxa de resistência ao ertapenem e à ceftazidima-avibactam em isolados do Complexo *K. pneumoniae* durante o período de estudo, com a redução da taxa de isolados produtores de carbapenemases de classe A e aumento da frequência de isolados produtores de carbapenemases de classe B ou classes A e B de Ambler.
2. Uma grande diversidade de variantes KPC foi identificada neste estudo, sendo a KPC-33 a variante mais frequente.
3. Onze novas variantes de KPC foram identificadas, sendo denominadas KPC-103 a KPC-108 e KPC-139 a KPC-143.
4. Os grupos de incompatibilidade IncF e IncN foram os mais frequentes entre isolados do Complexo *K. pneumoniae* albergando variantes *bla*_{KPC}.
5. O Tn4401a foi a isoforma mais frequentemente detectada em nosso estudo, sendo associada a plasmídeos IncF.
6. Quinze grupos clonais foram identificados neste estudo. A maioria dos isolados pertencia ao ST11. O grupo clonal A foi o mais abundante e pertencia ao ST258, sendo detectado em isolados que albergavam diferentes variantes de KPC, sugerindo que a disseminação dos plasmídeos que albergavam *bla*_{KPC} foi anterior à ocorrência de mutações que geraram as novas variantes.
7. A maioria dos isolados do Complexo *K. pneumoniae* resistentes à ceftazidima-avibactam e seus transconjugantes ou transformantes apresentaram redução das concentrações inibitórias mínimas para os carbapenêmicos e sensibilidade para a combinação de aztreonam-avibactam, evidenciando que a atividade desse inibidor não foi alterada para essa coleção de isolados.
8. Entre os isolados que foram selecionados para avaliação da presença de mutações em porinas OmpK35 e OmpK36, a maioria apresentou mutações do tipo *framshift* em OmpK35 e inserções de aminoácidos (GD) em OmpK36, não sendo possível afirmar, no entanto, se essas mutações contribuíram com o aumento das CIMs para ceftazidima-avibactam.
9. Os testes imunocromatográficos NG-Test CARBA-5 e RESIST-5 identificaram, respectivamente, 48% e 35% das variantes KPC que apresentaram teste Blue-Carba negativo.

REFERÊNCIAS

- ADEOLU, M. et al. Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 66, n. 12, p. 5575-5599, Dec 2016.
- AMBLER, R. P. The structure of beta-lactamases. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 289, n. 1036, p. 321-31, May 16 1980.
- 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. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 55, n. 7, p. 3579-83, Jul 2011.
- ANDREY, D. O. et al. An Emerging Clone, Klebsiella pneumoniae Carbapenemase 2-Producing K. pneumoniae Sequence Type 16, Associated With High Mortality Rates in a CC258-Endemic Setting. **Clin Infect Dis**, v. 71, n. 7, p. e141-e150, Oct 23 2020.
- ANVISA. **Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 10- Detecção dos Principais Mecanismos de Resistência Bacteriana aos Antimicrobianos pelo Laboratório de Microbiologia Clínica**. Brasília. 10 volumes: 160 p. 2020.
- _____. **COMUNICADO DE RISCO GVIMS/GGTES/ANVISA Nº 01/2021: Identificação de Pseudomonas aeruginosa resistente a carbapenêmicos, produtora de KPC e NDM em serviços de saúde**. Brasília: 8 p. 2021a.
- _____. **NOTA TÉCNICA GVIMS/GGTES/ANVISA Nº 05/2021: Orientações para prevenção e controle da disseminação de microrganismos multirresistentes em serviços de saúde no contexto da pandemia da COVID-19**. Brasília 37 p. 2021b.
- _____. **Programa Nacional de Prevenção e Controle de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (PNPCIRAS) 2021 a 2025**. Brasília: 61 p. 2021c.
- ARAUJO, B. F. et al. Insights into a novel Tn4401 deletion (Tn4401i) in a multidrug-resistant Klebsiella pneumoniae clinical strain belonging to the high-risk clonal group 258 producing KPC-2. **Int J Antimicrob Agents**, v. 52, n. 4, p. 525-527, Oct 2018.

BARTOLLETI, F. et al. Polymyxin B Resistance in Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*, Sao Paulo, Brazil. **Emerg Infect Dis**, v. 22, n. 10, p. 1849-51, Oct 2016.

BEVAN, E. R.; JONES, A. M.; HAWKEY, P. M. Global epidemiology of CTX-M beta-lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. **J Antimicrob Chemother**, v. 72, n. 8, p. 2145-2155, Aug 1 2017.

BEYROUTHY, R. et al. MCR-1 and OXA-48 In Vivo Acquisition in KPC-Producing *Escherichia coli* after Colistin Treatment. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 61, n. 8, Aug 2017.

BIANCO, G. et al. Carbapenemase detection testing in the era of ceftazidime/avibactam-resistant KPC-producing Enterobacterales: A 2-year experience. **J Glob Antimicrob Resist**, v. 24, p. 411-414, Mar 2021.

