

GABRIELA RODRIGUES FRANCISCO

Análise do genoma completo de *Klebsiella pneumoniae*
produtoras de KPC-2 isoladas do meio ambiente e
ambiente hospitalar

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Pesquisas
Laboratoriais em Saúde Pública

Orientador: Prof.^a Dra. Doroti de
Oliveira Garcia

Co-orientador: Prof. Dr. Nilton Lincopan

São Paulo
2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Francisco, Gabriela Rodrigues

Análise do genoma completo de *Klebsiella pneumoniae* produtora de KPC-2 isoladas do meio ambiente e ambiente hospitalar / Gabriela Rodrigues Francisco, São Paulo. – 2018.

Tese (Doutorado em Ciências) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2018.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.

Orientação: Prof^o Dr.^o Doroti de Oliveira Garcia

Co-orientador: Prof. Dr. Nilton Lincopan

1. Meio ambiente.
2. *Klebsiella pneumoniae*.
3. Betalactamases.
4. Sequenciamento completo do genoma.

SES/CCD/CD-378/2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais Claudio e Dica que sempre me apoiaram e estiveram ao meu lado em todos os momentos, me incentivando e me ajudando de todas as formas possíveis para que eu conseguisse alcançar meus objetivos e aos meus irmãos Guilherme e Gustavo que também me apoiaram sempre.

Meu noivo e futuro marido Marcelo que sempre teve orgulho do meu trabalho e mesmo que eu desanimasse ele sempre me animava e me dizia que eu estava no caminho certo.

À toda a minha família que também sempre me apoiou de uma forma ou outra.

À minha orientadora Prof^a Dra. Doroti de Oliveira Garcia por todos esses anos de trabalho, companheirismo e dedicação e todo conhecimento que eu fui capaz de adquirir e compartilhar com ela.

Ao meu co-orientador Dr. Nilton Lincopan por todo o suporte e ajuda durante a realização deste trabalho e por diversas outras parcerias.

Aos colegas do Centro de Doenças Entéricas e Infecções por Patógenos Especiais do Centro de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, pelo apoio e amizade conquistada nesse período.

Aos amigos e colegas do Centro de Bacteriologia pelos momentos de descontração e apoio.

Às coleguinhas que agora são amigas para toda a vida Ana Paula, Juliana Failde, Juliana Pinhata, Laís e Natália por estarem sempre comigo durante todo esse processo e também me ajudando sempre.

As amigas da vida Georgia, Priscila, Juliana, Mariana e as N8 que também participaram dessa conquista.

À Maria Fernanda que sem dúvida foi minha maior amiga e parceira durante todo esse período, desde as coisas boas quanto as ruins. O dia-a-dia no laboratório, as conversas, conselhos e brigas. Uma amiga que nasceu no trabalho mas que levarei para a vida toda.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Este trabalho teve o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo 2012/21709-5 (Projeto Regular) e processo 2015/10551-0 (bolsa de doutorado).

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Este trabalho teve o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES

RESUMO

Klebsiella pneumoniae pertence à família Enterobacteriaceae. É um bacilo Gram-negativo, oportunista e seus principais alvos são indivíduos hospitalizados e imunodeprimidos. O aumento da ocorrência de *K. pneumoniae* MDR (Multirresistentes) e XDR (Extensivamente resistentes) é em decorrência de múltiplos fatores, tais como, disseminação de linhagens genéticas multirresistentes, aquisição de plasmídeos carreadores de genes de resistência localizados em transposons bem-sucedidos. A luta contra o desenvolvimento e disseminação da resistência aos antimicrobianos estava mais focada nos cenários hospitalar e de comunidade. No entanto, recentemente, o meio ambiente também foi colocado como fonte e rota de disseminação da resistência aos antimicrobianos. A sequência tipo (ST) 437 de *K. pneumoniae* é a mais frequente entre os isolados brasileiros e pertence ao complexo clonal (CC) 258, considerado de alto risco. Este ST também foi relatado na água dos principais rios da cidade de São Paulo, o rio Tietê e o rio Pinheiros. O objetivo deste estudo foi caracterizar o genoma completo de três cepas de *K. pneumoniae* produtoras de KPC-2, pertencentes ao ST437, sendo um isolado clínico e dois isolados do meio ambiente, analisar seu resistoma, viruloma, verificar a estabilidade do plasmídeo carreador do gene *bla*_{KPC-2} e analisar o ambiente genético dos genes *bla*_{KPC-2} e *bla*_{CTX-M-15}. As cepas foram resistentes e apresentaram CIM em alto nível para a maioria dos antimicrobianos testados e a análise pela ferramenta ResFinder mostrou a presença dos seguintes genes de resistência aos antimicrobianos: *aac(6')Ib-cr* (resistência aos aminoglicosídeos); *bla*_{OXA-1}, *bla*_{SHV-11}, *bla*_{CTX-M-15} e *bla*_{KPC-2} (resistência aos betalactâmicos); *aac(6')Ib-cr*, *oqxA* e *oqxB* (resistência às quinolonas); *fosA* (resistência à fosfomicina); *mph(A)* (resistência aos macrolídeos); *catB4* (resistência ao fenicol); *sul1* (resistência à sulfonamida) e *dfrA30* (resistência ao trimetoprim). O gene *bla*_{KPC-2} está flanqueado pelas ISKpn7 e ISKpn6, inserido no transposon Tn4401 isoforma b. O *bla*_{CTX-M-15} está flanqueado por uma cópia truncada da ISEcp1 e uma cópia também truncada da transposase do Tn2. À jusante da transposase do Tn2 foi observada um região flanqueada por duas cópias de IS26 que compreende os genes de resistência *bla*_{OXA-1}, *aac(6')Ib-cr5* e *catB4*. Foram observados também plasmídeos pertencentes aos grupos de incompatibilidade N, FIB e FII. Foram, também, detectados genes responsáveis por virulência, bombas de efluxo, resistência a metais, metais pesados e resistência a amônio quaternário. Foi observada estabilidade do plasmídeo carreador do *bla*_{KPC-2} por aproximadamente 100 gerações. Podemos inferir que o mesmo tipo de cepa presente nos isolados clínicos de hospitais, também está presente no meio ambiente. Este fato pode estar relacionado com a falta de legislação e infra-estrutura para o tratamento do efluente antes de descartá-los levando à contaminação dos rios, podendo atingir animais e seres humanos. Sendo assim, é importante o conceito de Saúde Única (One Health), que une meio ambiente, saúde animal e saúde humana no combate à disseminação de mecanismos de resistência aos antimicrobianos.

Palavras-Chave: Meio ambiente, *K. pneumoniae*, Betalactamases, WGS

ABSTRACT

Klebsiella pneumoniae belonging to the Enterobacteriaceae family, is a Gram-negative, opportunistic bacillus and its main targets are inpatients and immunosuppressed individuals. The increase in the occurrence of *K. pneumoniae* MDR (Multi-resistant) and XDR (Extensively resistant) is due to multiple factors, such as dissemination of multiresistant genetic lines, acquisition of plasmids carrying resistance genes located in successful transposons. The fight against the development and spread of antimicrobial resistance was more focused on hospital and community settings. However, recently, the environment has also been placed as a source and route of dissemination of antimicrobial resistance. *K. pneumoniae* belonging to Sequence Type (ST) 437 is the most frequent among Brazilian isolates and belongs to the clonal complex (CC) 258, considered to be a high risk clonal group. This ST was also reported in the water of the main rivers in Sao Paulo City, Tietê and Pinheiros Rivers. The aim of this study was to characterize the complete genome of three strains of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* belonging to ST437, one clinical isolate and two isolates from the environment, to analyze its resistome, virulome, to verify the stability of the plasmid carrying bla_{KPC-2} and to analyze the genetic environment of bla_{KPC-2} and bla_{CTX-M-15} genes. Samples were resistant and showed high MIC for most of the antimicrobial agents tested. ResFinder analysis showed the presence of the following resistance genes: aac(6')Ib-cr (aminoglycoside resistance); bla_{OXA-1}, bla_{SHV-11}, bla_{CTX-M-15} and bla_{KPC-2} (beta-lactam resistance); aac(6')Ib-cr, oqxA and oqxB (quinolone resistance); fosA (fosfomicin resistance); mph(A) (macrolide resistance); catB (phenicol resistance); sul1 (sulphonamide resistance) and dfrA30 (trimethoprim resistance). bla_{KPC-2} gene is flanked by IS_{Kpn7} and IS_{Kpn6}, inserted into transposon Tn4401 isoform b. bla_{CTX-M-15} is flanked by a truncated copy of IS_{Ecp1} and a truncated copy of Tn2 transposase. Downstream of the Tn2 transposase was observed a multiresistant region flanked by two copies of IS26 comprising the bla_{OXA-1}, aac(6')Ib-cr5 and catB4 resistance genes. Plasmids belonging to incompatibility groups N, FIB and FII were also observed. Genes responsible for virulence, efflux pumps, resistance to metals, heavy metals and resistance to quaternary ammonium were also detected. Stability of the plasmid carrying bla_{KPC-2} was observed for approximately 100 generations. We can infer that the same type of strain present in clinical isolates from hospitals is also present in the environment. This fact can be related to the lack of legislation and infrastructure for the treatment of the effluent before discarding them leading to the contamination of the rivers, being able to reach animals and humans. Therefore, the concept of One Health, which unites the environment, animal health and human health in the fight against the spread of antimicrobial resistance mechanisms, is important.

Keywords: Environment, *K. pneumoniae*, Beta-lactamases, WGS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

	Componente da pequena subunidade 30S dos ribossomos procarióticos
16S rRNA	
30S rRNA	Pequena subunidade 30S dos ribossomos procarióticos
AAC	Aminoglicosídeo acetiltransferase
ACT	"AmpC Type"
AK	Amicacina
AmpC	Betalactamase de classe C de Ambler
AMX	Amoxicilina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ANT	Aminoglicosídeo nucleotidiltransferase ou adeniltransferase
APH	Aminoglicosídeo fosfotransferase
ArmA	"Aminoglycosides Resistance Methylase"
ars	Gene que confere resistência ao arsênico
AT	Aztreonam
ATCC	"American Type Culture Collection"
be	"Base-Element"
bla	Betalactamase
BLAST	"Basic Local Alignment Search Tool"
bp	"Base pair"
CACO-2	Linhagem celular - "Caucasian colon adenocarcinoma"
cad	Gene que confere resistência ao cádmio
CARB	Carbenicillin-hydrolyzing betalactamase
CAU	Metalo-betalactamase de <i>Caulobacter vibrioides</i>
CAZ	Ceftazidima
CC	Complexo Clonal
CDC	"Center of Disease Control and Prevention"
CEFAP	Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa
CepA	Cefalosporinase endógena de <i>Bacteroides fragilis</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMHCA	Caldo Müeller-Hinton cátion-ajustado
CMY	"Cephamecinase"
CPS	Cápsula polissacarídea
CphA	Metalo-betalactamase da subclasse B2 de <i>Aeromonas hydrophila</i>
CTX	Cefotaxima
CTX-M	Cefotaximase, Munique
DAEE	Departamento de Águas e Energia Elétrica
DBK	Dibecacina

DNA	Ácido desoxirribonucleico
DR	"Direct repeat"
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetracético
EMAs	Enzimas modificadoras de amonoglicosídeos
ESBL	Extended Spectrum Beta Lactamase" (Betalactamase de amplo espectro)
ESKAPE	Grupo de micro-organismos que compreende <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Enterobacter</i> spp
ETP	Ertapenem
F	"Foward"
FE	Ferro
FEZ	Metallo-betalactamase da subclasse B3 de <i>Legionella (Fluoribacter) gormanii</i>
fet	Gene que confere resistência ao ferro
FOX	Cefoxitinase
GC	Grupo Clonal
GES	"Guiana Extended Spectrum"
GM	Gentamicina
GOB	Metallo-betalactamase da subclasse B3 de <i>Elizabethkingia meningoseptica</i>
GT	Glicosiltransferase
IMI	"Imipenem hydrolising betalactamase"
IMP	Imipenemase
IMP	Imipenem
Inc	"Incompatibility Group"
IND	Metallo-betalactamase de <i>Chryseobacterium indologenes</i>
int	Integrase
IP	Imipenem
IR	"Inverted repeats"
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
IRL	"Inverted repeats Left"
IRR	"Inverted repeats right"
IS	"Insertion Sequence" (Sequência de inserção)
kb	Kilo bases
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae carbapenemase</i>
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolissacarídeo
L1	Metallo-betalactamase da subclasse B3 de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
Mb	Mega bases
MDR	"Multidrug resistant"

MER	Meropenem
<i>mer</i>	Gene que confere resistência ao mercúrio
MIR	"Miriam Hospital"
MLST	"Multi Locus Sequence Type"
MP	Meropenem
NaCl	Cloreto de Sódio
NCBI	"National Center for Biotechnology Information"
NDM	"New Delhi metallo-beta-lactamase"
NEO	Neomicina
NH⁴⁺	Cátion Amônio
<i>nik</i>	Gene que confere resistência ao Níquel
NpmA	rRNA adenine N-1-methyltransferase
NT	Nota técnica
NTL	Netilmicina
Omp	"Outer Membrane Protein"
OMS	Organização Mundial de Saúde
ON	"Over night"
ORF	"Open Read Frame"
OXA	Oxacilinas
pb	pares de base
PBP	"Penicilin Binding Protein" (Proteína ligadora de penicilina)
<i>pbr</i>	Gene que confere resistência ao chumbo
PC1	Beta lactamase de <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>pco</i>	Gene que confere resistência ao cobre
PCR	"Polimerase Chain Reaction" (Reação de polimerase em cadeia)
PER	" <i>Pseudomonas</i> Extended Resistance"
PFGE	"Pulsed Field Gel Electrophoresis"
PM	Cefepima
pMLST	"Multi Locus Sequence Type" de plasmídeos
PMQR	"Plasmid-Mediated Quinolone Resistance"
PO	Polimixina B
PSE	" <i>Pseudomonas</i> specific enzymes"
QAC	"Quaternary ammonium compounds"
QRDR	"Quinolone resistance determining region"
R	"Reverse"
RAST	"Rapid Annotation using Subsystem Technology"
<i>rcn</i>	Gene que confere resistência ao Níquel e Cobalto
RI	"Resistance Integron"
<i>Rmt</i>	Gene codificador de metilase 16S rRNA
rpm	Rotações por minuto
rRNA	Ácido ribonucleico ribossômico
RTG	"Enzyme with RTG" (arginine, threonine e glycine)
SDS	Dodecil sulfato de sódio
Sfh	Metallo-beta-lactamase da subclasse B2 de <i>Serratia fonticola</i>

SHV	“Sulphydryl Variation”
SI	Superintegron
<i>sil</i>	Gene que confere resistência à prata
SIS	Sisomicina
SM	Estreptomicina
SME	<i>Serratia marcescens</i> “enzyme”
SPM	São Paulo metalo-betalactamase
spp	Espécies
ST	“Sequence Type”
T	Transmitância
TBE	Tris Borato EDTA
TE	Tris-EDTA
<i>teh</i>	Gene que confere resistência ao telurito
TEM	Temoneira
TGC	Tigeciclina
TM	Tobramicina
Tn	Transposon
TSA	“Tryptic Soy Agar”
TZ	Ceftazidima
TZP	Piperacilina–tazobactam
UFC	Unidades Formadoras de colônias
UPGMA	“Unweighted pair group method with arithmetic mean”
VEB	“Vietnam Extended Spectrum BetaLactamase”
VIM	“Verona Integron-encoded metallo-betalactamase”
WHO	"World Health Organization"
XDR	"Extensively drug-resistant"

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sistemas de aquisição de ferro em <i>K. pneumoniae</i> NTUH-K2044.	31
Tabela 2 - Classificação das beta-lactamases	36
Tabela 3 – Classificação das CTX-M em grupos	37
Tabela 4 - Fenótipos de resistência detectados de acordo com a produção das enzimas modificadoras de aminoglicosídeos	43
Tabela 5 - Principais grupos de incompatibilidade associados a genes de resistência em Enterobacteriaceae resistentes a antimicrobianos, isolados em todo o mundo de humanos e animais	48
Tabela 6 - Lista de patógenos que são prioridade para a OMS em relação ao descobrimento de novos antimicrobianos	61
Tabela 7 –Informações gerais dos plasmídeos carreadores do <i>bla</i> _{KPC-2} sequenciados	83
Tabela 8 - Número de reads, cobertura, contigs gerados, tamanho (pb), conteúdo GC e número de acesso das cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> sequenciadas.....	97
Tabela 9 - Identificação dos genes de resistência aos antimicrobianos observados através da ferramenta Resfinder e mutações cromossômicas das cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> sequenciadas.....	98
Tabela 10 - Identificação dos genes do sistema de efluxo, resistência a metais e metais pesados, Resistência a desinfetantes, antissépticos e	

compostos de amônio quaternário, porinas e virulência das cepas de *Klebsiella pneumoniae* sequenciadas..... 101

Tabela 11 – Grupos de incompatibilidade (Inc) observados nas amostras de *Klebsiella pneumoniae* sequenciadas..... 102

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática dos principais fatores de virulência em <i>K. pneumoniae</i>	26
Figura 2 - Principais mecanismos de ação dos antimicrobianos na célula bacteriana..	32
Figura 3 - Principais mecanismos de resistência aos antimicrobianos desenvolvidos pelos micro-organismos.	34
Figura 4 - Representação esquemática de 7 ambientes genéticos do <i>bla</i> _{CTX-M-15}	39
Figura 5 - Representação do Tn4401 e suas isoformas levando a diferentes contextos genéticos do <i>bla</i> _{KPC-2}	42
Figura 6 - Estrutura esquemática de um transposon e o processo de transposição de forma simplificada (A) e os tipos de repetições terminais (B)	51
Figura 7 - Representação esquemática de uma IS (A), um transposon de classe I ou composto (B) e um transposon complexo ou classe II (C).....	53
Figura 8 - Exemplos de estruturas de integron classe 1 (A) e integrons classe 2 (B).	55
Figura 9 - Surgimento e disseminação de <i>K. pneumoniae</i> MDR e XDR e genes de resistência aos antimicrobianos.	65