BIANCO, G. et al. Bloodstream infection by two subpopulations of *Klebsiella pneumoniae* ST1685 carrying KPC-33 or KPC-14 following ceftazidime/avibactam treatment: considerations regarding acquired heteroresistance and choice of carbapenemase detection assay. **J Antimicrob Chemother**, v. 75, n. 10, p. 3075-3076, Oct 1 2020.

BIRNBOIM, H. C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Res**, v. 7, n. 6, p. 1513-23, Nov 24 1979.

BRASIL, M. D. S., SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA DAS DOENÇAS TRANSMISSÍVEIS. **Plano de ação nacional de prevenção e controle da resistência aos antimicrobianos no âmbito da saúde única 2018-2022 (PAN-BR)** Brasília: 24 p. 2019.

BRINK, A. J. Epidemiology of carbapenem-resistant Gram-negative infections globally. **Curr Opin Infect Dis**, v. 32, n. 6, p. 609-616, Dec 2019.

BUSH, K. Past and Present Perspectives on beta-Lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 62, n. 10, Oct 2018.

BUSH, K.; BRADFORD, P. A. Epidemiology of beta-Lactamase-Producing Pathogens. **Clin Microbiol Rev**, v. 33, n. 2, Mar 18 2020.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of beta-lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 3, p. 969-76, Mar 2010.

BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 39, n. 6, p. 1211-33, Jun 1995.

CANO, A. et al. Use of carbapenems in the combined treatment of emerging ceftazidime/avibactam-resistant and carbapenem-susceptible KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* infections: Report of a case and review of the literature. **J Glob Antimicrob Resist**, v. 22, p. 9-12, Sep 2020.

CARATTOLI, A. et al. Evolutionary Trajectories toward Ceftazidime-Avibactam Resistance in *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 65, n. 10, p. e0057421, Sep 17 2021.

CASTANHEIRA, M. et al. Ceftazidime-avibactam activity against a challenge set of carbapenem-resistant Enterobacterales: Ompk36 L3 alterations and beta-lactamases with ceftazidime hydrolytic activity lead to elevated MIC values. **Int J Antimicrob Agents**, v. 56, n. 1, p. 106011, Jul 2020.

CASTILLO-POLO, J. A. et al. Outbreak by KPC-62-producing ST307 *Klebsiella pneumoniae* isolates resistant to ceftazidime/avibactam and cefiderocol in a university hospital in Madrid, Spain. **J Antimicrob Chemother**, v. 78, n. 5, p. 1259-1264, May 3 2023.

CDER, C. O. D. E. A. R. **Novel Drugs 2015**. US: Food and Drug Administration: 20p p. 2016.

CEJAS, D. et al. Changing epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in Argentina: Emergence of hypermucoviscous ST25 and high-risk clone ST307. **J Glob Antimicrob Resist**, v. 18, p. 238-242, Sep 2019.

CHEN, Y. et al. Dynamic evolution of ceftazidime-avibactam resistance due to interchanges between bla(KPC-2) and bla(KPC-145) during treatment of *Klebsiella pneumoniae* infection. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 13, p. 1244511, 2023.

CHERUVANKY, A. et al. Enhanced *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase Expression from a Novel Tn4401 Deletion. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 61, n. 6, Jun 2017.

CHUDEJOVA, K. et al. Genetic Plurality of OXA/NDM-Encoding Features Characterized From Enterobacterales Recovered From Czech Hospitals. **Front Microbiol**, v. 12, p. 641415, 2021.

DAS, S. et al. Selecting the dosage of ceftazidime-avibactam in the perfect storm of nosocomial pneumonia. **Eur J Clin Pharmacol**, v. 76, n. 3, p. 349-361, Mar 2020.

DAVID, S. et al. Genomic surveillance of multidrug-resistant *Klebsiella* in Wales reveals persistent spread of *Klebsiella pneumoniae* ST307 and adaptive evolution of pOXA-48-like plasmids. **Microb Genom**, v. 9, n. 5, May 2023.

DI PILATO, V. et al. KPC-53, a KPC-3 Variant of Clinical Origin Associated with Reduced Susceptibility to Ceftazidime-Avibactam. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 65, n. 1, Dec 16 2020.

DIAS, J. B. et al. MDR *Escherichia coli* carrying CTX-M-24 (IncF[F-:A1:B32]) and KPC-2 (IncX3/IncU) plasmids isolated from community-acquired urinary tract infection in Brazil. **Braz J Infect Dis**, v. 26, n. 6, p. 102706, Nov-Dec 2022.

DING, L. et al. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase variants: the new threat to global public health. **Clin Microbiol Rev**, p. e0000823, Nov 8 2023.

DING, L. et al. Comparison of Four Carbapenemase Detection Methods for bla(KPC-2) Variants. **Microbiol Spectr**, v. 9, n. 3, p. e0095421, Dec 22 2021.

DOU, D. O. D. U. **RESOLUÇÃO-RE Nº 1.634, DE 21 DE JUNHO DE 2018**. Anexo. ANVISA: Brasil. 05312018062500034 2018.

ESTABROOK, M. et al. Epidemiology of Resistance Determinants Identified in Meropenem-Nonsusceptible Enterobacteriales Collected as Part of a Global Surveillance Study, 2018 to 2019. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 67, n. 5, p. e0140622, May 17 2023.

FDASIA, F. A. D. A. S. A. I. A. **Public Law 112–144**. TITLE VIII—GENERATING ANTIBIOTIC INCENTIVES NOW. ADMINISTRATION, F. A. D.: 993-1132 p p. 2012.

FINDLAY, J. et al. KPC-Mediated Resistance to Ceftazidime-Avibactam and Collateral Effects in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 65, n. 9, p. e0089021, Aug 17 2021.

FONSECA, E. L. et al. A one-step multiplex PCR to identify *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella variicola*, and *Klebsiella quasipneumoniae* in the clinical routine. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 87, n. 4, p. 315-317, Apr 2017.

FUGA, B. et al. Novel small IncX3 plasmid carrying the bla(KPC-2) gene in high-risk *Klebsiella pneumoniae* ST11/CG258. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 96, n. 2, p. 114900, Feb 2020.

GAIBANI, P. et al. Genome characterization of a *Klebsiella pneumoniae* co-producing OXA-181 and KPC-121 resistant to ceftazidime/avibactam,

meropenem/vaborbactam, imipenem/relebactam and cefiderocol isolated from a critically ill patient. **J Glob Antimicrob Resist**, v. 30, p. 262-264, Sep 2022.

GAIBANI, P. et al. Genomic characterization of a *Klebsiella pneumoniae* ST1519 resistant to ceftazidime/avibactam carrying a novel KPC variant (KPC-36). **Int J Antimicrob Agents**, v. 55, n. 1, p. 105816, Jan 2020.

GAIBANI, P. et al. In vivo evolution of resistant subpopulations of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* during ceftazidime/avibactam treatment. **J Antimicrob Chemother**, v. 73, n. 6, p. 1525-1529, Jun 1 2018.

GALANI, I. et al. Genomic characterization of a KPC-23-producing *Klebsiella pneumoniae* ST258 clinical isolate resistant to ceftazidime-avibactam. **Clin Microbiol Infect**, v. 25, n. 6, p. 763 e5-763 e8, Jun 2019.

GALANI, I. et al. Emergence of ceftazidime-avibactam resistance through distinct genomic adaptations in KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* of sequence type 39 during treatment. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 40, n. 1, p. 219-224, Jan 2021.

GARCIA, J. et al. Emergence of ceftazidime/avibactam resistance in KPC-8-producing *Klebsiella pneumoniae* in South America. **Clin Microbiol Infect**, v. 26, n. 9, p. 1264-1265, Sep 2020.

GIDDINS, M. J. et al. Successive Emergence of Ceftazidime-Avibactam Resistance through Distinct Genomic Adaptations in blaKPC-2-Harboring *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 307 Isolates. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 62, n. 3, Mar 2018.

GREGORY, C. J. et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Puerto Rico associated with a novel carbapenemase variant. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 31, n. 5, p. 476-84, May 2010.

GU, D. et al. Comparison of the NG-Test Carba 5, Colloidal Gold Immunoassay (CGI) Test, and Xpert Carba-R for the Rapid Detection of Carbapenemases in Carbapenemase-Producing Organisms. **Antibiotics (Basel)**, v. 12, n. 2, Feb 2 2023.

GUO, Y. et al. Mutations in porin LamB contribute to ceftazidime-avibactam resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Emerg Microbes Infect**, p. 1-22, Sep 23 2021.

GUZMAN-PUCHE, J. et al. In vivo selection of KPC-94 and KPC-95 in *Klebsiella pneumoniae* isolates from patients treated with ceftazidime/avibactam. **Int J Antimicrob Agents**, v. 59, n. 2, p. 106524, Feb 2022.

HEMARAJATA, P.; HUMPHRIES, R. M. Ceftazidime/avibactam resistance associated with L169P mutation in the omega loop of KPC-2. **J Antimicrob Chemother**, v. 74, n. 5, p. 1241-1243, May 1 2019.

HERNANDEZ-GARCIA, M. et al. Impact of Ceftazidime-Avibactam Treatment in the Emergence of Novel KPC Variants in the ST307-Klebsiella pneumoniae High-Risk Clone and Consequences for Their Routine Detection. **J Clin Microbiol**, v. 60, n. 3, p. e0224521, Mar 16 2022.

HIDALGO-GRASS, C. et al. KPC-9, a novel carbapenemase from clinical specimens in Israel. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 11, p. 6057-9, Nov 2012.

HOBSON, C. A. et al. KPC Beta-Lactamases Are Permissive to Insertions and Deletions Conferring Substrate Spectrum Modifications and Resistance to Ceftazidime-Avibactam. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 64, n. 12, Nov 17 2020.