Figura 10 - Distância em Km do hospital do qual foi selecionada a cepa de <i>K. pneumoniae</i> produtora de KPC-2 pertencente ao ST437 até os pontos de coleta das cepas provenientes dos Rios Tietê e Pinheiros.	68
Figura 11 - Resultado do teste de CIM para as cepas do estudo..	79
Figura 12 - Dendrograma mostrando o perfil de PFGE das cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	80
Figura 13 - Plasmídeos observados nas cepas de <i>K. pneumoniae</i>	81
Figura 14 – Comparação dos plasmídeos das cepas selvagens (Kp148 e Kp314) com as respectivas cepas transformadas para o gene <i>bla_{KPC-2}</i> (Kp148TF1 e Kp314TF1) de <i>K. pneumoniae</i>	82
Figura 15 - Estrutura do plasmídeo IncN pKP148, PINH-4900(1) que carrega o gene <i>bla_{KPC-2}</i>	84
Figura 16 - Estrutura do plasmídeo IncN pKP196, TIET-4200 que carrega o gene <i>bla_{KPC-2}</i>	85
Figura 17 - Estrutura do plasmídeo IncN pKp314/11a que carrega o gene <i>bla_{KPC-2}</i>	86
Figura 18 - Alinhamento dos 3 plasmídeos pKP148, PINH-4900(1), pKP196, TIET-4200 e pKp314/11a.	88
Figura 19 - Representação do número de colônias nas placas contendo meio de cultura com e sem ertapenem ao longo dos dias T0, T3, T5 e T10 na diluição 10 ⁻⁵	89
Figura 20 - Teste de estabilidade plasmidial.	90

Figura 21 – PCR confirmando a ausência do <i>bla</i> _{KPC-2} nas colônias 26 da cepa Kp148-PINH,4900 e 33 da cepa Kp196-TIET,4200 da placa sem ertapenem do tempo T10.....	91
Figura 22 - PCR confirmando a presença do <i>bla</i> _{SHV} nas colônias 26 da cepa Kp148-PINH,4900 e 33 da cepa Kp196-TIET,4200 da placa sem ertapenem do tempo T10.....	91
Figura 23 – PFGE com a enzima <i>Xba</i> I e S1-nuclease PFGE das cepas Kp148 e Kp196 e das respectivas colônias Kp148 colônia 26 e Kp196 colônia 33.....	92
Figura 24 - Alinhamento do ambiente genético do <i>bla</i> _{CTX-M-15} das três cepas KP148, PINH-4900, KP196, TIET-4200 e Kp314/11.....	94
Figura 25 - Alinhamento do ambiente genético do <i>bla</i> _{CTX-M-15} da cepa Kp314/11 com outros ambientes genéticos descritos no Brasil.	96
Figura 26 - Alinhamento do ambiente genético do <i>mgrB</i> das três cepas do estudo KP148, PINH-4900, KP196, TIET-4200 e Kp314/11.....	99
Figura 27 – Árvore construída com o software Geneious utilizando-se o método de neighbor-joining para comparação das sequências de <i>fosA</i> depositadas no Genbank..	100
Figura 28 - Alinhamento do ambiente genético do <i>mrkD</i> das três cepas do estudo KP148, PINH-4900, KP196, TIET-4200 e Kp314/11.....	102
Figura 29 – Comparação das três cepas do estudo em relação à composição gênica referente a resistência à antimicrobianos, virulência, sistemas de efluxo, resistência a metais e metais pesados, resistência a desinfetantes e composto Qac.....	104

Figura 30 – Comparação feita pelo BRIG (Blast Ring) do genoma das três cepas do estudo com a *Klebsiella pneumoniae* 30684NJST258_2. 105

ÍNDICE

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	21
1.2 Fatores de virulência	25
1.2.1 Antígenos Capsulares	26
1.2.2 Fímbrias	27
1.2.3 Lipopolissacarídeos	29
1.2.4 Sideróforos	30
1.3 Antimicrobianos	31
1.3.1 Mecanismo de ação	32
1.3.2 Mecanismos de resistência aos antimicrobianos	33
1.3.2.1 Resistência aos betalactâmicos.	34
1.3.2.1.1 CTX-M	37
1.3.2.1.2 KPC	40
1.3.2.2 Resistência aos aminoglicosídeos	42
1.3.2.3 Resistência às quinolonas	44
1.3.2.4 Resistência às polimixinas	45
1.4 Elementos móveis	45
1.4.1 Plasmídeos	46
1.4.1.1 Plasmídeos envolvidos na resistência aos antimicrobianos em <i>K. pneumoniae</i>	48
1.4.2 Sequências de inserção e Transposons	49
1.4.3 Cassetes genéticos e Integrons	53
1.5 Bombas de efluxo e perda de porina	55
1.5.1 Bombas de efluxo	55
1.5.2 Perda de porina	58

1.6 Resistência a metais, metais pesados e amônios quaternários	59
1.7 Resistência antimicrobiana no meio ambiente.....	61
1.8 Interação da resistência aos antimicrobianos entre o ambiente, o hospital e animais	64
2 OBJETIVOS	66
2.1 Objetivo Geral.....	66
2.2 Objetivo Específico	66
3 MATERIAIS E MÉTODOS	67
3.1 Amostragem.....	67
3.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	68
3.2.1 E-test®	69
3.2.2 Microdiluição em caldo	69
3.3 Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE)	70
3.3.1 Preparo das Amostras.....	70
3.3.2 Digestão das amostras com enzima de restrição.....	71
3.3.3 Preparo do gel e eletroforese	71
3.3.4 Análise dos dados	72
3.4 S1 Nuclease - PFGE.....	72
3.4.1 Preparo das Amostras	72
3.4.2 Digestão dos plugs com a enzima S1 nuclease	72
3.4.3 Eletroforese em Campo Pulsado.....	73
3.5 Extração do DNA plasmidial	73
3.6 Experimentos de transformação	74
3.7 Extração do DNA genômico e plasmidial para biblioteca genômica ...	74
3.8 Montagem da biblioteca genômica e sequenciamento	75
3.8.1 Plataforma Illumina com sistema MiSeq.....	75

3.8.2	Plataforma Illumina com sistema NextSeq	75
3.9	Montagem dos plasmídeos	75
3.10	Montagem do cromossomo	76
3.11	Teste de estabilidade do plasmídeo que carrega o <i>bla_{KPC-2}</i>	77
3.12	Hibridação com sonda marcada para detecção do plasmídeo carreador do <i>bla_{CTX-M-15}</i>	78
4.1	Concentração Inibitória Mínima	79
4.2	PFGE	80
4.3	S1 Nuclease - PFGE.....	80
4.4	Sequenciamento completo e análise dos plasmídeos que carregam o gene <i>bla_{KPC-2}</i>	82
4.5	Teste de estabilidade plasmidial	89
4.6	Análise do ambiente genético dos plasmídeos carreadores do <i>bla_{CTX-M-15}</i>	92
4.7	Análise do genoma	97
5	DISCUSSÃO	106
6	CONCLUSÕES	121
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	122

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae pertence à família Enterobacteriaceae, é um bacilo Gram-negativo anaeróbico facultativo, imóvel, não esporulado, pode formar cápsula mucóide polissacarídica devido a presença de antígenos K e têm como função proteção contra ação de bactericidas e fagocitose e ajudam na aderência (Martínez et al., 2004).

Pode ser saprófita em humanos e animais, colonizando a nasofaringe e o trato intestinal, sendo que a taxa de indivíduos portadores varia de estudo para estudo, variando de 5-38% nas fezes e 1-6% na nasofaringe (Podschun e Ullmann, 1998). No ambiente hospitalar esta situação é bem diferente, a taxa de colonização aumenta para 77% nas fezes, 19% na nasofaringe e 42% nas mãos. Esse aumento na taxa de colonização parece estar associado com o uso de antimicrobianos e ao tempo de internação (Podschun e Ullmann, 1998).

É um micro-organismo oportunista e seus principais alvos são indivíduos hospitalizados, imunodeprimidos. Possui elevada prevalência entre os micro-organismos relacionados com as Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) podendo causar doença em qualquer sítio (Scarpate e Cossatis, 2009), sendo responsável por pelo menos um terço de todas as infecções causadas por Gram-negativos (Podschun e Ullmann, 1998).

Já foi demonstrado que pelo menos 80% dos pacientes com infecção por *K. pneumoniae* resistentes aos antimicrobianos tiveram infecções precedidas pela colonização do trato gastrointestinal (Paterson e Bonomo, 2005).

Sua importância no ambiente hospitalar é devida à capacidade de desenvolver mecanismos de resistência aos antimicrobianos e também a sua virulência. Representa um dos micro-organismos de maior preocupação envolvidos na resistência aos antimicrobianos e, junto com outros micro-organismos multirresistentes (MDR) está classificado no grupo ESKAPE,

que compreende os micro-organismos *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter* spp, que têm causado a maior parte das infecções em hospitais em todo mundo (Boucher et al., 2009).

Livermore, 1995 destacou que, entre os micro-organismos produtores de betalactamases de espectro ampliado (ESBL), o gênero *Klebsiella* é o que produz a maior variedade dessas enzimas, o que pode ser explicado pelo fato destes serem bons vetores para plasmídeos ou por permitirem a evolução de genes que codificam ESBL mais rapidamente que outras Enterobacteriaceae e também à habilidade das *K. pneumoniae* produtoras de ESBL de escapar da atividade fagocítica dos polimorfonucleares neutrófilos.

Além da produção de ESBL, observou-se o aumento da produção de outra enzima pelas *K. pneumoniae* que confere resistência a todos os betalactâmicos incluindo os carbapenêmicos e recebeu o nome de KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), relatada pela primeira vez em isolados da Carolina do Norte em 1996 (Yigit et al., 2001).

De acordo com dados da rede de vigilância europeia de resistência aos antimicrobianos, de 2005 a 2015, as taxas de *K. pneumoniae* não-suscetíveis às cefalosporinas de terceira geração, carbapenêmicos e aminoglicosídeos são mais altas quando comparadas com as taxas de *E. coli* não-suscetíveis (<http://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx>, acesso em 10/05/2018).

Devido à pressão seletiva causada pelo uso de antimicrobianos, o resistoma da *K. pneumoniae*, ou seja, a coleção de genes que conferem resistência aos antimicrobianos, evolui constantemente podendo acumular diversos genes de resistência aos antimicrobianos em seu contexto genético levando a evolução de clones MDR e XDR (Navon-Venezia et al., 2017). O aumento mundial da ocorrência de *K. pneumoniae* MDR e XDR é em decorrência de múltiplos fatores, tais como, disseminação de linhagens genéticas multirresistentes (Woodford et al., 2011), aquisição de plasmídeos

carreadores de genes de resistência e aquisição de genes de resistência localizados em transposons bem-sucedidos (Navon-Venezia et al., 2017).

K. pneumoniae é considerada, hoje, uma fonte mundial de disseminação da resistência aos carbapenêmicos, devido a facilidade de transmissão dos plasmídeos que carregam esse tipo de resistência para outros micro-organismos. A disseminação de plasmídeos carreadores de *bla*_{ESBL} e carbapenemases e a aquisição destes, é uma ameaça para a transformação de um micro-organismo em MDR ou XDR (Navon-Venezia et al., 2017).

Existem clones de *K. pneumoniae* considerados de alto risco. Clones de alto risco são definidos por isolados pertencentes ao mesmo sequence type (ST) de acordo com o esquema do Multi Locus Sequence Type (MLST) que, no entanto, já foram isolados em diferentes partes do mundo em períodos diferentes. Estes clones devem ser identificados, monitorados e controlados. O critério utilizado para definição de clones de alto risco em *K. pneumoniae* foi um clone que causou pelo menos 4 surtos reconhecidos e que já foi reportado em mais de 10 países (Navon-Venezia et al., 2017). Dessa forma, Navon-Venezia e colaboradores (2017) identificaram 9 clones de alto risco que pertencem a 6 complexos clonais: CC258 (ST258, ST11 e ST512), CC15 (ST14 e ST15), CC47 (ST47), CC37 (ST37), CC101 (ST101), CC17 (ST17). O principal complexo clonal é o CC258, responsável por 68% de todos os surtos relatados, tendo como principais causadores os ST258, ST11 e ST512.

O sucesso internacional de disseminação do ST258 não está totalmente esclarecido. Deleo e colaboradores (2014) tentaram explicar este fato através do sequenciamento do genoma completo deste ST e comparando com outros STs, que resultou na descrição de uma região de divergência que incluía genes envolvidos na síntese de cápsula polissacarídica. Esta região parecia estar relacionada com eventos de recombinação de DNA sugerindo que esta região contribuiria para o sucesso de *K. pneumoniae* ST258. Outro estudo feito por Chmelnitsky e colaboradores (2013) comparou os genes presentes em *K. pneumoniae* pertencentes ao ST58 e também do CC258 com outros STs. Os autores

identificaram um grupo de 17 genes únicos e ubíquos ao CC258 e outro grupo de 19 genes único ao ST258. A maioria das proteínas codificadas por esses genes pertence a dois grupos funcionais: motilidade e secreção celular e reparação e modificação do DNA. Sendo assim, eles sugeriram que estes genes podem estar relacionados com o grande sucesso da disseminação deste ST e dos STs presentes em seu complexo clonal.

No Brasil, o ST258 foi considerado o mais frequente por Andrade e colaboradores (2011). Estudos publicados posteriormente (Seki et al., 2011; Pereira et al., 2013) mostraram que o clone predominante no Brasil pertence ao ST437 que, assim como o ST258, pertence ao CC258 e está associado à produção de KPC-2 (Andrade et al., 2011; Seki et al., 2011; Pereira et al., 2013). A predominância do ST437 não foi explicada por nenhum estudo até o momento, mas pode ser devido à adaptação da KPC-2 no Brasil e a coprodução da KPC-2 com outras ESBLs, como a CTX-M.

O ST437 foi primeiramente descrito em isolados do Brasil em 2011 por Seki et al, em isolados de 2007 a 2009, dos Estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo. No mesmo ano foi descrito também por Andrade et al. (2011) em isolado do Rio de Janeiro do ano de 2009. Em seu estudo, Seki et al. (2011) concluíram que o ST437 era o mais frequente entre os isolados brasileiros, o que se comprovou por estudos posteriores, como o de Pereira et al. (2013) que descreveram este ST em isolados de Santa Catarina, Espírito Santo, Ceará e Rio de Janeiro e o estudo de Fehlberg et al. (2012) em isolados da Paraíba. Braun et al. (2018), relataram a ocorrência do ST437 em isolados de 2009 a 2014, relacionado com resistência a polimixina B em São Paulo. Foi também relatado em Porto Alegre (Dalmolin et al., 2018).

O ST437 também foi relatado na água dos principais rios da cidade de São Paulo, o rio Tietê e o rio Pinheiros (Oliveira et al., 2014). Oliveira et al. (2014) detectaram, além do ST437, o ST340, também pertencente ao CC258, na água do Rio Tietê, demonstrando como estes STs podem sair do ambiente hospitalar e chegar ao meio ambiente facilitando sua disseminação.

Não havia relato do ST437 fora do Brasil. No entanto, Oteo e colaboradores (2013), relataram a ocorrência deste ST em um isolado na Espanha associado com a produção de OXA-245, Seara et al. (2015) relataram, na Espanha, um surto de *K. pneumoniae* pertencente ao ST437 associado com a produção de NDM-7 e posteriormente, Novović et al. (2017), relataram um isolado na Sérvia associado com OXA-48 e CTX-M-15. Nenhum destes relatos foram relacionados com internação prévia no Brasil.

1.2 Fatores de virulência

Virulência é a capacidade relativa de um micro-organismo causar dano ao hospedeiro, pois o processo que leva a uma infecção ou doença possui vários componentes. Fatores de virulência são metabólitos ou estruturas bacterianas utilizadas no desenvolvimento do processo infeccioso que permitem que o micro-organismo entre, replique, dissemine e persista no hospedeiro, seja por mecanismos de destruição ou escape do sistema imunológico (Taddei & Martinez, 2015).

Em *K. pneumoniae* foram identificados quatro principais tipos de fatores de virulência que contribuem para sua patogenicidade, tais como, antígenos capsulares, fímbrias (pili), lipopolissacarídeos e produção de sideróforos, descritos na Figura 1 (Podschun e Ullmann, 1998).

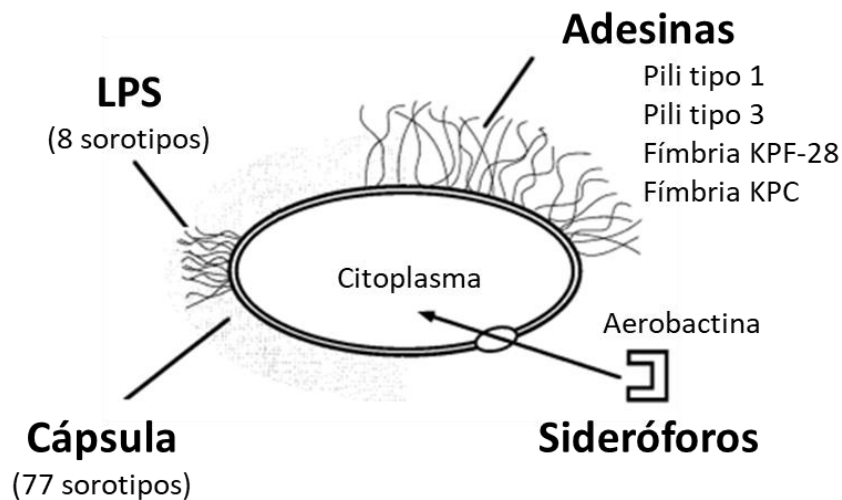


Figura 1 - Representação esquemática dos principais fatores de virulência em *K. pneumoniae* (adaptado de Podschun e Ullmann, 1998).

1.2.1 Antígenos Capsulares

Um dos principais fatores de virulência de *K. pneumoniae* é a produção de cápsula polissacarídea (CPS), que tem como função, resistência ao soro e proteção contra fagocitose. A produção da CPS é impulsionada principalmente pela expressão de genes localizados em um locus chamado *cps*, e a estrutura resultante é usada para distinguir entre diferentes sorotipos (tipos K) (Podschun e Ullmann, 1998; Ramos et al., 2012). A estrutura consiste em quatro a seis açúcares e, muitas vezes, contém também ácidos urônicos (como componentes carregados negativamente), podendo ser classificado em 77 tipos sorológicos (Podschun e Ullmann, 1998).