HOBSON, C. A. et al. Klebsiella pneumoniae Carbapenemase Variants Resistant to Ceftazidime-Avibactam: an Evolutionary Overview. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 66, n. 9, p. e0044722, Sep 20 2022.

HUANG, X. et al. Emergence of KPC-134, a KPC-2 variant associated with ceftazidime-avibactam resistance in a ST11 Klebsiella pneumoniae clinical strain. **Microbiol Spectr**, v. 11, n. 5, p. e0072523, Sep 29 2023.

HUMPHRIES, R. M. et al. First Report of Ceftazidime-Avibactam Resistance in a KPC-3-Expressing Klebsiella pneumoniae Isolate. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 59, n. 10, p. 6605-7, Oct 2015.

JIANG, M. et al. Diversity of Ceftazidime-Avibactam Resistance Mechanism in KPC2-Producing Klebsiella pneumoniae Under Antibiotic Selection Pressure. **Infect Drug Resist**, v. 15, p. 4627-4636, 2022.

JOSA, M. D. et al. Comparative Evaluation of Phenotypic Synergy Tests versus RESIST-4 O.K.N.V. and NG Test Carba 5 Lateral Flow Immunoassays for the Detection and Differentiation of Carbapenemases in Enterobacterales and Pseudomonas aeruginosa. **Microbiol Spectr**, v. 10, n. 1, p. e0108021, Feb 23 2022.

JURE, M. A. et al. Draft genome sequences of two hypermucoviscous carbapenem-resistant ST25 Klebsiella pneumoniae strains causing respiratory and systemic infections. **J Glob Antimicrob Resist**, v. 26, p. 174-176, Sep 2021.

KARLOWSKY, J. A. et al. In vitro activity of ceftazidime-avibactam against Enterobacterales and Pseudomonas aeruginosa isolates collected in Latin America

as part of the ATLAS global surveillance program, 2017-2019. **Braz J Infect Dis**, v. 25, n. 6, p. 101647, Nov-Dec 2021.

KAZMIERCZAK, K. M. et al. Epidemiology of Carbapenem Resistance Determinants Identified in Meropenem-Nonsusceptible Enterobacterales Collected as Part of a Global Surveillance Program, 2012 to 2017. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 65, n. 7, p. e0200020, Jun 17 2021.

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. **Clin Infect Dis**, v. 77, n. Suppl 1, p. S29-S37, Jul 5 2023.

KOPOTSA, K.; OSEI SEKYERE, J.; MBELLE, N. M. Plasmid evolution in carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: a review. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1457, n. 1, p. 61-91, Dec 2019.

LAGACE-WIENS, P.; WALKTY, A.; KARLOWSKY, J. A. Ceftazidime-avibactam: an evidence-based review of its pharmacology and potential use in the treatment of Gram-negative bacterial infections. **Core Evid**, v. 9, p. 13-25, 2014.

LEBRETON, F. et al. Characterization of KPC-82, a KPC-2 Variant Conferring Resistance to Ceftazidime-Avibactam in a Carbapenem-Nonsusceptible Clinical Isolate of *Citrobacter koseri*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 65, n. 7, p. e0015021, Jun 17 2021.

LEE, C. R. et al. Global Dissemination of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Genetic Context, Treatment Options, and Detection Methods. **Front Microbiol**, v. 7, p. 895, 2016.

LI, D. et al. Ceftazidime-Avibactam Resistance in *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 11 Due to a Mutation in Plasmid-Borne bla kpc-2 to bla kpc-33, in Henan, China. **Infect Drug Resist**, v. 14, p. 1725-1731, 2021.

LI, X. et al. Molecular Mechanisms Driving the In Vivo Development of KPC-71-Mediated Resistance to Ceftazidime-Avibactam during Treatment of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Infections. **mSphere**, v. 6, n. 6, p. e0085921, Dec 22 2021.

LI, X. et al. Emergence of a KPC Variant Conferring Resistance to Ceftazidime-Avibactam in a Widespread ST11 Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Clone in China. **Front Microbiol**, v. 12, p. 724272, 2021.

LIU, C. et al. The Rapid Emergence of Ceftazidime-Avibactam Resistance Mediated by KPC Variants in Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in Zhejiang Province, China. **Antibiotics (Basel)**, v. 11, n. 6, May 30 2022.

LIVERMORE, D. M. et al. Activity of ceftazidime/avibactam against problem Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* in the UK, 2015-16. **J Antimicrob Chemother**, v. 73, n. 3, p. 648-657, Mar 1 2018.

LOGAN, L. K.; WEINSTEIN, R. A. The Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: The Impact and Evolution of a Global Menace. **J Infect Dis**, v. 215, n. suppl_1, p. S28-S36, Feb 15 2017.

LOPES, R. et al. Detection of CTX-M-27-positive endophytic *Escherichia coli* ST131 lineage C1/H30R subclade carrying bla(KPC-2) on an IncX3-IncU plasmid in a fresh vegetable. **J Glob Antimicrob Resist**, v. 30, p. 178-179, Sep 2022.

MCDUGALL, F. K. et al. Novel strains of *Klebsiella africana* and *Klebsiella pneumoniae* in Australian fruit bats (*Pteropus poliocephalus*). **Res Microbiol**, v. 172, n. 7-8, p. 103879, Nov-Dec 2021.

MEHTA, S. C.; RICE, K.; PALZKILL, T. Natural Variants of the KPC-2 Carbapenemase have Evolved Increased Catalytic Efficiency for Ceftazidime Hydrolysis at the Cost of Enzyme Stability. **PLoS Pathog**, v. 11, n. 6, p. e1004949, Jun 2015.

MONTEIRO, J. et al. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 1, p. 333-4, Jan 2009.

MOREIRA, N. K.; CAIERAO, J. Ceftazidime-avibactam: are we safe from class A carbapenemase producers' infections? **Folia Microbiol (Praha)**, v. 66, n. 6, p. 879-896, Dec 2021.

MUELLER, L. et al. Phenotypic, biochemical and genetic analysis of KPC-41, a KPC-3 variant conferring resistance to ceftazidime-avibactam and exhibiting reduced carbapenemase activity. **Antimicrob Agents Chemother**, Sep 16 2019.

MUNOZ-PRICE, L. S. et al. Patient-to-Patient Transmission of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase Variants with Reduced Ceftazidime-Avibactam Susceptibility. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 63, n. 10, Oct 2019.

NAAS, T. et al. Beta-lactamase database (BLDB) - structure and function. **J Enzyme Inhib Med Chem**, v. 32, n. 1, p. 917-919, Dec 2017.

NELSON, K. et al. Resistance to Ceftazidime-Avibactam Is Due to Transposition of KPC in a Porin-Deficient Strain of *Klebsiella pneumoniae* with Increased Efflux Activity. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 61, n. 10, Oct 2017.

NICOLA, F. et al. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* ST11 Resistant To Ceftazidime-Avibactam Producing KPC-31 and the Novel Variant KPC-115 during COVID-19 Pandemic in Argentina. **Microbiol Spectr**, v. 10, n. 6, p. e0373322, Dec 21 2022.

NIU, S. et al. A Ceftazidime-Avibactam-Resistant and Carbapenem-Susceptible *Klebsiella pneumoniae* Strain Harboring bla KPC-14 Isolated in New York City. **mSphere**, v. 5, n. 4, Aug 26 2020.

PAPP-WALLACE, K. M. et al. Carbapenems: past, present, and future. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 55, n. 11, p. 4943-60, Nov 2011.

PEREIRA, M. D. O. **Caracterização fenotípica e genotípica de *Acinetobacter* spp. e *Pseudomonas aeruginosa* produtores de carbapenemase**. 2017. 77p (Doutorado). Universidade de São Paulo, São Paulo.

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

PFIZER. **Torgena: ceftazidima pentaidratada + avibactam sódico**: 22p. 2021.

PIRES, J.; NOVAIS, A.; PEIXE, L. Blue-carba, an easy biochemical test for detection of diverse carbapenemase producers directly from bacterial cultures. **J Clin Microbiol**, v. 51, n. 12, p. 4281-3, Dec 2013.

POIREL, L. et al. KPC-50 Confers Resistance to Ceftazidime-Avibactam Associated with Reduced Carbapenemase Activity. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 64, n. 8, Jul 22 2020.

POIREL, L. et al. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 70, n. 1, p. 119-23, May 2011.

RAISANEN, K. et al. Emergence of ceftazidime-avibactam-resistant *Klebsiella pneumoniae* during treatment, Finland, December 2018. **Euro Surveill**, v. 24, n. 19, May 2019.

RIBOT, E. M. et al. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. **Foodborne Pathog Dis**, v. 3, n. 1, p. 59-67, Spring 2006.

ROCHA-GRACIA, R. D. C. et al. IncFIB plasmids carrying the resistance gene blaCTX-M-15 in ESBL-producing Escherichia coli clones from pediatric patients. **J Infect Dev Ctries**, v. 16, n. 3, p. 500-506, Mar 31 2022.

ROSSOLINI, G. M.; STONE, G. G. Assessment of the in vitro activity of ceftazidime/avibactam against a global collection of multidrug-resistant Klebsiella spp. from the INFORM surveillance programme (2015-2017). **Int J Antimicrob Agents**, v. 56, n. 3, p. 106111, Sep 2020.

SAMPAIO, J. L.; GALES, A. C. Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae in Brazil: focus on beta-lactams and polymyxins. **Braz J Microbiol**, v. 47 Suppl 1, p. 31-37, Dec 2016.

SHEN, S. et al. Identification of KPC-112 from an ST15 Klebsiella pneumoniae Strain Conferring Resistance to Ceftazidime-Avibactam. **mSphere**, v. 7, n. 6, p. e0048722, Dec 21 2022.