Existem diferenças no grau de virulência conferido pelos diferentes tipos de cápsula de *K. pneumoniae*, dependendo do conteúdo de manose e/ou ramnose da CPS. Cepas expressando os antígenos K1 e K2 foram especialmente virulentos em um modelo de peritonite em camundongos, enquanto isolados de outros sorotipos mostraram pouca ou nenhuma virulência. Já em lesões de pele induzidas experimentalmente em camundongos, cepas dos sorotipos K1, K2, K4 e K5 foram mais virulentas

que aquelas que expressam outros tipos de cápsula (Podschun e Ullmann, 1998). A síntese da CPS ocorre, inicialmente, no lado citoplasmático da membrana interna e a montagem das repetições de açúcares são ligadas pela atividade de glicosiltransferases específicas (GTs). Estes são invertidos através da membrana interna pela ação da proteína Wzx e sofrem polimerização pela ação da proteína Wzy. O controle de polimerização e translocação do polímero nascente para a superfície da célula ocorre com o coordenado da ação das proteínas Wza, Wzb e Wzc (Whitfield e Paiment, 2003).

A variação do tipo K tem sido associada à presença ou ausência de genes particulares no locus *cps*. O locus *cps* tem uma estrutura de mosaico, com um grupo de seis genes conservados (*galF*, *orf2*, *wzi*, *wza*, *wzb* e *wzc*) na porção 5' (Brisse et al., 2013). Sendo assim, Brisse e colaboradores (2013) desenvolveram um método que realiza o sequenciamento do *wzi*, que codifica uma proteína de membrana externa envolvida na ligação da cápsula à superfície celular, como um método simples e rápido para a predição do tipo K e conseguiu prever em 94% dos isolados. Pan et al., 2015, utilizam o sequenciamento do gene *wzc* para determinação do tipo K.

1.2.2 Fímbrias

As fímbrias ou pili são apêndices formados por proteínas em forma de bastão, são as estruturas adesivas mais encontradas nas bactérias Gram-negativas e são responsáveis pela adesão do micro-organismo nas mucosas do hospedeiro (Taddei & Martinez, 2015).

Pelo menos 4 tipos de fímbrias já foram caracterizados em *K. pneumoniae*, fímbria tipo 1, tipo 3, Kpc e adesina KPF-28. Foi descrita no cromossomo de *K. pneumoniae* uma região conservada codificadora de fímbria que é composta pelos genes regulatórios *mrkHIJ*, o cluster *mrkABCDF* de fímbria tipo 3, os genes de codificação de fímbria tipo 1

fimBEAICDFGHK e uma região de quatro genes entre os clusters de fímbria tipo 3 e 1 (Struve et al., 2009).

As fímbrias tipo 1 são finas, rígidas, adesivas, semelhantes a fios na membrana externa, em comparação com *E. coli*, o cluster do gene *fim* de *K. pneumoniae* possui um gene *fimK* que atua como regulador transcricional e pode se ligar especificamente a um promotor a jusante de *fimA* para estimular sua transcrição (Wang et al., 2013; Li et al., 2014). As fímbrias tipo 1 de *K. pneumoniae* estendem-se além da cápsula e participam da adesão bacteriana a estruturas contendo manose de células hospedeiras ou em matrizes extracelulares através da adesina *fimH* (Rosen et al., 2008). As fímbrias tipo 1 de *K. pneumoniae* são essenciais para o estabelecimento inicial da infecção do trato urinário, no entanto, não têm efeito sobre a capacidade de colonizar o intestino ou infectar o pulmão (Li et al., 2014).

As fímbrias tipo 3 de *K. pneumoniae* possuem de 2 a 4 nm de largura e 0,5 a 2 µm de comprimento. O gene *mrkA* codifica a subunidade fimbrial, que é polimerizada para formar o eixo fimbrial helicoidal. A subunidade com capacidade de se ligar às moléculas de colágeno, é codificada pelo gene *mrkD*. Os genes *mrkB*, *mrkC* e *mrkF* são responsáveis pela montagem e estabilização da fímbria (Li et al, 2014).

As fímbrias do tipo Kpc são codificadas pelo operon *kpcABCD*, e estão altamente associadas a *K. pneumoniae* hiper mucosa sendo responsáveis pela formação de biofilme (Li et al, 2014).

KPF-28 é uma fímbria longa, fina e flexível, com 4 a 5 nm de diâmetro e 0,5 a 2 mm de comprimento, e o gene estrutural da subunidade principal do KPF-28 está localizado num plasmídeo R transferível que codifica a β-lactamase CAZ-5/SHV-4. Não foi observada expressão da KPF-28 em transconjugantes de *E. coli* contendo apenas o plasmídeo codificador de CAZ-5/SHV-4, desta forma, pode-se inferir que um ou mais fatores codificados pelo cromossomo de *K. pneumoniae* são necessários para promover a expressão do KPF-28 (Di Martino et al., 1996). As fímbrias KPF-28 contribuem para a adesão de *K. pneumoniae* a linhagens celulares Caco-

2 humanas, indicando que as essas fímbrias podem ser um fator de colonização dentro do intestino de mamíferos (Li et al., 2014).

1.2.3 Lipopolissacarídeos

A endotoxina mais estudada é o lipopolissacarídeo (LPS) presente na membrana externa de *E. coli* e outros membros da família Enterobacteriaceae (Piazza et al., 2015).

O LPS compreende três partes: o lipídeo A altamente conservado e hidrofóbico ancorado na membrana externa; o antígeno O altamente variável como o componente mais externo do LPS; e o polissacarídeo do núcleo ou cerne que liga os antígenos A e O-lipídico (Li et al., 2014).

O antígeno O consiste em uma variedade de resíduos oligossacarídeos que recobrem a superfície da célula protegendo-a da ação de substâncias hidrofóbicas, como a bile e contribui para a resistência contra morte pela ação do sistema complemento. Já foram descritos pelo menos 9 grupos de antígenos O em *K. pneumoniae* (O1, O2, O2ac, O3, O4, O5, O7, O8 e O12). O antígeno O é sintetizado a partir do produto dos genes do cluster *wb*, que inclui, os genes *wzm*, *wzt*, *wbbM*, *glf*, *wbbN* e *wbbO*. O1 é o sorotipo mais comum em isolados clínicos de *K. pneumoniae* (Li et al., 2014).

O cerne consiste de um pequeno número de açúcares comuns a praticamente todas as enterobactérias. Dois tipos (Tipo 1 e tipo 2) já foram caracterizados em *K. pneumoniae* os quais são sintetizados pelo produto de 2 diferentes clusters do gene *wa*, compostos por 11 genes, *hldD*, *waaF*, *waaC*, *waaL*, *waaQ*, *wabG*, *wabH*, *orf10*, *waaA*, *waaE* e *coaD* comuns aos dois tipos e 2 genes que diferem entre os tipos, o tipo 1 possui os genes *wabI* e *wabJ* e o tipo 2 os genes *wabK* e *wabM*. O tipo 1 apresenta uma maior virulência do que o tipo 2 em modelos de murinos infectados via intraperitoneal (Li et al., 2014).

A parte tóxica do LPS é o lipídeo A, que é um glicolipídeo composto de dissacarídeos, aos quais se encontram ligados ácidos graxos de cadeia curta e grupos fosfatos (Piazza et al., 2015). O lipídeo A é sintetizado no

citoplasma por enzimas conservadas, transportado pelo sistema ABC MsbA e ancorado na membrana externa. Durante o seu transporte podem ocorrer modificações em sua estrutura devido a estímulo do ambiente o que leva na mudança no seu nível de virulência. Modificações no lipídeo A contribui para resistência defesas do sistema imune, especialmente resistência a peptídeos antibacterianos (Li et al, 2014).

1.2.4 Sideróforos

O ferro é um elemento essencial para todos os organismos vivos, ele auxilia em muitos processos importantes como respiração e síntese de ribonucleotídeos. No entanto, o ferro não está prontamente disponível em ambientes aquáticos, terrestres ou em hospedeiros animais. Devido a isto, diversas estratégias são utilizadas pelos micro-organismos para obtenção de ferro livre ou em compostos complexos, entre elas a produção de sideróforos (Taddei & Martinez, 2015).

Os sideróforos são compostos de baixo peso molecular, marcados por uma grande afinidade por FeIII, podem ser divididos em dois grupos principais, os fenolatos e os hidroxamatos. Estes compostos formam complexos solúveis com FeIII, os quais são absorvidos por receptores da membrana externa. São expressos apenas em meio restrito de ferro (Taddei & Martinez, 2015).

No grupo dos fenolatos a enterobactina é um membro clássico, presente em quase todas as enterobactérias, é produto dos genes *entA-G* e também os genes adicionais *fep* e *fes*. No grupo dos hidroxamatos a aerobactina é produzida por diversos membros das enterobactérias, sua expressão é regulada pelos genes *fur*, *iucA-D* e *iutA* (Taddei & Martinez, 2015).

Em *K. pneumoniae* já foram descritos outros mecanismos de aquisição de ferro, conforme mostra a Tabela 1 (Li et al, 2014)

Tabela 1 - Sistemas de aquisição de ferro em *K. pneumoniae* NTUH-K2044.

Categoria	Sistema	Substrato	Nome do gene
Feo	Feo	Fe ²⁺	<i>feoABC</i>
Transporte ABC	Sit	Fe ²⁺	<i>sitABCD</i>
	Kfu	Fe ³⁺	<i>kfuABCD</i>
	Fec	Citrato férrico	<i>fecBDEA</i>
	Yiu	Desconhecido	<i>yiABC</i>
Baseado em hemóforos	Hmu	Hemina/Hemoproteína	<i>hmuRSTUV</i>
Baseado em sideróforos	Fep-Ent	Enterobactina	<i>fepA-entE</i>
			<i>fes-entF</i>
			<i>fepDGC</i>
			<i>ybdA</i>
			<i>fepB</i>
			<i>entCEBA</i>
	Fhu	Ferricromo	<i>fhuABCD</i>
	IroA	Salmocelina	<i>iroN</i>
			<i>iroBCD</i>
			<i>iroBCDN</i>
Ilha de alta patogenicidade	Iuc	Aerobactina Yersiniabactina	<i>iucABCD-iutA</i>
			<i>ybtPQXS</i>
			<i>ybtA-irp2-irp1-ybtUTE-fyuA</i>

Fonte: Li et al, 2014

1.3 Antimicrobianos

Antibióticos ou antimicrobianos são substâncias químicas produzidas por micro-organismos ou de forma sintética, com capacidade de inibir ou matar micro-organismos (Rossi & Andreazzi, 2005). São classificados principalmente nas seguintes classes: betalactâmicos, glicopeptídeos, aminoglicosídeos, macrolídeos, lincosamida, tetraciclina, fenicol, quinolonas, sulfas e polimixinas, baseando-se no mecanismo de ação sobre a célula bacteriana e sua estrutura química, (Rossi & Andreazzi, 2005). As classes mais utilizadas para o tratamento de infecções por Bacilos Gram-negativos (BGN) são betalactâmicos, aminoglicosídeos, quinolonas e polimixinas.

1.3.1 Mecanismo de ação

Os principais mecanismos de ação dos antimicrobianos são: efeito sobre a síntese da parede celular, inibição da síntese protéica, efeito sobre a estrutura e função da membrana celular, interferência na síntese do ácido nucléico e atividade antimetabólica ou competitividade antagônica (Rossi & Andreazzi, 2005), conforme Figura 2.

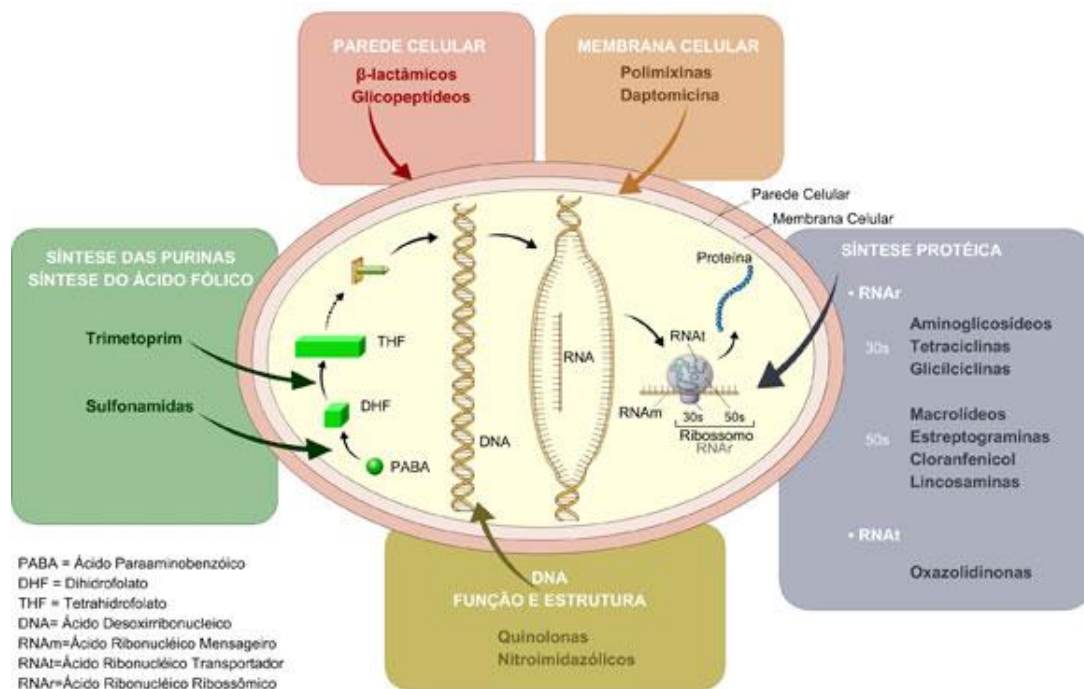


Figura 2 - Principais mecanismos de ação dos antimicrobianos na célula bacteriana. Fonte: ANVISA, 2007.

Os betalactâmicos têm efeito na parede celular, se ligam nas PBPs (proteínas ligadoras de penicilina) impedindo a formação da parede celular e causando a lise da célula bacteriana (Spratt, 1988). Os aminoglicosídeos impedem a síntese protéica através da ligação ao sítio A (aminoacil) do 16S rRNA na subunidade 30S do ribossomo interferindo no processo de translocação (Magnet e Blanchard, 2005). As quinolonas tem como alvo as topoisomerasas, levando ao bloqueio da replicação do DNA (Rossi & Andreazzi, 2005). As polimixinas causam ruptura na integridade da

membrana celular pela ligação no lipopolissacarídeo (LPS), deslocando competitivamente os íons cálcio e magnésio (Falagas e Kasiakou, 2005).

1.3.2 Mecanismos de resistência aos antimicrobianos

Os micro-organismos desenvolveram mecanismos de resistência aos antimicrobianos ao longo do tempo, estes mecanismos podem ser intrínsecos ou adquiridos. Os mecanismos intrínsecos são naturais de cada espécie e, podem até ser utilizados na identificação da espécie bacteriana. E os adquiridos podem ser por mutação ou transmissão de material genético externo (Rossi & Andreazzi, 2005).

As mutações são alterações na estrutura química ou estrutural do DNA cromossômico e podem ser espontâneas ou induzidas. As mutações espontâneas ocorrem devido a um erro durante o processo de replicação do DNA ou por interferência de agentes ambientais e as induzidas pela ação deliberada na qual o organismo é exposto à ação um agente genotóxico (Rossi & Andreazzi, 2005; Padilla & Costa, 2015).

A transmissão do material genético pode ocorrer por diferentes modos: conjugação, transdução, transformação. Na conjugação, o material genético é transferido de uma célula para outra havendo, necessariamente, contato entre as células bacterianas, esse contato é realizado através da formação do *pili* sexual. Já na transdução o material genético é transferido entre células mediado por um vírus (bacteriófago). Na transformação o DNA livre no meio é tomado pela célula e não existe contato entre a célula doadora e a receptora (Rossi & Andreazzi, 2005; Padilla & Costa, 2015).

Os principais mecanismos de resistência aos antimicrobianos que os micro-organismos desenvolveram são: alteração na permeabilidade da membrana, sistema de efluxo, alteração genética do alvo e ação enzimática, conforme demonstrado na Figura 3.

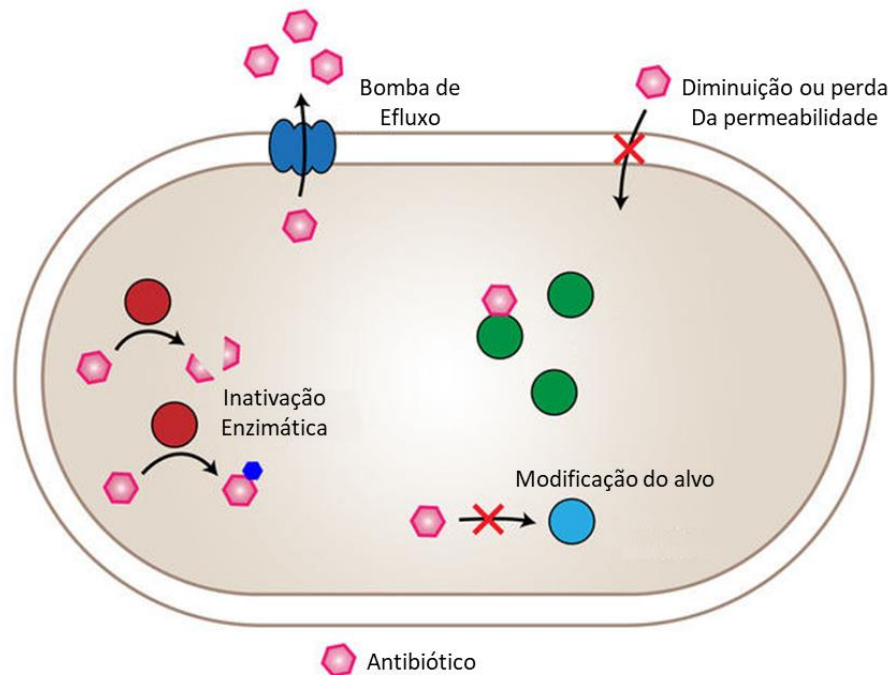


Figura 3 - Principais mecanismos de resistência aos antimicrobianos desenvolvidos pelos micro-organismos. Fonte: www.futurelearn.com/courses/bacterial-genomes-bioinformatics

1.3.2.1 Resistência aos betalactâmicos.

Os micro-organismos desenvolveram diversos mecanismos de resistência aos betalactâmicos: perda ou expressão reduzida de porinas (cromossomais), alterações nas PBPs (cromossomais), superexpressão de bombas de efluxo (cromossomais e/ou plasmidiais) e produção de betalactamases (cromossomais e/ou plasmidiais).

As porinas são responsáveis pela difusão de solutos hidrofílicos através da membrana externa e da saída de produtos não utilizados pela célula bacteriana (Nikaido, 1994), assim a diminuição ou perda da expressão dos genes que as codificam impede a entrada do antimicrobiano levando a uma diminuição da concentração interna da droga na célula bacteriana que pode conferir resistência aos betalactâmicos (Quinn et al., 1988).

Os sistemas de efluxo são responsáveis pela expulsão de substâncias que poderiam destruir a bactéria. Esse era considerado um mecanismo

intrínseco (Li et al., 1995; Piddock, 2006). No entanto já foi relatado esse mecanismo mediado por plasmídeo (Rincón et al., 2014).

A produção de betalactamases é o mecanismo de resistência mais comum para essa classe de antimicrobianos, principalmente em microorganismos Gram-negativos (Bush e Jacoby, 2010). Essas enzimas degradam o anel betalactâmico, inativando a ação do antimicrobiano sobre a parede celular. Os genes que determinam a produção das betalactamases podem estar localizados no cromossomo bacteriano ou em elementos móveis como os plasmídeos e transposons (Chroma e Kolar, 2010). Esses elementos móveis podem facilmente se disseminar para outras bactérias em um hospital, carregando com eles os genes de resistência à maioria das classes de antimicrobianos (Bush et al., 2011).

Primeiramente, as betalactamases foram classificadas de acordo com a sequência de aminoácidos, como proposto por Ambler, que as separava em 4 classes denominadas de A a D. Nas classes A, C, e D estão o grupo das enzimas que possuem um aminoácido serina no centro ativo da enzima e, na classe B, estão as enzimas que necessitam do zinco como cofator para atividade enzimática (Livermore, 1995).

Outra classificação proposta por Bush et al. (1995) separa as betalactamases em 4 grupos de acordo com o substrato da enzima e o perfil de inibição por inibidores de betalactamases. Revisada por Bush e Jacoby em 2010, a Tabela 2 mostra como foram divididas as betalactamases de acordo com as duas classificações.

Tabela 2 - Classificação das betalactamases segundo Bush e Jacob (2010) e Ambler (1980)

Classificação Bush, Jacoby, Medeiros (2010)		Classificação Ambler (1980)	Substrato	Características	Representantes
Grupo funcional	Subgrupo	Classe Molecular			
1		C	Cefalosporinas	Resistência a todos os beta-lactâmicos, exceto carbapenêmicos. Não são inibidas pelo ácido clavulânico	AmpC (ACT-1, FOX, MIR-1, CMY-2, etc)
2	2a	A	Penicilina	Penilases produzidas por <i>Staphylococcus</i> spp. e <i>Enterococcus</i> spp. Confere altos níveis de resistência a penicilina	PC1
	2b	A	Penicilinas e cefalosporinas de 1ª e 2ª geração	Betalactamases de espectro limitado de bactérias Gram-negativas	TEM-1, TEM-2, SHV-1
	2be	A	Cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos	Betalactamases de espectro ampliado	ESBL (TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB, etc)
	2br	A	Penicilina	Betalactamase resistentes aos inibidores de beta-lactamases	TEM-30, SHV-10
	2ber	A	Cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos	Betalactamase de espectro ampliado com relativa resistência a inibição por ácido clavulânico	TEM-50 (CMT-1)
	2c	A	Carbenicilina	Enzimas que hidrolizam a carbenicilina	PSE-1, CARB-3
	2ce	A	Carbenicilina e cefepime	Carbenicilase de amplo espectro com atividade contra cefepime e ceftiofame	RTG-4
	2d	D	Oxacilina	Enzimas que hidrolizam a oxacilina, possuem pouco efeito contra carbenicilina e são levemente inibidas pelo ácido clavulânico	OXA-1, OXA-10
	2de	D	Oxacilina e cefalosporinas de amplo espectro	Oxacilinases com espectro ampliado que hidrolizam oxamino-betalactâmicos mas não carbapenêmicos	OXA-11, OXA-15
	2df	D	Oxacilina e carbapenêmicos	Oxacilinases que hidrolizam carbapenêmicos	OXA-23, OXA-48
	2e	A	Cefalosporinas de espectro estendido	Cefalosporinases de espectro ampliado que possuem pouca afinidade com aztreonam	CepA
2f	A	Carbapenêmicos	Enzimas que hidrolizam carbapenêmicos	KPC, IMI-1, SME, GES-3, GES-4 GES-5	
3	3ª	B	Carbapenêmicos	Hidrólise de amplo espectro incluindo carbapenêmicos, cefalosporinas e penicilinas mas não monobactam	IMP, VIM, SPM, IND, NDM
	3b	B	Carbapenêmicos	Hidrolisa preferencialmente carbapenêmicos a cefalosporinas e penicilinas	L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1, CphA, Sfh-1
4	NI		Desconhecido	Desconhecido	

NI – Não inclui. Em destaque as principais betalactamases produzidas por BGN

1.3.2.1.1 CTX-M

A CTX-M é a ESBL mais encontrada na maior parte do mundo. Ela foi primeiramente reportada na segunda metade da década de 80 e sua taxa de disseminação entre bactérias tem crescido drasticamente causando surtos e infecções esporádicas (Bonnet, 2004; Carattoli, 2009). Foi relatada pela primeira vez em 1989, em um isolado clínico de *E. coli* e foi designada CTX-M-1 indicando sua ação hidrolítica preferencialmente contra cefotaxima (Bauernfeind, 1990), originada a partir de uma transferência horizontal de bactérias do gênero *Kluyvera* spp (Rossolini et al., 2008; Naseer e Sundsfjord, 2011).

Organismos produtores da enzima CTX-M são resistentes à cefotaxima e ceftriaxona, mas susceptível à ceftazidima. Porém, alguns membros da família da CTX-M demonstraram uma alta taxa de atividade hidrolítica para todas as cefalosporinas, devido mutações específicas (Bush, 2010).

As CTX-M podem ser subclassificadas a partir das similaridades na sequência de aminoácidos. Elas foram agrupadas em 5 grandes grupos: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 e CTX-M-25 (Bonnet, 2004) (Tabela 3).

Tabela 3 – Classificação das CTX-M em grupos (Bonnet et al, 2004).

Grupo CTX-M	Exemplos
Grupo 1	CTX-M-1, CTX-M-3, CTX-M-10, CTX-M-12, CTX-M-15, CTX-M-22, CTX-M-23, CTX-M-28 e FEC-1
Grupo 2	CTX-M-2, CTX-M-4, CTX-M-4L, CTXM-5, CTX-M-6, CTX-M-7, CTX-M-20, CTX-M-59 e Toho-1
Grupo 8	CTX-M-8
Grupo 9	CTX-M-9, CTX-M-13, CTX-M-14, CTX-M-16, CTX-M-17, CTX-M-19, CTX-M-21, CTX-M-27, CTX-M-24 e CTX-M-45
Grupo 25	CTX-M-25 e CTX-M-26

A CTX-M é predominante no Leste Europeu, Espanha e América do Sul, sendo a variante CTX-M-15 mais prevalente no mundo (Livermore, 2012). A variante CTX-M-2 é a mais descrita na América do Sul, com relatos na Argentina, Paraguai, Uruguai e Brasil (Poupart et al., 1991; Radice et al., 2002).

No Brasil, Tollentino et al. (2011) descreveram a primeira detecção do gene *bla*_{CTX-M-15} em cepas de *K. pneumoniae* isoladas de 2005 a 2007, no entanto já foram identificadas também as variantes CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-3, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-14, CTX-M-15, CTX-M-16, CTX-M-28, CTX-M-59, CTX-M-74, CTX-M-75 e CTX-M-131. A variante CTX-M-2 é a predominante no Brasil e também detectada em um maior número de espécies da Ordem Enterobacterales (Sampaio e Gales, 2016).

A associação de plasmídeos que carregam *bla*_{CTX-M} pertencendo aos grupos de incompatibilidade IncF, IncN e IncK torna a captura e mobilização desses genes eficiente entre os membros da Ordem Enterobacterales. O sucesso da disseminação das CTX-M-15 está relacionado ao contexto genético no qual ela se encontra. O gene *bla*_{CTX-M-15} é carregado, na sua maioria, pelo plasmídeo IncF e geralmente está associado a outros genes de resistência como *bla*_{TEM-1}, *bla*_{OXA-1} e *aac(6)-Ib-cr*. A causa da disseminação do gene *bla*_{CTX-M-15} pode ser devida à forte associação do plasmídeo IncF com *E. coli* ST131 que está globalmente disseminado (Carattoli, 2009; Livermore, 2012).

Diferentes elementos genéticos estão envolvidos na aquisição do *bla*_{CTX-M}, incluindo sequências de inserção *ISCR1* e *ISEcp1* e elementos relacionados a fagos (Poirel et al., 2008). A *ISEcp1*, está associada com as enzimas do grupo CTX-M-1, CTX-M-2 e CTX-M-9 e atuam como potentes promotoras para uma super-expressão do *bla*_{CTX-M} (Poirel et al., 2008; Mathers et al., 2015).

O ambiente genético do *bla*_{CTX-M-15} normalmente consiste em uma *ISEcp1* 48pb a montante do gene *bla*_{CTX-M-15} e a ORF477 a jusante, este arranjo pode ou não estar flanqueado por uma IS26 (Boyd et al., 2004; Cantón e Coque, 2006; Eckert et al., 2006). A Figura 4 mostra os diferentes

arranjos do contexto genético do *bla*_{CTX-M-15}, sendo que o tamanho da inserção da *ISEcp1* e a presença ou não da *IS26* é o que normalmente varia.

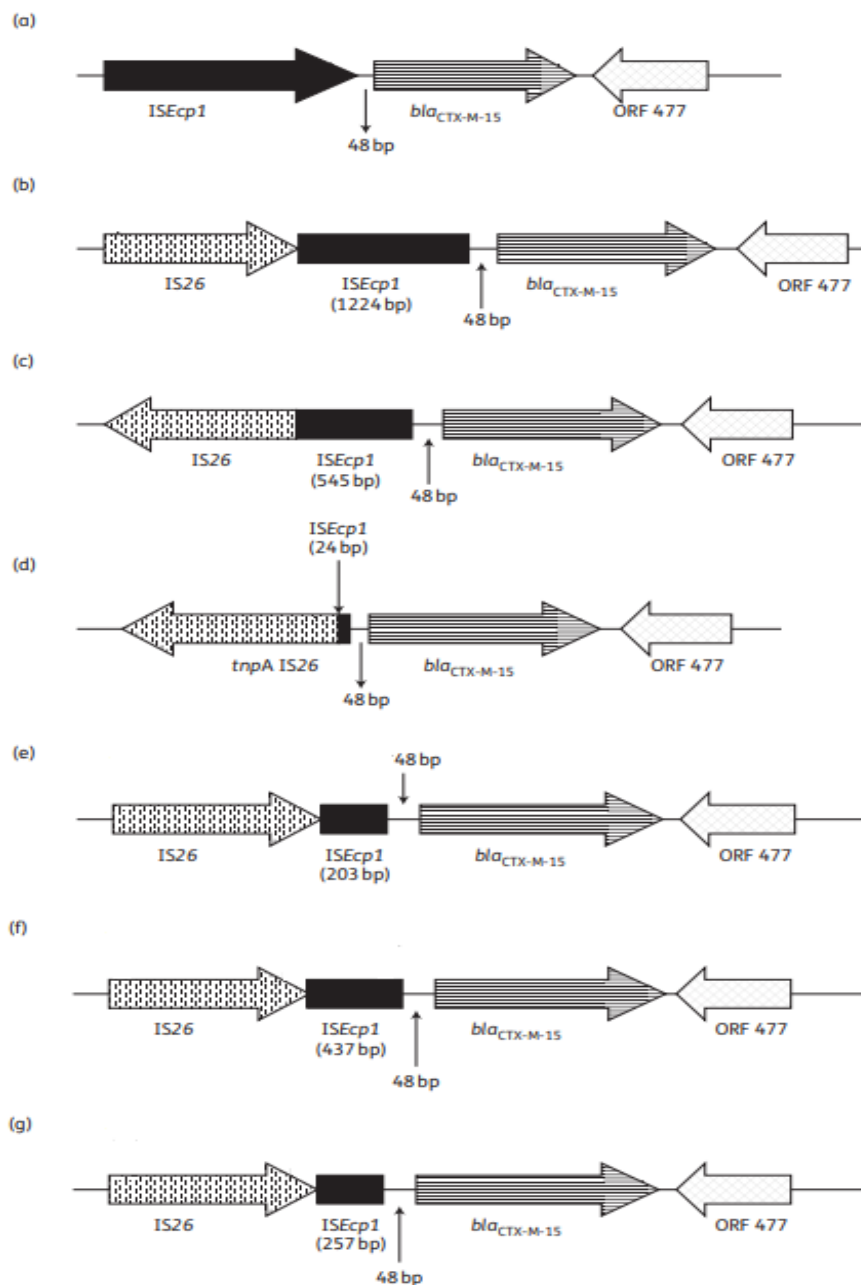


Figura 4 - Representação esquemática de 7 ambientes genéticos do *bla*_{CTX-M-15}. O esquema “a”, corresponde ao prevalente mundial, o esquema “b”, “c”, “e-g”, foram descritos no estudo de (Dhanji et al., 2011) e o esquema “d” foi descrito no estudo de (Woodford et al., 2009).

1.3.2.1.2 KPC

KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*) é uma enzima que confere resistência a todos os betalactâmicos incluindo os carbapenêmicos. É uma serino betalactamase, classificada no grupo 2f de Bush e na Classe A de Ambler (Queenan e Bush, 2007). Foi relatada pela primeira vez em isolados da Carolina do Norte obtidos em 1996 (Yigit et al., 2001). Embora esta enzima seja encontrada principalmente em *K. pneumoniae*, a KPC já foi identificada em várias outras bactérias Gram-negativas, tais como *Citrobacter freundii* (Deshpande et al., 2006; Rasheed et al., 2008), *Enterobacter* spp (Bratu et al., 2005; Deshpande et al., 2006), *Escherichia coli* (Navon-Venezia et al., 2006; Bratu et al., 2007), *Salmonella enterica* (Miriagou et al., 2003), *Serratia marcescens* (Deshpande et al., 2006) e outras Enterobacteriaceae, além de *Pseudomonas aeruginosa* (Villegas et al., 2007) e *Acinetobacter baumannii* (Robledo et al., 2010).

Surtos de *K. pneumoniae* associados a KPC foram primeiramente descritos em Nova York (Woodford et al., 2004; Bratu et al., 2005), contudo relatos indicam que estas bactérias produtoras de KPC estão disseminadas no mundo. A produção de KPC em Enterobacteriaceae foi identificada no Canadá (Pillai et al., 2009), Colômbia (Mojica et al., 2012), Argentina (Pasteran et al., 2008), Reino Unido (Woodford et al., 2008), Irlanda (Roche et al., 2009), Espanha (Curiao et al., 2010), Portugal em água de rio (Poirel et al., 2012), França (Naas et al., 2005), Itália (Giani et al., 2009), Polônia (Baraniak et al., 2009), Grécia (Cuzon et al., 2008), Noruega e Suécia (Tegmark Wisell et al., 2007; Samuelsen et al., 2009), Finlândia (Österblad et al., 2012), Israel (Kitchel et al., 2009; Navon-Venezia et al., 2009), Índia (Jones et al., 2009), China (Wei et al., 2007), Japão (Yamane, 2012), Austrália e Nova Zelândia (Munoz-Price et al., 2013).

No Brasil, a primeira publicação de *K. pneumoniae* produtora de KPC foi em 2009 em isolados de 2006 em Recife (Monteiro et al., 2009), no entanto, publicação posterior mostrou que a KPC já estava no Brasil em 2005, em isolados de São Paulo (Pavez et al., 2009). A produção de KPC já

foi detectada no Rio de Janeiro (Peirano et al., 2009), Mato Grosso do Sul (Chang et al., 2013), Paraíba (Fehlberg et al., 2012), Rio Grande do Sul, Distrito Federal (Nicoletti et al., 2012), Espírito Santo, Minas Gerais e Goiás (Seki et al., 2011). Baseado no resultado do SENTRY (Gales et al., 2012) e nos outros achados pelo país, *K. pneumoniae* produtora de KPC-2 é endêmica no Brasil, com descrição desses micro-organismos em surtos de infecção hospitalar (Abboud et al, 2011; Garcia DO, 2010; Naves et al, 2011; Pereira et al, 2011), em esgoto de hospital (Chagas et al., 2011) e água de rio urbano (Oliveira et al., 2014). A facilidade de mobilidade deste mecanismo de resistência é uma grande preocupação, pois facilita a sua disseminação por entre as cepas (Kitchel et al., 2009).

Já foram descritos 24 tipos de KPC (KPC-1 a KPC-24), sendo que após curadoria as variantes KPC-1, KPC-9, KPC-20 e KPC-23 foram removidas do banco, restando então, 20 tipos diferentes de KPC (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pathogen/betalactamases/Allele.tab>, acesso em 28/03/2018).

O gene que codifica a KPC é o *bla_{KPC}* e já foi relatado em diversos tipos de plasmídeos, como, IncF, IncI2, IncX, IncA/C, IncR (García-Fernández et al., 2012; Pitout et al., 2015; Navon-Venezia et al., 2017). Plasmídeos dos tipos IncR, IncN e IncX3 estão em um grande espectro de hospedeiros e são frequentemente associados com a transferência horizontal de *bla_{KPC}* por conjugação para outras Enterobacteriaceae (Navon-Venezia et al, 2017).