SHI, Q. et al. Multiple Novel Ceftazidime-Avibactam-Resistant Variants of bla(KPC-2)-Positive Klebsiella pneumoniae in Two Patients. **Microbiol Spectr**, v. 10, n. 3, p. e0171421, Jun 29 2022.

SHIELDS, R. K. et al. Emergence of Ceftazidime-Avibactam Resistance Due to Plasmid-Borne blaKPC-3 Mutations during Treatment of Carbapenem-Resistant Klebsiella pneumoniae Infections. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 61, n. 3, Mar 2017.

SHIELDS, R. K. et al. Effects of Klebsiella pneumoniae carbapenemase subtypes, extended-spectrum beta-lactamases, and porin mutations on the in vitro activity of ceftazidime-avibactam against carbapenem-resistant K. pneumoniae. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 59, n. 9, p. 5793-7, Sep 2015.

SHIELDS, R. K. et al. Clinical Outcomes, Drug Toxicity, and Emergence of Ceftazidime-Avibactam Resistance Among Patients Treated for Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Infections. **Clin Infect Dis**, v. 63, n. 12, p. 1615-1618, Dec 15 2016.

SHROPSHIRE, W. C. et al. Accessory Genomes Drive Independent Spread of Carbapenem-Resistant Klebsiella pneumoniae Clonal Groups 258 and 307 in Houston, TX. **mBio**, v. 13, n. 2, p. e0049722, Apr 26 2022.

SPILIOPOULOU, I.; KAZMIERCZAK, K.; STONE, G. G. In vitro activity of ceftazidime/avibactam against isolates of carbapenem-non-susceptible Enterobacteriaceae collected during the INFORM global surveillance programme (2015-17). **J Antimicrob Chemother**, v. 75, n. 2, p. 384-391, Feb 1 2020.

SUN, L. et al. Phenotypic and genotypic analysis of KPC-51 and KPC-52, two novel KPC-2 variants conferring resistance to ceftazidime/avibactam in the KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 clone background. **J Antimicrob Chemother**, v. 75, n. 10, p. 3072-3074, Oct 1 2020.

SUNDARAMOORTHY, N. S. et al. New tools to mitigate drug resistance in Enterobacteriaceae - *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. **Crit Rev Microbiol**, v. 49, n. 4, p. 435-454, Aug 2023.

TAMMA, P. D. et al. Infectious Diseases Society of America 2023 Guidance on the Treatment of Antimicrobial Resistant Gram-Negative Infections. **Clin Infect Dis**, Jul 18 2023.

TAMMA, P. D.; SIMNER, P. J. Phenotypic Detection of Carbapenemase-Producing Organisms from Clinical Isolates. **J Clin Microbiol**, v. 56, n. 11, Nov 2018.

TOOKE, C. L. et al. Natural variants modify *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) acyl-enzyme conformational dynamics to extend antibiotic resistance. **J Biol Chem**, v. 296, p. 100126, Jan-Jun 2021.

TU, Y. et al. Emergence of a KPC-90 Variant that Confers Resistance to Ceftazidime-Avibactam in an ST463 Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Strain. **Microbiol Spectr**, v. 10, n. 1, p. e0186921, Feb 23 2022.

TUON, F. F. et al. Evaluation of in vitro activity of ceftolozane-tazobactam against recent clinical bacterial isolates from Brazil - the EM200 study. **Braz J Infect Dis**, v. 24, n. 2, p. 96-103, Mar-Apr 2020.

TUON, F. F.; ROCHA, J. L.; FORMIGONI-PINTO, M. R. Pharmacological aspects and spectrum of action of ceftazidime-avibactam: a systematic review. **Infection**, v. 46, n. 2, p. 165-181, Apr 2018.

VASQUEZ-PONCE, F. et al. Emergence of KPC-113 and KPC-114 variants in ceftazidime-avibactam-resistant *Klebsiella pneumoniae* belonging to high-risk clones ST11 and ST16 in South America. **Microbiol Spectr**, v. 11, n. 5, p. e0037423, Sep 6 2023.

VELOSO, M. et al. Antimicrobial resistance, pathogenic potential, and genomic features of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated in Chile: high-risk ST25 clones and novel mobile elements. **Microbiol Spectr**, v. 11, n. 5, p. e0039923, Sep 14 2023.

VILLA, L. et al. Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. **J Antimicrob Chemother**, v. 65, n. 12, p. 2518-29, Dec 2010.

WANG, D. et al. Phenotypic and enzymatic comparative analysis of the KPC variants, KPC-2 and its recently discovered variant KPC-15. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. e111491, 2014.

WANG, L. et al. Identification of a Novel Ceftazidime-Avibactam-Resistant KPC-2 Variant, KPC-123, in *Citrobacter koseri* Following Ceftazidime-Avibactam Treatment. **Front Microbiol**, v. 13, p. 930777, 2022.