O *bla_{KPC}* está normalmente localizado num transposon Tn4401, de aproximadamente 10 kb, formado por uma transposase, resolvase, o *bla_{KPC}* e duas sequências de inserção IS*Kpn6* e IS*Kpn7*, como demonstrado na Figura 5 (Naas et al., 2008). Este transposon já se disseminou para diferentes plasmídeos conjugativos. O *bla_{KPC}* já foi descrito em outros contextos genéticos chamados de não-Tn4401 e geralmente tem sequências parciais da IS*Kpn6* (Shen et al., 2009).

Existem, até o momento, cinco isoformas do Tn4401, que se diferem por deleções (68-255 pb) a montante do gene *bla_{KPC}*. Isoforma (a), deleção

de 99 pb; (b) sem deleção; (c) deleção de 215 pb; (d) deleção de 68 pb; (e) deleção de 255 pb (Chen et al., 2014a) (Figura 5). A isoforma do Tn4401 está associada com diferentes plasmídeos. Tn4401a está relacionado com *bla*_{KPC-3} carregado por plasmídeos IncFIIk2 (Leavitt et al., 2010; García-Fernández et al., 2012; Chen et al., 2014b), enquanto que a isoforma Tn4401b está associada com IncN e a isoforma Tn4401d com IncFIA (Chen et al., 2013; Chen et al., 2014c; Chen et al., 2014a).

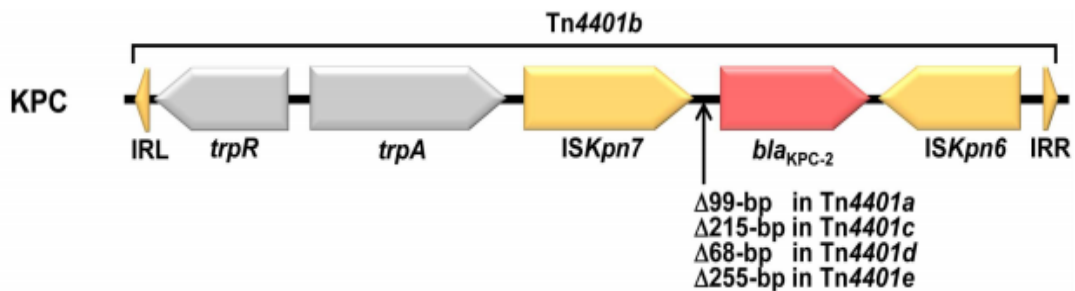


Figura 5 - Representação do Tn4401 e suas isoformas levando a diferentes contextos genéticos do *bla*_{KPC-2}. Os genes estão representados por flechas e as sequências de repetição invertida (IRL e IRR) estão representadas por triângulos nas pontas da sequência (Lee et al., 2016).

1.3.2.2 Resistência aos aminoglicosídeos

A resistência aos aminoglicosídeos pode ocorrer através de diversos mecanismos, tais como, modificação do sítio de ação do antimicrobiano, aumento do efluxo, diminuição da permeabilidade da membrana citoplasmática e modificação/inativação enzimática (Wachino e Arakawa, 2012).

Em Enterobacteriaceae o mecanismo mais comum é a modificação estrutural do aminoglicosídeo por três tipos de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (EMAs), estas enzimas promovem a ligação ao aminoglicosídeo de um grupo adenil (aminoglicosídeo nucleotidiltransferase ou adeniltransferase – ANT), fosforil (aminoglicosídeo fosfotransferase - APH) ou acetil (aminoglicosídeo acetiltransferase - AAC), que resulta na redução da afinidade do antimicrobiano à subunidade 30S do ribossomo

(Giedraitienė et al., 2011). Cada enzima leva a resistência a um tipo diferente de aminoglicosídeo, uma mesma enzima não confere resistência a todos os aminoglicosídeos. A Tabela 4 descreve o fenótipo de resistência de cada uma das enzimas modificadoras.

Tabela 4 - Fenótipos de resistência detectados de acordo com a produção das enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (Shaw et al., 1993).

		GM	SIS	TM	AK	DBK	NTL	NEO	SM
Fosfo-transferases (APHs)	APH(3')-Ia	S	S	S	S	S	S	R	S
	APH(3')-VIa	S	S	S	S	S	S	R	S
Acetil-transferases (AACs)	AAC(3)-Ia	R	R	S	S	S	S	S	S
	AAC(3)-IIa	R	R	R	S	R	R	S	S
	AAC(6')-Ib	S	R	R	R	R	R	S	S
Nucleotidil-transferases (ANTs)	ANT(2'')-Ia	R	R	R	S	R	S	S	S
	ANT(3'')-Ia	S	S	S	S	S	S	S	R

GM: gentamicina; SIS: sisomicina; TM: tobramicina; AK: amicacina; DBK: dibecacina NTL: netilmicina; NEO: neomicina; SM: estreptomina. R: Resistente; S: Sensível

Os genes responsáveis pela codificação dessas enzimas estão normalmente localizados em plasmídeos e integrons e, frequentemente são transferidos por transposons e outros elementos móveis junto com outros genes de resistência (Giedraitienė et al., 2011). Devido a esta mobilidade, um mesmo micro-organismo pode expressar mais de um tipo de enzima modificadora ao mesmo tempo, o que pode levar a resistência a todos os aminoglicosídeos, no entanto essa resistência é considerada de baixo nível.

Um outro tipo de enzima foi detectado em bactérias Gram-negativas, as metiltransferases 16S rRNA, que promovem a ligação de um grupo metil no 16S rRNA na subunidade 30S do ribossomo e diferentemente das enzimas modificadoras, confere resistência em alto nível à maioria dos aminoglicosídeos de importância clínica, como gentamicina, tobramicina e amicacina (Zhou et al., 2010; Garneau-Tsodikova e Labby, 2016). Até o momento, já foram descritos dez tipos de metiltransferases 16S rRNA: ArmA, NmpA, RmtA, RmtB, RmtC, RmtD, RmtE, RmtF, RmtG e RmtH (Galimand et al., 2003; Yokoyama et al., 2003; Doi et al., 2004; Wachino et al., 2006; Doi et al., 2007; Wachino et al., 2007; Davis et al., 2010; Galimand et al., 2012; Bueno et al., 2013; O'Hara et al., 2013). Resistência aos

aminoglicosídeos é frequentemente acompanhada com co-resistência a betalactâmicos e fluorquinolonas, devido à presença de outros genes de resistência ou, no caso da EMA *aac(6')-Ib-cr* que sozinha confere resistência aos aminoglicosídeos tobramicina, amicacina e kanamicina e às fluorquinolonas ciprofloxacina e norfloxacina (Schultsz e Geerlings, 2012).

1.3.2.3 Resistência às quinolonas

Os mecanismos de resistência às quinolonas incluem: alteração de permeabilidade, hiperexpressão de bombas de efluxo, alterações do sítio de ação (topoisomerasas), resistência mediada por plasmídeos e alteração enzimática da molécula do antimicrobiano (ANVISA, 2007).

Um dos principais mecanismos de resistência às quinolonas são alterações no sítio de ligação do antimicrobiano com a DNA-girase, devido a mutações em uma região específica do gene *gyrA*, entre os aminoácidos 67 e 106, denominada Região Determinante de Resistência à Quinolona (QRDR). Podem ocorrer também mutações no gene *gyrB* e nos genes *parC* e *parE*, subunidades das topoisomerasas IV (Giraud et al., 2006).

Mudanças na permeabilidade celular incluem perda da porina OmpK36 e superexpressão da bomba de efluxo AcrAB (Martínez-Martínez et al., 1998; Mazzariol et al., 2002). Outra importante bomba de efluxo envolvida na resistência as quinolonas é a OqxAB, originalmente descrita no cromossomo, mas que já foi relacionada com resistência mediada por plasmídeo (Wong et al., 2015).

Outro grupo de genes que conferem resistência às quinolonas, são os genes *qnr*, que codificam uma família de proteínas que protegem fisicamente a DNA girase e as topoisomerasas IV da ação das quinolonas, são genes mais comumente carregados em plasmídeos, mas também são localizados no cromossomo de algumas espécies como *Citrobacter* spp, *S. maltophilia* e *S. marcescens* (Navon-Venezia et al, 2017).

1.3.2.4 Resistência às polimixinas

O mecanismo de resistência às polimixinas mais comum é a modificação do sítio de ligação do antimicrobiano, acionado por um mecanismo cromossômico chamado de sistema de modificação do LPS. Este sistema é ativado devido a mutação em diversos genes como *lpxM* e *ramA*, responsável pela maturação do lipídeo A (Clements et al., 2007), *pbpP*, *pmrE*, *pmrC*, *pagP*, responsáveis pela neutralização do lipídeo A (Mitrophanov et al., 2008; Llobet et al., 2011) e *phoPQ*, *pmrA* e *pmdD*, envolvidos na modificação do LPS (Navon-Venezia et al., 2017). Mutações em outros dois genes cromossômicos regulatórios levando a superexpressão do gene *pmrB* e desativação do gene *mrgB*, também levam a resistência às polimixinas (Jayol et al., 2014; Poirel et al., 2015).

Recentemente, foi relatado na China um mecanismo de resistência a polimixinas mediado por plasmídeos, o gene *mcr-1* codifica uma enzima que modifica o lipídeo A, levando a uma resistência em baixo nível às polimixinas (Liu et al., 2016).

1.4 Elementos móveis

A transferência de material genético através da transmissão horizontal é o mecanismo mais eficiente na disseminação dos genes de resistência. Esta transmissão só é possível devido aos elementos genéticos móveis como plasmídeos, transposons (Toleman e Walsh, 2011).

Os elementos móveis podem ser divididos em dois grupos: i) os que se mobilizam de uma célula para outra, como plasmídeos e bacteriófagos e ii) os que podem se mobilizar dentro de uma mesma célula, podendo se transferir de um sítio a outro do DNA, assim como de uma molécula de DNA para outra, por exemplo, de um plasmídeo a outro ou de um plasmídeo para o cromossomo, fazendo parte deste grupo os transposons, sequências de inserção (IS), integrons e cassetes genéticos (Bennett, 2008; Siguier et al., 2014).

1.4.1 Plasmídeos

Plasmídeos são elementos extracromossômicos com a capacidade de replicação autônoma, constituídos por uma molécula de DNA fita dupla circular. Possuem uma origem de replicação análoga à *oriC* cromossômica e devido a essa capacidade de replicação são também considerados replicons. Seu tamanho pode variar de 10 até mais de 200 kb e também podem ser multicópias ou cópia única (Zaha et al, 1996).

Por definição, os plasmídeos não possuem genes essenciais para o crescimento de células hospedeiras sob condições de não stress, mas possuem sistemas que garantem sua replicação autônoma controlando também o número de cópias e garantindo a estabilidade durante a divisão celular. A maioria dos plasmídeos confere fenótipos positivamente selecionáveis pela presença de genes de resistência antimicrobiana. Os plasmídeos evoluem como parte integrante do genoma bacteriano, fornecendo genes de resistência que podem ser facilmente trocados entre bactérias de diferentes origens e fontes por conjugação (Carattoli, 2011).

Os plasmídeos podem ser colocados em 2 grandes grupos, os plasmídeos conjugativos e não-conjugativos. Os plasmídeos conjugativos têm a capacidade de se transferir de uma célula bacteriana para outra, devido a presença de genes adicionais chamados genes de transferência ou genes *tra*. Os plasmídeos conjugativos podem, também, facilitar a transferência de outras moléculas de DNA, podendo ser outros plasmídeos (não conjugativos) co-residente na mesma célula (Zaha et al, 1996).

Os genes *tra* estão organizados em três operons: *traM*, *traJ* e *traYZ*, que juntos ocupam 33 kb do plasmídeo. Os genes *traA-G* são necessários para realização do contato célula-célula e os genes *traMYDIZ* realizam a transferência do DNA. A regulação da transcrição desses operons é a função dos produtos dos genes *finO*, *finP* e *traJ* (Zaha et al, 1996).

Outra classificação foi proposta por Datta e Hedges (1971) e se baseia na estabilidade dos plasmídeos durante a conjugação, um fenômeno chamado incompatibilidade de plasmídeo (Inc). Plasmídeos com o mesmo

controle de replicação são “incompatíveis”, enquanto que plasmídeos com diferente controle e replicação são “compatíveis”. Dessa forma, dois plasmídeos pertencentes ao mesmo grupo Inc não podem ser propagados de forma estável na mesma célula (Datta e Hughes, 1983; Couturier et al., 1988).

Carattoli et al. (2005), desenvolveram um método de tipagem baseado em PCR que classificava os plasmídeos em 18 grupos de incompatibilidade ou “Inc types”: FIA, FIB, FIC, HI1, HI2, I1, L/M, N, P, W, T, A/C, K, B/O, X, Y, F e FIIA, que representava a maioria dos “Inc types” circulando entre as Enterobacteriaceae.

Mais recentemente, devido às novas tecnologias como sequenciamento do genoma completo e sequenciamento de plasmídeos, novos replicons foram identificados e Carattoli e colaboradores (2014), criaram uma nova ferramenta para detecção *in silico* dos grupos de incompatibilidade a partir de dados de sequenciamento, chamada PlasmidFinder, e também a tipagem *in silico* de plasmídeo pela técnica de pMLST (Multi Locus Sequence Type) para os grupos de incompatibilidade F, HI1, HI2, I1 e N.

A capacidade de reconhecer e categorizar plasmídeos em grupos com base em sua relação filogenética pode ser útil para analisar sua distribuição na natureza, o relacionamento com a célula hospedeira e descobrir sua origem evolutiva (Denap e Hergenrother, 2005).

Carattoli (2009), associou o grupo de incompatibilidade com genes de resistência a antimicrobianos em plasmídeos de Enterobacteriaceae, a Tabela 5 mostra essa associação.

Tabela 5 - Principais grupos de incompatibilidade associados a genes de resistência em Enterobacteriaceae resistentes a antimicrobianos, isolados em todo o mundo de humanos e animais (Navon-Venezia et al, 2017).

Replicon	Nº de plasmídeos	Genes de resistência	Espécies
F	331	<i>aac(6')Ib-cr</i> , <i>bla</i> _{CMY-2} , <i>bla</i> _{CTX-M-1-2-3-9-14-15-24-27} , <i>bla</i> _{DHA-1} , <i>bla</i> _{SHV-2-5-12} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>armA</i> , <i>mtb</i> , <i>qepA</i> , <i>qepA2</i> , <i>qnrA1</i> , <i>qnrB2</i> , <i>qnrB4</i> , <i>qnrB6</i> , <i>qnrB19</i> , <i>qnrS1</i>	<i>E. aerogenes</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. enterica</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>S. sonnei</i>
A/C	317	<i>bla</i> _{CMY-2-4} , <i>bla</i> _{CTX-M-2-3-14-15-56} , <i>bla</i> _{SHV-2-5-12} , <i>bla</i> _{TEM-3-21-24} , <i>bla</i> _{IMP-4-8-13} , <i>bla</i> _{VIM-4} , <i>bla</i> _{VEB-1} , <i>armA</i> , <i>mtb</i> , <i>qnrA1</i>	<i>C. freundii</i> , <i>C. koseri</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>P. stuartii</i> , <i>S. enterica</i> , <i>S. marcescens</i>
L/M	270	<i>aac(6')Ib-cr</i> , <i>bla</i> _{CTX-M-1-15-42} , <i>bla</i> _{SHV-5} , <i>bla</i> _{TEM-3-10} , <i>bla</i> _{IMP-4-8} , <i>armA</i> , <i>qnrA1</i> , <i>qnrB1</i> , <i>qnrB2</i> , <i>qnrB4</i> , <i>qnrS1</i>	<i>C. amalonaticus</i> , <i>C. freundii</i> , <i>E. aerogenes</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>M. morgani</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>S. enterica</i> , <i>S. flexneri</i> , <i>S. marcescens</i>
I2	146	<i>aac(6')Ib-cr</i> , <i>bla</i> _{CMY-2} , <i>bla</i> _{CTX-M-1-2-3-9-14-15-24-27} , <i>bla</i> _{DHA-1} , <i>bla</i> _{SHV-2-5-12} , <i>e bla</i> _{TEM-1} , <i>armA</i> , <i>mtb</i> , <i>qepA</i> , <i>qepA2</i> , <i>qnrA1</i> , <i>qnrB2</i> , <i>qnrB4</i> , <i>qnrB6</i> , <i>qnrB19</i> , <i>qnrS1</i>	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. enterica</i> , <i>S. sonnei</i>
HI2	90	<i>bla</i> _{CMY-2-7-21} , <i>bla</i> _{CTX-M-1-2-3-9-14-15-24} , <i>bla</i> _{SHV-12} , <i>bla</i> _{TEM-1-3-52} , <i>bla</i> _{VIM-1} , <i>armA</i> , <i>mtb</i> , <i>mph</i> , <i>qnrA1</i>	<i>C. youngae</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. enterica</i>
N	70	<i>bla</i> _{CTX-M-1-3-15-32-40} , <i>bla</i> _{KPC-2} , <i>bla</i> _{VIM-1} , <i>armA</i> , <i>qnrA3</i> , <i>qnrB2</i> , <i>qnrB19</i> , <i>qnrS1</i>	<i>E. coli</i> , <i>K. ascorbata</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>S. enterica</i>

1.4.1.1 Plasmídeos envolvidos na resistência aos antimicrobianos em *K. pneumoniae*

A resistência aos antimicrobianos em *K. pneumoniae* tem sido atribuída, em sua maioria, à aquisição de plasmídeos conjugativos (Navon-Venezia et al, 2017). Os estudos iniciais de tipagem bacteriana de *K. pneumoniae* ST258, não eram capazes de definir os grupos de incompatibilidade dos plasmídeos, devido as limitações do método baseado na técnica de PCR (Carattoli et al., 2005). No entanto, com o advento das novas técnicas de sequenciamento do genoma completo, foi possível obter a sequência completa dos plasmídeos de *K. pneumoniae*, e estas análises demonstraram uma nova série de plasmídeos, carreando novos tipos de “replicons” ainda não descritos. Estes novos tipos de plasmídeos estão relacionados com a família IncF. (Navon-Venezia et al, 2017).

Plasmídeos do grupo IncF já foram descritos em diversas espécies de Enterobacteriaceae, possuem um tamanho de 60-200 kb, baixo número de cópias, carregam replicons relacionados com FII e estão frequentemente

associados com genes de virulência (Navon-Venezia et al, 2017). Replicons FII caracterizam uma família grande e heterogênea de plasmídeos, a família IncFII, que pode ser subcategorizada, baseada em PCR e sequenciamento, em grupos específicos: FII (*Escherichia coli*), FIIs (*Salmonella*), Fiii (*Yersinia*) e FIik (*Klebsiella*) (Villa et al., 2010).

Navon-Venezia e colaboradores (2017), analisaram 306 sequências de plasmídeos de *K. pneumoniae* disponíveis no NCBI (National Center for Biotechnology Information) e o tipo de replicon mais frequente foi o FIik (53%), sendo o replicon FIB o mais associado a este. Dois tipos de replicons FIB foram observados com maior frequência nos plasmídeos de *K. pneumoniae*, chamados FIB_{pKPQIL} e FIB_{pKPN}, estes dois plasmídeos são comumente encontrados nos genomas do complexo clonal 258 (CG258).

Estes plasmídeos não estão restritos ao ambiente hospitalar, recentemente foi relatado um plasmídeo derivado do pKPN3, isolado de uma estação de tratamento de esgoto municipal em Israel, carreando o gene de resistência a quinolona *qnrB* (Kaplan et al., 2015). No Brasil, (Dropa et al., 2016), isolaram plasmídeo carreador de *bla*_{CTX-M-15} IncFIB de uma estação de tratamento de água em São Paulo. Estes dados sugerem que o meio ambiente pode ser um possível reservatório de genes de resistência aos antimicrobianos com impacto clínico significativo.

1.4.2 Sequências de inserção e Transposons

Sequências de inserção (IS) bacterianas são o tipo mais simples de elemento móvel, são consideradas pequenas (<2500 pb) com uma organização genética simples e capazes de se inserir em múltiplos sítios alvo. As IS possuem uma Open read frame (ORF) que codifica apenas proteínas envolvidas na sua mobilidade, as transposases, e geralmente são delimitadas por duas repetições invertidas (IR) (Mahillon e Chandler, 1998).

O processo de transposição é basicamente um processo de “copia/cola” ou “recorta/cola”, dependendo da IS envolvida. Quando uma IS se transpõe, o sítio alvo de inserção no hospedeiro se duplica gerando uma sequência de

repetição direta (DR) com um tamanho característico de geralmente 2-14 pb. Sequências de inserção podem se integrar em uma variedade de sítios do genoma do hospedeiro, podendo ser encontradas em cromossomo ou plasmídeo e podem variar seu número de cópias. Duas cópias de uma mesma IS ou de duas IS relacionadas podem se inserir em cada lado de um gene e capturá-lo como parte de um transposon podendo, então, mover-se como uma unidade. As ISs podem, ainda, fornecer promotores que levam a expressão dos genes capturados (Mahillon e Chandler, 1998).

Transposons são um conjunto de segmentos lineares de DNA capazes de mudar de posição dentro do genoma, por exemplo, de um plasmídeo para outro ou de um plasmídeo para o cromossomo. Esse processo de transposição é considerado uma das principais causas de rearranjo do DNA bacteriano (Zaha et al, 1996).

Possuem características comuns na sua estrutura como: repetições terminais, que são sequências de nucleotídeos similares na sua extremidade, carregam genes que codificam enzimas capazes de transportá-los, criam, ao se inserir no DNA, pequenas duplicações no sítio alvo da inserção, chamadas repetições diretas e existem em cópias múltiplas no genoma. A Figura 6, demonstra a estrutura básica de um transposon, seu processo de transposição de forma simplificada e os tipos de repetições.

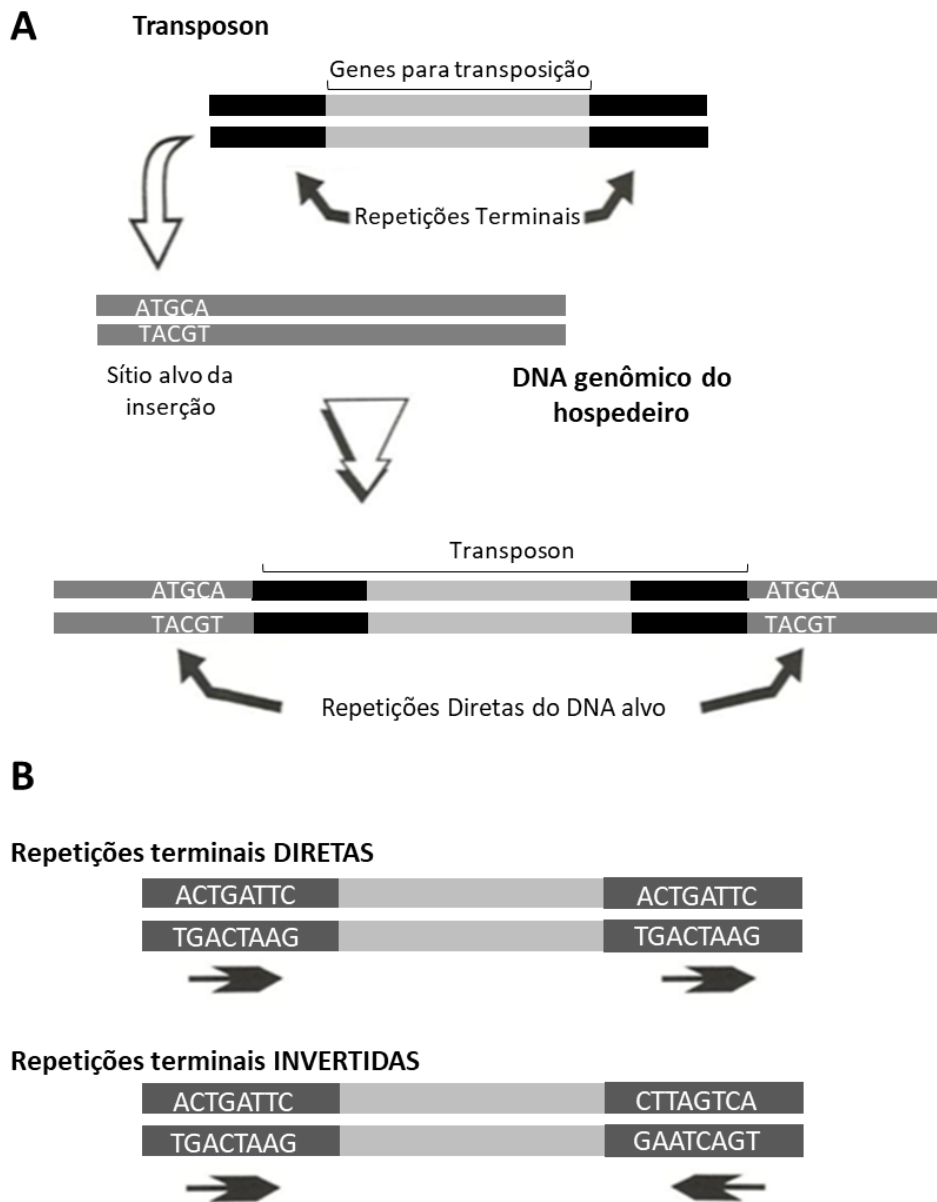


Figura 6 - Estrutura esquemática de um transposon e o processo de transposição de forma simplificada (A) e os tipos de repetições terminais (B) (Zaha et al, 1996).

A diferença entre um transposon e uma IS está na quantidade de informação contida na estrutura. As IS possuem apenas a informação estritamente necessária para promover sua própria transposição e não possuem nenhuma informação genética adicional, enquanto que o transposon constitui uma classe mais complexa, contendo além das informações para sua mobilização, material genético adicional não

relacionado à transposição, como por exemplo, genes de resistência aos antimicrobianos (Zaha et al, 1996).

Muitos transposons são flanqueados por IS e a presença ou não dessas IS classificam os transposons em Classe I ou compostos e Classe II ou complexos. Os de classe I podem ser esquematizados com uma “região central” que contém os genes codificantes não relacionados com a transposição, e dois “módulos” que flanqueiam essa região central, esses módulos são IS. Essas IS codificam as atividades de transposição e servem como sítio de ligação para a transposase e podem se encontrar na mesma orientação (repetições terminais diretas) ou invertidas (repetições invertidas). As IS que flanqueiam transposon podem ser idênticas ou divergirem, e um único módulo pode ser capaz de transpor toda a estrutura, dessa forma não é estritamente necessário que os dois “módulos” sejam funcionais. Os transposons de classe II não possuem os módulos IS, mas possuem em sua região central genes para sua própria transposição e também para resistência aos antimicrobianos e são flanqueados por sequências invertidas repetidas (IR). Possuem, além do gene que codifica a transposase, um gene que codifica uma resolvase, cuja função é “resolver” a estrutura de cointegrado que se forma durante a replicação desses transposons. Os transposons de classe II são mais frequentemente encontrados em plasmídeos (Padilla & Costa, 2015; Zaha et al, 1996). A Figura 7 representa os tipos de transposons.

Existem também transposons que são capazes de se transferir de uma célula para outra sem a ajuda de plasmídeos, em um processo que exige contato célula-célula. Esse tipo de transposon é chamado transposon conjugativo, ele é importante na disseminação da resistência múltipla em *Streptococcus* e, possivelmente em outras bactérias Gram-positivas (Padilla & Costa, 2015).

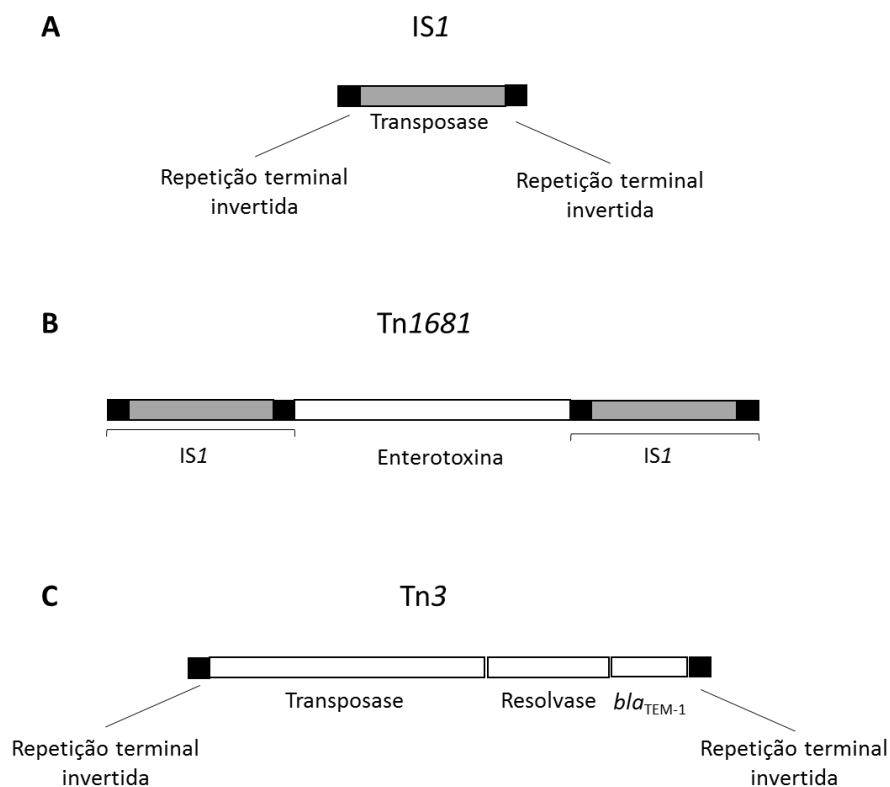


Figura 7 - Representação esquemática de uma IS (A), um transposon de classe I ou composto (B) e um transposon complexo ou classe II (C) (Zaha et al, 1996).

1.4.3 Cassetes genéticos e Integrons

Cassetes genéticos consistem em 2 componentes funcionais, um gene e um sítio de recombinação chamado elemento base-59 (59-be) ou *attC*. Esses elementos podem existir de duas formas: uma molécula circular livre sem a capacidade de se replicar ou em um integron através do sítio *attC* (Recchia e Hall, 1997; Partridge et al., 2009).

São eficientes em acumular genes de resistência aos antimicrobianos, diversas combinações de cassetes gênicos já foram descritas, assim como múltiplas cópias em um mesmo integron. Diferentes genes tiveram sucesso em sua disseminação utilizando esta rota (Recchia e Hall, 1997).

Integrons são pequenos sistemas genéticos modulares móveis envolvidos na aquisição e disseminação de genes de resistência aos

antimicrobianos entre bactérias Gram-negativas, principalmente em Enterobacteriaceae (Padilla & Costa, 2015). São capazes de capturar e mobilizar genes contidos em cassetes genéticos. São constituídos por dois segmentos de DNA conservados, que flanqueiam uma região central na qual os cassetes genéticos serão inseridos. O segmento 5' codifica uma recombinase sítio-específica (integrase) *intl*, um sítio adjacente *attI*, que é reconhecido pela integrase para a integração dos cassetes de resistência e promotores que asseguram a expressão do cassete. A integrase é responsável pela inserção dos genes de resistência aos antimicrobianos que se localizam a jusante do promotor. O segmento 3' carrega o gene *sul*, que confere resistência a sulfanilamida, e duas ORFs com funções ainda desconhecidas (Padilla & Costa, 2015).

Os integrons podem ser divididos em dois grupos: os integrons de resistência (RI) e os superintegrons (SI). Os integrons de resistência transportam principalmente cassetes de genes que codificam a resistência contra antimicrobianos e desinfetantes, e podem estar localizados no cromossomo ou em plasmídeos. Já os superintegrons estão localizados no cromossomo e contêm cassetes com uma variedade de funções (Fluit e Schmitz, 2004).

As classes 1, 2 e 3 de integrons possuem o segmento 5' conservado, com os genes *intl* e *att*. No entanto, o segmento 3' pode variar. O integron de classe 1, contém 3 ORFs: *qacΔ1* (resistência a compostos de amônio quaternário), *sul1* (resistência à sulfonamidas) e a ORF5 com função desconhecida. Já o integron de classe 2, possui genes *tns*, responsáveis pela mobilidade e o segmento 3' dos integrons de classe 3 ainda não foram caracterizados (Rådström et al., 1994). A Figura 8 mostra as estruturas de integrons de classe 1 e 2.

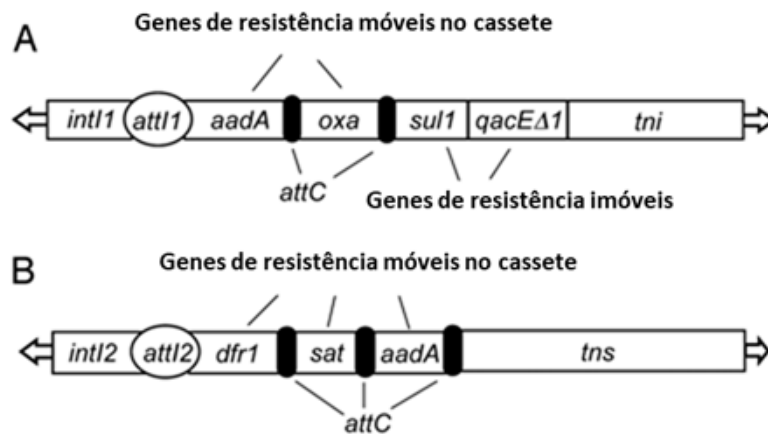


Figura 8 - Exemplos de estruturas de integron classe 1 (A) e integrons classe 2 (B) (Nandi et al., 2004).

Foram identificadas cinco classes diferentes de integrons, baseadas na sequência da integrase codificada (40% –58% de identidade). As classes 1,2 e 3 já estão claramente descritas na literatura, enquanto as classes 4 e 5 não estão claramente descritas e estão relacionadas à resistência ao trimetoprim em espécies de *Vibrio* (Mazel, 2006).

Os integrons de classe 1 são os mais disseminados e clinicamente importantes, são detectados em 22% a 59% dos isolados clínicos Gram-negativos e também já foram, ocasionalmente, identificados em bactérias gram-positivas (Mazel, 2006). Devido a sua importância, constituem o principal modelo experimental de integron.

1.5 Sistemas de efluxo e perda de porina

1.5.1 Sistemas de efluxo

Em Enterobacteriaceae, a permeabilidade da membrana é um processo chave quando relacionado ao nível de susceptibilidade aos antimicrobianos, pois é o primeiro contato do antimicrobiano com a célula bacteriana. Modificações do envelope bacteriano diminuindo a produção de porina ou aumentando a expressão de sistemas de bomba de efluxo são os

mecanismos frequentemente associados a resistência aos antimicrobianos, além de atuarem em conjunto com outros mecanismos de resistência, o que favorece o surgimento de fenótipos MDR (Davin-Regli et al., 2008).

Algumas espécies bacterianas são naturalmente resistentes a classes inteiras de antimicrobianos devido a este tipo de mecanismo, que limita a difusão do antimicrobiano ou que diminuem concentração intracelular de antimicrobianos específicos, como, por exemplo, espécies de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *K. aerogenes* resistentes a macrolídeos (Davin-Regli et al., 2008).

A permeabilidade da membrana pode ser modificada por uma diminuição ou perda de porinas. Essas duas respostas limitam o acesso aos antimicrobianos para o alvo a níveis abaixo da dose efetiva requerida. Alternativamente ou conjuntamente, a expressão de bombas de efluxo expulsa o agente antimicrobiano da célula antes dele poder atingir o seu sítio alvo e reduz muito a eficiência do mesmo (Davin-Regli et al., 2008).