WANG, Y. et al. Resistance to ceftazidime-avibactam and underlying mechanisms. **J Glob Antimicrob Resist**, v. 22, p. 18-27, Sep 2020.

WHO, W. H. O. **Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research**: World Health Organization: 7 p. 2017a.

_____. **Guidelines for the Prevention and Control of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae, *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* in Health Care Facilities**. Geneva: World Health Organization: 74 p. 2017b.

_____. **Thirteenth General Programme of Work (GPW13) Methods for Impact Measurement**. Geneva: World Health Organization 2020.

_____. **Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) Report 2022** Geneva: 71 p. 2022.

WINKLER, M. L.; PAPP-WALLACE, K. M.; BONOMO, R. A. Activity of ceftazidime/avibactam against isogenic strains of *Escherichia coli* containing KPC and SHV beta-lactamases with single amino acid substitutions in the Omega-loop. **J Antimicrob Chemother**, v. 70, n. 8, p. 2279-86, Aug 2015.

WISE, M. G. et al. In vitro activity of aztreonam-avibactam against Enterobacterales isolates collected in Latin America, Africa/Middle East, Asia, and Eurasia for the ATLAS Global Surveillance Program in 2019-2021. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 42, n. 9, p. 1135-1143, Sep 2023.

WONG, J. L. C. et al. OmpK36-mediated Carbapenem resistance attenuates ST258 *Klebsiella pneumoniae* in vivo. **Nat Commun**, v. 10, n. 1, p. 3957, Sep 2 2019.

WOODALL, C. A. In: CASALI, N. e PRESTON, A. (Ed.). **E. coli plasmid vectors: methods and applications**. Humana Press Inc. Totowa, NJ, v.235, 2003. cap. 6, p.61-65.

WU, Y. et al. Identification of a KPC Variant Conferring Resistance to Ceftazidime-Avibactam from ST11 Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Strains. **Microbiol Spectr**, v. 10, n. 2, p. e0265521, Apr 27 2022.

WYRES, K. L.; LAM, M. M. C.; HOLT, K. E. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. **Nat Rev Microbiol**, v. 18, n. 6, p. 344-359, Jun 2020.

XIE, M. et al. Characterisation of clinical carbapenem-resistant K1 *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* strains harbouring a virulence plasmid. **Int J Antimicrob Agents**, v. 60, n. 2, p. 106628, Aug 2022.

XIONG, L. et al. Molecular mechanisms underlying bacterial resistance to ceftazidime/avibactam. **WIREs Mech Dis**, v. 14, n. 6, p. e1571, Nov 2022.

YIGIT, H. et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, n. 4, p. 1151-61, Apr 2001.

ZHANEL, G. G. et al. Ceftazidime-avibactam: a novel cephalosporin/beta-lactamase inhibitor combination. **Drugs**, v. 73, n. 2, p. 159-77, Feb 2013.

ANEXO 1 – PRIMERS E CONDIÇÕES DA PCR PARA DETECÇÃO DE GENES DE ESBL NOS TRANSCONJUGANTES ALBERGANDO NOVAS VARIANTES KPC

PCR	Descrição	Primer	Sequência (5' - 3')	Amplicon (bp)	Concentração (pmol/μL)	Referência
Multiplex I ^a TEM, SHV e OXA-1-like	Variantes de TEM (TEM-1 e TEM-2)	MultiTSO-I_for	CATTTCCGTGTCGCCCTTATTC	800	0,4	Dallenne et al (2010)
		MultiTSO-I_rev	CGTTCA TCCA TAGTTGCCTGAC		0,4	
	OXA-1, OXA-4 e OXA-30	MultiTSO-O_for	GGCACCAGATTCAAC TTTCAAG	564	0,4	
		MultiTSO-O_rev	GACCCAAAGTTTCCTGTAA GTG		0,4	
Multiplex II ^a CTX-M grupos 1 e 9	Variantes do grupo 1 (CTX-M-1, CTX-M-3 e CTX-M-15)	MultiCTXMGp1_for	TTAGGAARTGTGCCGCTGYA	688	0,4	
		MultiCTXMGp1-2_rev	CGATATCGTTGGTGGTRCCAT		0,2	
	Variantes do grupo 9 (CTX-M-9 e CTX-M-14)	MultiCTXMGp9_for	TCAAGCCTGCCGATCTGGT	561	0,4	
		MultiCTXMGp9_rev	TGATTC TCGCCCGCTGAAG		0,4	
		MultiCaseDHA_for	TGATGGCACAGCAGGATATTC	997	0,5	
Multiplex III ^a DHA	DHA-1 e DHA-2	MultiCaseDHA_rev	GC TTTGACTCTTTCCGGTATTCG		0,5	
		Aline_OXA-2-Fw	CGCCTGCATCGACATTC AAG	574	0,2	
OXA-2 ^b	OXA-2	Aline_OXA-2-Rv	ATAGAGCGAAGGATTGCCCC		0,2	Neste estudo

^aCiclo de amplificação: etapa inicial: 94°C-10min; 30 ciclos: 94°C-40s, 60°C-40s e 72°C-1min; etapa final: 72°C-7 min.