Um dos principais sistemas de efluxo envolvido no fenótipo MDR é o sistema de efluxo de múltiplas drogas AcrAB que é codificado pelo operon *acrRAB*. Neste operon, o gene *acrR* codifica o repressor de *acrAB*, enquanto *acrA* e *acrB* codificam uma lipoproteína periplasmática, ancorada a membrana interna, que liga as membranas externas e internas e uma proteína de membrana integral com 12 hélices transversais da membrana, localizadas na membrana citoplasmática, respectivamente. O *acrB* se conecta com o TolC, uma proteína da membrana externa. A bomba de efluxo AcrAB-TolC é capaz de transportar uma gama diversificada de compostos com similaridade química e, conseqüentemente, confere resistência a um amplo espectro de antimicrobianos (Padilla et al., 2010).

Outros genes, pertencentes a família de reguladores AraC também têm como função induzir o funcionamento da bomba AcrAB-TolC, tais como, *marA*, *sox*, *sdi*, *fis* e *rob*, *rarA* sendo o *marA* o principal deles.

O locus *mar* (múltipla resistência a antimicrobianos) é um operon contínuo com duas unidades *marC* e *marRAB* separadas pelo *marO*. O gene *marR* codifica um repressor que age impedindo a expressão da cascata sob

condições não estressantes. O *marA* codifica um ativador de transcrição que atua na origem da cascata genética desencadeando inúmeros mecanismos de MDR pela simultânea redução do influxo (permeabilidade) e aumento do efluxo e *marB* codifica uma pequena proteína da membrana interna com função desconhecida (Davin-Regli et al., 2008).

SoxS é o efetor da resposta global dos genes *soxRS*. SoxS exibe cerca de 50% de homologia com *marA* e o fenótipo induzido por *soxS* é semelhante ao induzido por *marA* (Davin-Regli et al., 2008).

Rob regula os genes envolvidos na resistência a antimicrobianos, solventes e metais pesados. Excesso na expressão de *rob* em *E. coli* produz tanto maior tolerância a solventes orgânicos como baixa resistência a múltiplos agentes antimicrobianos, devido ao aumento da expressão de AcrAB. Em contraste, com *marA* e *soxS*, *rob* é constitutivamente expresso, e apenas sua supressão confere um fenótipo MDR. Foi recentemente mostrado que *marA* e *soxS* suprimem a transcrição de *rob* in vivo e in vitro (Michán et al., 2002; Schneiders e Levy, 2006; Davin-Regli et al., 2008).

Outra bomba chamada AcrEF também tem um amplo intervalo de substrato, semelhante ao AcrAB, no entanto, em contraste com *acrAB*, o nível de expressão de *acrEF* é muito baixo devido a repressão por uma proteína semelhante à histona, H-NS. O gene *acrS* (anteriormente *envR*) está localizado a montante de *acrE* e codifica um repressor desta bomba (Hirakawa et al., 2008).

RarA (regulador da resistência a antimicrobianos A) é uma proteína codificada pelo gene *rarA* e sua superexpressão resulta em um fenótipo de resistência a múltiplos antimicrobianos que requer uma bomba de efluxo AcrAB funcional, mas é independente dos outros reguladores de AraC e estudos sugerem que a superexpressão de *rarA* aumenta a bomba de efluxo de *oqxAB* (Veleba et al., 2012).

A bomba de efluxo OqxAB, um determinante da resistência à quinolona mediada por plasmídeo ("plasmid-mediated quinolone resistance" - PMQR), tem se tornado cada vez mais prevalente entre os membros das Enterobacteriaceae na última década (Wong et al., 2015). No momento da

sua descoberta, os genes que codificam esta bomba estavam localizados em um plasmídeo conjugativo designado pOLA52 e contribui para a resistência fenotípica ao ácido nalidíxico e cloranfenicol e suscetibilidade reduzida à ciprofloxacina em *E. coli* (Hansen et al., 2007). Um conjunto de genes correspondentes que compartilhou 99% de homologia de nucleotídeos com o operon *oqxAB* em pOLA52, incluindo um gene *oqxR* que era geneticamente idêntico ao elemento orf68 transmitido pelo plasmídeo foi, posteriormente, detectado no genoma de *K. pneumoniae*, que não exibiu fenotipicamente resistência a ácido nalidíxico ou cloranfenicol (Yuan et al., 2012). Mais recentemente, Bialek-Davenet et al. (2015), mostraram que mutações no gene *oqxR* induziram a superexpressão de *oqxAB* e *rara*. Estes achados inferem que um gene *oqxR* mutado é necessário para induzir superexpressão de *OqxAB* e conferir resistência cruzada a quinolona e cloranfenicol em *K. pneumoniae*.

1.5.2 Perda de porina

O envelope celular de bactérias Gram-negativas consiste em três camadas: a membrana externa, o peptidoglicano e a membrana interna. Porinas estão na membrana externa e agem como canais de proteína cheios de água que permite o transporte de pequenas moléculas hidrofílicas como, ferro, nutrientes, e antimicrobianos, incluindo betalactâmicos, do exterior para o interior da célula. Porinas também servem como receptores para fagos e bacteriocinas e, em conjunto com peptidoglicano e lipopolissacarídeo (LPS), têm um papel estrutural significativo mantendo a integridade das células (Tsai et al., 2011).

Em *K. pneumoniae* existem duas principais porinas, OmpK35 e OmpK36, que são homólogas às porinas descritas em *E. coli* OmpF e OmpC, respectivamente. Clinicamente, a maioria das cepas de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL expressam apenas OmpK36, enquanto a maioria dos isolados de *K. pneumoniae* que não produzem ESBLs sintetizam as duas porinas, OmpK35 e OmpK36 (Hernández-Allés et al., 1999).

A ausência de OmpK35 pode ser um dos fatores que contribui para a resistência aos antimicrobianos em *K. pneumoniae* produtoras de ESBL e esta hipótese foi apoiada por Palasubramaniam et al. (2009). Estudos também revelaram que a associação de ESBL ou beta-lactamase AmpC com perda de porina pode levar a resistência ou susceptibilidade reduzida a carbapenêmicos em *K. pneumoniae* (Mena et al., 2006; Wang et al., 2009; Skurnik et al., 2010).

1.6 Resistência a metais, metais pesados e amônios quaternários

Metais são definidos por elementos químicos capazes de conduzir a eletricidade e o calor, que apresentam um brilho característico e que, à exceção do mercúrio, são sólidos à temperatura ambiente. Podem estar em sua forma pura ou em ligas. A maioria dos organismos vivos só precisa de alguns poucos metais e em doses muito pequenas, por isso são chamados de micronutrientes. Estes metais tornam-se tóxicos e perigosos quando ultrapassam determinadas concentrações-limite. Os metais pesados são um grupo de metais com densidade maior que 5 g/cm³. Eles persistem na natureza e conseqüentemente tendem a se acumular nas cadeias alimentares. Alguns metais pesados como níquel, ferro, cobre e zinco são essenciais para as reações metabólicas e são necessários para os organismos. Outros como mercúrio, prata e cádmio não têm papel biológico e são prejudiciais aos organismos, mesmo em concentrações muito baixas (Lima De Silva et al., 2012).

Muitas bactérias possuem mecanismos genéticos específicos de resistência a metais tóxicos. No meio ambiente, metais podem selecionar essas variantes resistentes de maneira similar à seleção de cepas resistentes a antimicrobianos. De fato, é relativamente comum a associação de resistência a metais e antimicrobianos já que ambos os genes de resistência estão frequentemente localizados em elementos genéticos móveis (Foster, 1983; McIntosh et al., 2008). Conseqüentemente, pode-se inferir que a pressão seletiva exercida pelos metais pesados possa contribuir

para a co-seleção indireta da resistência aos antimicrobianos, particularmente em ambientes contaminados com os dois elementos (Lima De Silva et al, 2012). Diversos genes são responsáveis pela resistência aos metais e metais pesados. Cada metal ou metal pesado possui um gene relacionado à resistência, sendo eles: *ars* (arsênio), *cadC* (cádmio), *nik* e *rcn* (níquel), *rcn* (cobalto), *teh* (telurito), *fet* (ferro), *mer* (mercúrio), *pco* (cobre), *sil* (prata) e *pbr* (chumbo) (BacMet; Institut Pasteur).

Devido a emergência de micro-organismos multirresistentes, biocidas, como desinfetantes e antisépticos, estão sendo amplamente utilizados para melhorar os padrões de controle de infecção em hospitais (Romão et al., 2011). No entanto, uma preocupação especial é a de que o uso contínuo destes produtos possa levar ao surgimento de resistência ou susceptibilidade reduzida a estes tipos de compostos. Um dos tipos de compostos utilizados são os compostos de amônios quaternários.

Os compostos de amônio quaternário, também conhecidos como “QACs”, são sais de amônio com alguns ou com todos os átomos de hidrogênio do íon NH_4^+ substituídos por grupos alquila ou arila. QACs, que contêm cloreto de benzalcônio, são amplamente utilizados e são empregados como antissépticos para feridas e peles e como desinfetantes em hospitais (Kücken et al., 2000). Possuem bom poder bactericida, especialmente frente às bactérias Gram-positivas, sendo pouco eficientes contra as Gram-negativas, no entanto, seu efeito contra bactérias Gram-negativas pode ser potencializado por meio do uso de EDTA, pois este possui efeito quelante para alguns compostos da parede celular, facilitando a penetração do amônio quaternário por meio da membrana celular (Portal de Segurança alimentar, 2018).

Já foi demonstrado anteriormente que a expressão de sistemas de efluxo é um dos principais mecanismos de resistência aos biocidas (Paulsen et al., 1993; Poole, 2005). *K. pneumoniae*, assim como outras bactérias Gram-negativas, pode possuir genes que são responsáveis por esse tipo de resistência, como, *cepA*, *qacE* e *qacEΔ1* (Paulsen et al., 1993; Kazama et al., 1998; Kücken et al., 2000). Os sistemas de efluxo de biocidas em Gram-

negativas são geralmente codificadas pelo cromossomo, com exceção dos genes *qacE*, *qacEΔ1*, *qacF* e *qacG* que são associados a elementos móveis. Essa talvez seja uma possível explicação para a ampla distribuição entre as bactérias Gram-negativas dos genes *qacE*, especialmente *qacEΔ1*, que está relacionado a extremidade 3' de integrons de classe I (Poole, 2005).

1.7 Resistência antimicrobiana no meio ambiente

Resistência aos antimicrobianos é a causa de centenas de milhares de mortes anualmente e tende a aumentar ainda mais. Devido a isso, a Organização Mundial de Saúde (OMS) reconheceu a resistência aos antimicrobianos como uma das maiores ameaças mundiais à saúde (WHO, 2017). A OMS divulgou uma lista com os principais patógenos que necessitam de novos antimicrobianos, esta lista está demonstrada na Tabela 6.

Tabela 6 - Lista de micro-organismos que são prioridade para a OMS em relação ao descobrimento de novos antimicrobianos

Micro-organismo	Resistência a antibióticos
Prioridade 1: Crítico	
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Carbapenêmicos
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Carbapenêmicos
Enterobacteriaceae	Carbapenêmicos, produtoras de ESBL
Prioridade 2: Alta	
<i>Enterococcus faecium</i>	Vancomicina
<i>Staphylococcus aureus</i>	Meticilina, vancomicina intermediário e resistente
<i>Helicobacter pylori</i>	Claritromicina
<i>Campylobacter spp.</i>	Fluorquinolonas
<i>Salmonellae</i>	Fluorquinolonas
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Cefalosporinas, Fluorquinolona
Prioridade 3: Médio	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Não-suscetível a penicilina
<i>Haemophilus influenzae</i>	Ampicilina
<i>Shigella spp.</i>	Fluorquinolona

Convencionalmente, a luta contra o desenvolvimento e disseminação da resistência aos antimicrobianos estava mais focada nos cenários hospitalar e de comunidade. No entanto, recentemente, o ambiente também foi colocado como fonte e rota de disseminação da resistência aos antimicrobianos, mas nosso conhecimento ainda é limitado (Martinez, 2008; Wright, 2010).

A OMS propôs uma estratégia para o combate à resistência aos antimicrobianos chamada “One-Health” (Saúde Única), que consiste em uma abordagem para projetar e implementar programas, políticas, legislação e pesquisa em que vários setores se comunicam e trabalham juntos para alcançar melhores resultados de saúde pública (WHO, 2017). Aumentar o conhecimento sobre os fatores ambientais que conduzem a resistência pode nos permitir construir modelos de como a resistência surge e se dissemina (Bengtsson-Palme et al., 2018).

Novos fatores de resistência aos antimicrobianos podem, potencialmente, emergir em qualquer lugar, a qualquer momento. O número surpreendente de células bacterianas na Terra, estimado em cerca de 10^{30} (Kallmeyer et al., 2012), fornece uma imensa variabilidade genética e oportunidades para mutações, rearranjos e transferência horizontal de genes.

A transferência horizontal de genes é vital para a disseminação de novos (e conhecidos) genes de resistência, pois permite que a resistência se expanda para além de clones específicos. Quanto à mobilização de fatores de resistência, a transferência de genes entre bactérias pode, em teoria, ocorrer em qualquer lugar. No entanto, para que os genes de resistência sejam transferidos horizontalmente de bactérias ambientais para bactérias patogênicas, eles precisam, pelo menos temporariamente, compartilhar o mesmo habitat (Bengtsson-Palme et al, 2018).

A grande maioria dos fatores de resistência existentes, incluindo aqueles ainda não descritos, é pouco provável de ser encontrada em patógenos e comensais humanos, mas seria esperado que estivesse presente em bactérias ambientais (Allen et al., 2010). As bactérias que não estão tipicamente associadas ao microbioma humano podem ter a

oportunidade de interagir com espécies associadas ao ser humano em várias configurações. Uma possibilidade é a de que bactérias ambientais possam estar presentes, transitoriamente, no microbioma humano, após interação com animais selvagens, ingestão de alimentos crus ou ingestão de água contaminada (Allen et al., 2010; De Boeck et al., 2012; Ghaly et al., 2017).

Um patógeno (ou comensal) que adquire um fator de resistência de uma bactéria ambiental, mas é erradicado antes que possa retornar a um hospedeiro humano, nunca causa problemas de resistência clínica. Somente aqueles que voltam a seus hospedeiros podem causar ameaças à saúde humana. Estações de tratamento de esgoto são um ambiente propício para interação de diferentes espécies bacterianas, e também podem apresentar condições suficientes para seleção de resistência (Rizzo et al., 2013). Outros meios que podem servir como locais interessantes para a transferência de resistência podem ser encontrados na agricultura - particularmente entre animais (Allen, 2014; Bengtsson-Palme et al., 2018), corpos d'água (Baquero et al., 2008; Lupo et al., 2012), e a cadeia de abastecimento alimentar (Rolain, 2013; Bengtsson-Palme et al., 2018). Todos esses ambientes têm em comum o fato de que as vias de exposição ao homem após uma potencial transferência podem ser relativamente mais curtas (Bengtsson-Palme et al., 2018).

Por outro lado, transferência de fatores de resistência de patógenos humanos para bactérias ambientais é possível, permitindo que bactérias associadas a humanos usem populações bacterianas ambientais como reservatórios para genes de resistência que podem ser novamente recrutados para o corpo humano (Baquero et al., 2008; Martinez, 2008).

A razão mais urgente para estudar a resistência aos antimicrobianos no ambiente é obter mais informações sobre a saúde, riscos para humanos e animais domésticos que muitas vezes dependem de antimicrobianos eficazes. Esse conhecimento pode, então, idealmente, ser usado para projetar intervenções que possam impedir ou retardar o recrutamento de fatores de resistência a patógenos de bactérias ambientais e reduzir a

disseminação ambiental de patógenos resistentes (Bengtsson-Palme et al, 2018).

No Brasil não existe a obrigatoriedade de o hospital tratar o seu efluente antes de descartá-lo na rede de esgoto, e as regulamentações sanitárias existentes não foram desenvolvidas considerando a resistência antimicrobiana (Picão et al, 2013). Não foi prevista na legislação parâmetros para a quantificação de antimicrobianos nos efluentes descartados pelos hospitais ou a eliminação destes nas estações de tratamento de esgoto.

1.8 Interação da resistência aos antimicrobianos entre o ambiente, o hospital e animais

As rotas de transmissão dos genes de resistência aos antimicrobianos passam por todos os nichos do planeta. Assim como o ambiente, os animais também têm um papel importante nessa cadeia de eventos. Os animais também podem servir como hospedeiros intermediários para bactérias resistentes, e são um outro tipo de reservatório para a transferência de resistência a patógenos humanos (Allen et al., 2010). Já foram descritos genes de resistência aos antimicrobianos em diversas espécies de animais, como pinguim (Sellera et al., 2018), bezerro e vaca leiteira (Sartori et al., 2017), porcos e galinhas (Hong et al., 2018), pássaros de vida livre (Krawiec et al., 2017) e morcegos e animais de pecuária (Benavides et al., 2018). Os animais de consumo também servem como fonte de genes de resistência para os humanos, tendo sido descritos em diversos alimentos, como frango, carne de porco, queijo, carnes e frutos do mar (Fernandes et al., 2017; Hong et al., 2018; Jans et al., 2018; Ledina et al., 2018). A Figura 9, demonstra essa interação em *K. pneumoniae* MDR e XDR.