^bCiclo de amplificação: etapa inicial: 94°C-2min; 35 ciclos: 94°C-30s, 55°C-30s, 72°C-1 min; etapa final: 72°C-7 min.

ANEXO 2- CARACTERÍSTICAS DOS PLASMÍDEOS COM *bla_{KPC}* DETECTADOS NESTE ESTUDO E GRUPOS CLONAIS POR PFGE E MLST DOS ISOLADOS QUE OS ALBERGAM

ID	KPC variante	GI/Replicons	Tamanho (pb)	Estado	Hospital	ST	Clone PFGE	NGS
M4114532	KPC-61	IncFIB	104.699pb	SP	H8	ST11	C	Illumina/MinION
N3133201	KPC-31	IncFII(K)	ND	SP	H9	ST512	A	Illumina
N4034288	KPC-33	IncFII(K)	ND	SP	H7	ST11	C	Illumina
N4043220	KPC-68	IncFII(K)	ND	SP	H2	ST512	A	Illumina
L7202969	KPC-90	IncFII(K)	ND	SP	H2	ST11	D	Illumina
N1301621	KPC-90	IncFII(K)	ND	SP	H11	ST16	G	Illumina
M7173549	KPC-104*	IncFII(K)-IncFIB	112.442	SP	H11	ST11	F	Illumina/MinION
N0244028	KPC-106*	IncFII(K)-IncFIB	211.359	SP	H14	ST16	G	Illumina/MinION
M7213934	KPC-139*	IncFII(K)-IncFIB	115.778	SP	H11	ST11	C	Illumina/MinION
N2251932	KPC-78	IncFII(K)-IncFIB	114.932	SP	H5	ST11	D	Illumina/MinION
L6132350	KPC-90	IncFII(K)-IncFIB	114.951	SP	H2	ST11	D	Illumina/MinION
N4214030	KPC-33 KPC-2	IncFII(K)-IncFIB CoRNAI	114.933 19.206	SP	H6	ST11	C	Illumina/MinION
M8143992	KPC-14	IncN	56.206	SP	H5	ST11	D	Illumina/MinION
N0194414	KPC-140*	IncN	46.577	RJ	H13	ST11	B	Illumina/MinION
N4103871	KPC-143*	IncN	47.969	SP	H14	ST11	D	Illumina/MinION
MV940851	KPC-31	IncN	75.949	RS	H3	ST11	J	Illumina/MinION
N1062450	KPC-33	IncN	ND	SP	H2	ST11	B	Illumina

L8263415	KPC-33	IncN	85.230	RS	H3	ST11	K	Illumina/MinION
N2053077	KPC-33	IncN	ND	SP	H5	ST11	E	Illumina
N5071671	KPC-35	IncN	84.456	SP	H14	ST16	M	Illumina/MinION
N5221227	KPC-44	IncN	ND	RJ	H13	ST11	B	Illumina
L9034133	KPC-61	IncN	85.280	RS	H3	ST11	E	Illumina/MinION
M3214378	KPC-71	IncN	ND	RJ	H13	ST11	B	Illumina
M5191546	KPC-8	IncN	102.430	SP	H11	ST11	C	Illumina/MinION
N3114796	KPC-33	IncQ1	ND	SP	H6	ST11	I	Illumina
L2304797	KPC-103*	IncX3/IncU	46.300	SP	H14	ST258	H	Illumina/MinION
M5282978	KPC-105*	IncX3/IncU	46.665	SP	H12	ST16	L	Illumina/MinION
M6284360-1	KPC-107*	IncX3/IncU	46.544	SP	H6	ST258	A	Illumina/MinION
M9171130	KPC-108*	IncX3/IncU	46.493	DF	H10	ST258	A	Illumina/MinION
N2192196	KPC-141*	IncX3/IncU	46.623	SP	H14	ST258	A	Illumina/MinION
N3182918	KPC-142*	IncX3/IncU	46.481	SP	H11	ST258	A	Illumina/MinION
X0200730-2	KPC-25	IncX3/IncU	ND	SP	H12	ST16	L	Illumina
N4213107	KPC-33	IncX3/IncU	46.362	SP	H4	ST258	A	Illumina/MinION
M7233093	KPC-81	IncX3/IncU	46.359	SP	H14	ST258	A	Illumina/MinION
N5303358	KPC-14	NT	ND	SP		ST11	E	Illumina
M8153373	KPC-25	NT	ND	SP		ST367	N	Illumina
M8161891	KPC-33	NT	ND	SP		ST11	F	Illumina

Legenda: GI: grupo de incompatibilidade; NT: não tipável; (*): novas variantes descritas neste estudo; NGS: Sequenciamento de Nova Geração; ST - Tipo de sequência definido por tipagem de sequência multilocus; ND – não determinado.
 Fonte: Produzida pela autora.