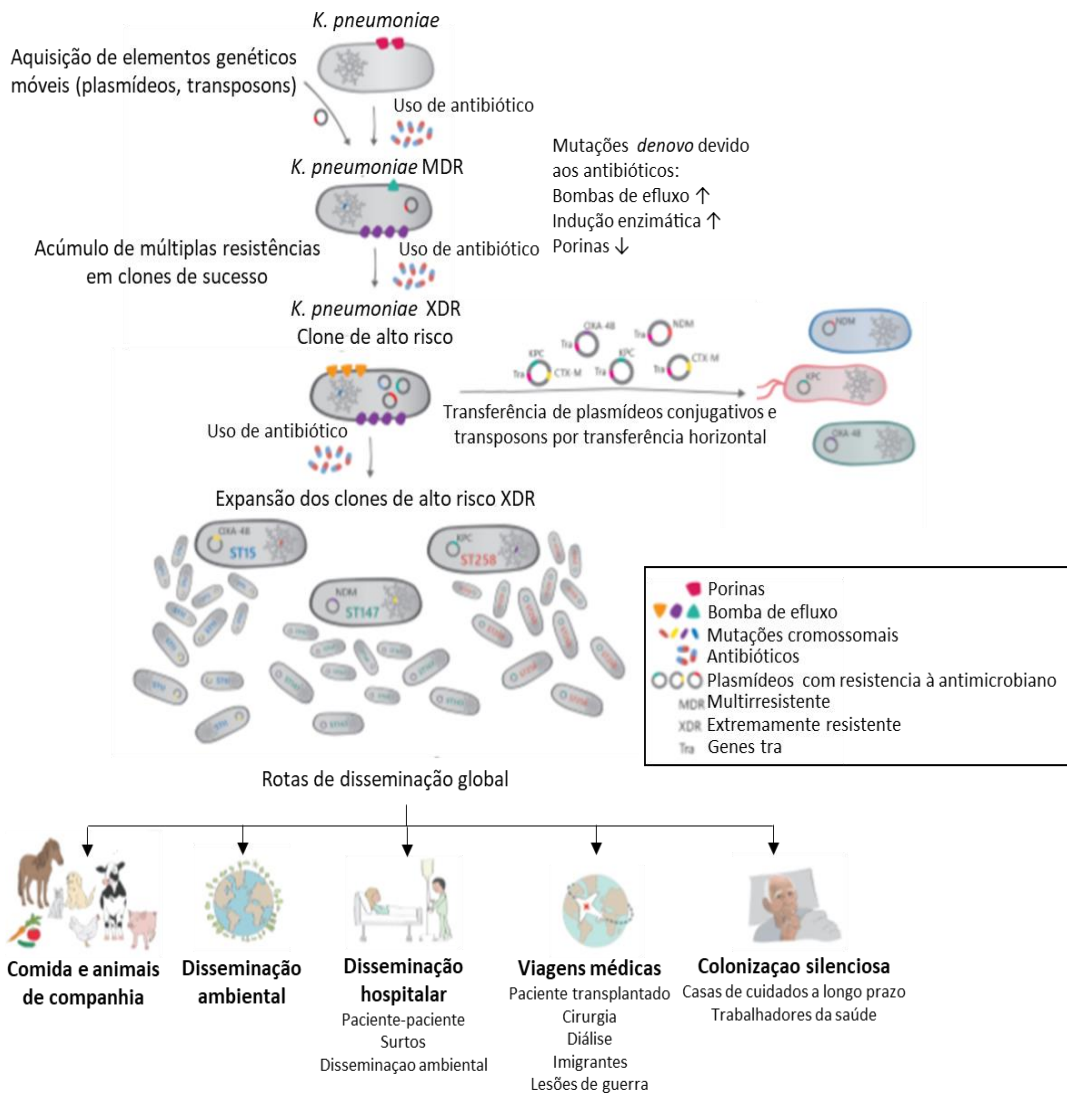


Figura 9 - Surgimento e disseminação de *K. pneumoniae* MDR e XDR e genes de resistência aos antimicrobianos (Navon-Venezia et al, 2017).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Caracterizar o genoma completo, de três cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de KPC-2, pertencentes ao ST437, sendo um isolado clínico e dois isolados do meio ambiente.

2.2 Objetivo Específico

- Realizar tipagem molecular pela técnica de PFGE
- Identificar e comparar o resistoma de cada isolado e comparar com o fenotípico;
- Identificar o viruloma e presença de plasmídeos de cada isolado;
- Identificar genes responsáveis pela resistência a metais e metais pesados, amônios quaternários e sistemas de efluxo;
- Identificar o ambiente genético dos genes *bla_{KPC}* e *bla_{CTX-M-15}*;
- Analisar e comparar o plasmídeo completo que carrega os genes *bla_{KPC}* e *bla_{CTX-M-15}* de cada isolado;
- Analisar cada genoma separadamente e compará-los, de modo a entender seus mecanismos de resistência a antimicrobianos
- Verificar possíveis alterações que possam ter ocorrido no genoma desses micro-organismos para melhor adaptação ao seu ambiente: hospitalar ou meio ambiente.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostragem

Foram estudadas 3 cepas de *K pneumoniae* produtoras de KPC-2 e pertencentes ao ST437, sendo um isolado do Rio Tietê (Kp196, TIET-4200), o segundo isolado do Rio Pinheiros (Kp148, PINH-4900), ambos pertencentes ao estudo de Oliveira et al, 2014, e o terceiro isolado (Kp314/11) de um hospital localizado próximo ao ponto de coleta dos isolados dos rios, caracterizado por Francisco (2014). As três cepas estudadas foram isoladas na cidade de São Paulo no ano de 2011 e se encontram geograficamente distribuídas conforme Figura 10.

O rio Tietê nasce a uma altitude de 1.030 metros da Serra do Mar, no município paulista de Salesópolis. O Tietê atravessa a Região Metropolitana de São Paulo e segue para o interior do Estado, desaguando posteriormente no rio Paraná, num percurso de quase 1.100 km (DAEE, 2018).

O lançamento de esgotos industriais inicia-se a 45 km da nascente na cidade de Mogi das Cruzes. Na zona metropolitana o rio encontra o maior complexo urbano-industrial do país, e conhece um de seus trechos mais poluídos, a foz do Tamanduateí (DAEE, 2018).

O rio Pinheiros é um curso de água que banha a cidade de São Paulo. Nasce do encontro do rio Guarapiranga com o rio Grande e desagua no rio Tietê. Possui cerca de 25 quilômetros de extensão. O rio Pinheiros e sua bacia são alvo de 290 indústrias e dejetos de 400 mil famílias, sendo enquadrado na Classe nº 4 pelo Decreto Estadual nº 10.755/77, tendo como referência a classificação conceituada pelo Decreto Estadual nº 8.468/76. Isso significa que a água é totalmente poluída e só pode ser destinada à navegação e à harmonia paisagística (DAEE, 2018)

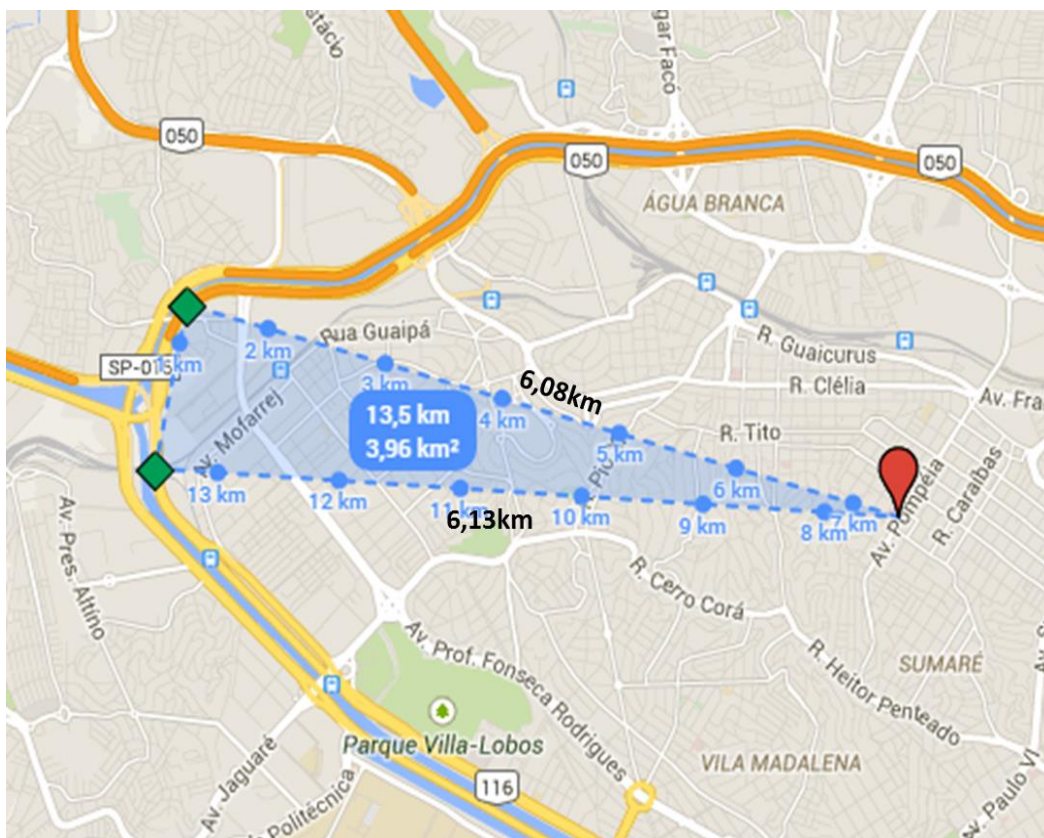


Figura 10 - Distância em Km do hospital do qual foi selecionada a cepa de *K. pneumoniae* produtora de KPC-2 pertencente ao ST437 até os pontos de coleta das cepas provenientes dos Rios Tietê e Pinheiros do estudo de Oliveira e colaboradores (2014).

3.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da CIM para os antimicrobianos ceftazidima, cefotaxima com e sem ácido clavulânico, aztreonam, cefepime, ertapenem, meropenem, imipenem com e sem EDTA, ticarciclina-ácido clavulânico, tigeciclina, tetraciclina, gentamicina, tobramicina, amicacina, cloranfenicol, ciprofloxacina, levofloxacina, ácido nalidíxico e sulfametoxazol-trimetoprim foi realizada pelo método de fitas gradientes de concentração de antimicrobianos (E-test®, AB Biodisk, Suécia) e a CIM para polimixina B foi determinada pela técnica de microdiluição em caldo.

A leitura e interpretação dos testes foram realizadas de acordo com o CLSI 2018 e, para os antimicrobianos aztreonam, cefepime, ceftazidima,

ertapenem, polimixina B e tigeciclina foram utilizados os pontos de corte do EUCAST, segundo recomendação da Nota Técnica (NT) 01/2013 da Anvisa. Como controle de qualidade foram incluídas nos testes de sensibilidade a cepa ATCC (American Type Cultura Collection) de *E. coli* ATCC 25922.

3.2.1 E-test®

Para o E-test®, foi preparada uma suspensão de colônias isoladas em solução de NaCl 0,85% na escala 0,5 de McFarland (obtida através do densitômetro Densicheck Plus – Biomérieux). A suspensão foi então semeada em ágar Müller-Hinton e as tiras de E-test® foram aplicadas. As placas foram incubadas a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 16-20 horas.

3.2.2 Microdiluição em caldo

Para a determinação da CIM da Polimixina B, foram distribuídos 50µL de caldo Müller-Hinton cátion-ajustado (CMHCA) (Difco), utilizando um pipetador multicanal, em cada cavidade de uma placa de poliestireno com fundo em “U”, exceto nas cavidades da coluna 12, nas quais foram dispensados 100µL de caldo com a concentração 2x maior que a máxima testada para o antimicrobiano. Para esse teste foi preparada, em tubo estéril, uma solução de Polimixina B (solução mãe 10.000 µg/mL) em CMHCA na concentração de 128 µg/mL, para que fosse testada nas concentrações de 0,125 até 64 µg/mL. Foram feitas diluições seriadas, partindo da coluna 12 até a coluna 3.

As suspensões bacterianas foram ajustadas na escala 0,5 McFarland (conc ~ $1,5 \times 10^8$ UFC/mL), e diluídas 1:100, adicionando 2970 µL de CMHCA e 30 µL da suspensão bacteriana em canaletas estéreis. Em seguida, foram dispensados 50 µL da suspensão diluída, a partir da coluna 2 até a coluna 12. Ao final dessa etapa, as concentrações iniciais de antimicrobianos foram diluídas 1:2, alcançando as concentrações desejadas para o teste. A

concentração final de bactérias foi de $5,0 \times 10^5$ UFC/mL (5×10^4 UFC/cavidade).

A coluna 1 foi utilizada como controle de esterilidade do teste, e foi acrescentado apenas CMHCA, e a coluna 2 como controle de crescimento bacteriano acrescentando a suspensão bacteriana em CMHCA. A linha A foi utilizada com a suspensão bacteriana da cepa de *E. coli* ATCC 25922. As placas foram incubadas a 35°C por 16 a 20 horas.

3.3 Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE)

A técnica de PFGE foi realizada de acordo com protocolo do CDC, baseado no modificado por Gautom (1997).

3.3.1 Preparo das Amostras

Os isolados bacterianos foram semeados em meio Tryptic Soy Agar (TSA) e incubadas por 16-18h a 35°C. A partir do crescimento obtido foi feita uma suspensão bacteriana em tampão de suspensão celular (Anexo 2) com turbidez de 15% T medido em espectrofotômetro.

Desta suspensão, foi aliqotado 200 µL em um microtubo e acrescentado proteinase K e lisozima e misturou-se gentilmente invertendo os tubos 5-6 vezes (concentração final de proteinase K e lisozima = 1 mg/mL). Em seguida, foi adicionado 200 µL de agarose (Anexo 2) em cada um dos tubos e após ser misturada a suspensão foi rapidamente distribuída em moldes para a formação dos blocos. Após a solidificação da agarose, os moldes foram colocados em um tubo Falcon contendo 5 mL de tampão de lise celular (Anexo 2) e 25 µL de proteinase K e incubados em agitador a 54°C, 120 rpm por 2 horas.

Após o período de lise, a solução foi retirada e em cada tubo foi adicionado aproximadamente 15 mL de água ultrapura estéril pré-aquecida a 50°C e colocada novamente no agitador a 50°C, 120 rpm por 15 minutos. Este processo foi repetido por mais uma vez. Posteriormente, foi adicionado

aproximadamente 15 mL de TE (Anexo 2) pré-aquecido a 50°C e recolocados no agitador sob as mesmas condições, repetindo o mesmo processo por mais 3 vezes. No final das lavagens, foi adicionado 10 mL de TE a temperatura ambiente e os blocos foram estocados a 4°C até o momento da digestão.

3.3.2 Digestão das amostras com enzima de restrição

Os blocos foram cortados com uma lâmina em pedaços de 2 mm de espessura e transferidos para um microtubo contendo o tampão da enzima e incubados em banho Maria a 37°C por 10 min. Foi preparada uma solução da enzima *XbaI* seguindo as instruções do fabricante (concentração final de enzima 50 U/bloco) e após a incubação, os blocos foram colocados em microtubos com 100 µL da solução da enzima e incubados em banho Maria a 37°C/16-18 h. Decorrido o período de incubação a solução com a enzima foi retirada e substituída por 100 µL de TBE 0,5x e as amostras foram mantidas a 4°C até o momento da eletroforese.

3.3.3 Preparo do gel e eletroforese

Foi preparado 100 mL de gel de agarose (SeaKem® Gold) a 1% em TBE 0,5x e após sua solidificação, os blocos foram inseridos nos “pocinhos” do gel e posteriormente o gel foi selado com a mesma agarose para impedir a saída dos blocos durante a eletroforese. Foi utilizada a *Salmonella* Braenderup H9812 digerida com a enzima *XbaI* como marcador. A eletroforese foi realizada em equipamento CHEF DR III (BioRad) a 6 V/cm e temperatura de 14°C, nos seguintes parâmetros:

Tempo Inicial: 2,2 s

Tempo Final: 54,2 s

Tempo de Corrida: 19 h

Após a corrida o gel foi corado em brometo de etídio (0,5 mg/mL) por 30 min e descorado 2 vezes com água destilada por 15 min cada vez e observados no fotodocumentador (DNR – Bio imagins systems – Modelo MiniBis Pro).

3.3.4 Análise dos dados

Os perfis de restrição foram analisados pelo programa Bionumerics, versão 7.5 (Applied Maths, Kortrig, Bélgica). Foram construídos dendrogramas para analisar a proximidade genética entre os isolados de *K. pneumoniae*, utilizando-se “Unweighted pair group method with arithmetic mean” (UPGMA). Os perfis de PFGE foram determinados com base no coeficiente de similaridade de Dice com tolerância de 1,0% e as cepas que apresentaram similaridade maior ou igual a 80% foram consideradas pertencentes ao mesmo perfil.

3.4 S1 Nuclease - PFGE

3.4.1 Preparo das Amostras

As amostras foram preparadas da mesma maneira que para o PFGE, com exceção da turbidez que, para a S1 nuclease, foi de de 4% a 5% T medido em espectrofotômetro e a quantidade de lisozima adicionada a suspensão foi de 10 µL (solução estoque de 40 mg/mL).

3.4.2 Digestão dos plugs com a enzima S1 nuclease

Os plugs foram cortados em espessura de 2,0 mm e tratados com S1 nuclease de acordo com as instruções do fabricante.

S1 nuclease (Promega): conc original = 80 U/µL

Para cada plug – 0,5 µL de S1 nuclease = 40 U

8 μ L de 10X buffer

91,5 μ L de água ultrapura

Os plugs foram digeridos por 1 hora a 37°C em banho maria. Após o tempo decorrido, a solução com enzima foi retirada e substituída por 200 μ L de ES Buffer 1% (anexo 2) e os tubos foram deixados no gelo por 1 h.

3.4.3 Eletroforese em Campo Pulsado

Para eletroforese foi utilizado gel de agarose (SeaKem® Gold) a 1% em TBE 0,5x e o procedimento foi o mesmo utilizado no PFGE. Foi utilizado como marcador o Lambda Ladder PFG Marker (Biolabs). A eletroforese foi realizada em equipamento CHEF DR III a 6 V/vm e temperatura de 14°C, nos seguintes parâmetros:

Tempo Inicial: 1,0 s

Tempo Final: 40,0 s

Tempo de Corrida: 17 h

Após a corrida o gel foi corado em brometo de etídio (0,5 mg/mL) por 30 min e descorado 2 vezes com água destilada por 15 min cada vez e observado no fotodocumentador (DNR – Bio imagins systems – Modelo MiniBis Pro). O tamanho dos plasmídeos foi determinado programa Bionumerics, versão 7.5 (Applied Maths, Kortrig, Bélgica), com curva de calibração feita pelo modelo logarithmic dependence cubic spline fit.

3.5 Extração do DNA plasmidial

Os plasmídeos foram extraídos pelo kit Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System (Promega, USA) segundo a orientação do fabricante e, posteriormente, foi realizada eletroforese em gel de agarose (0,8%)

realizada a 90 V por 2 horas e 30 minutos para confirmação da presença dos plasmídeos extraídos.

3.6 Experimentos de transformação

Para os experimentos de transformação foram preparadas células competentes de *E. coli* DH10B de acordo com o protocolo de Barbas III et al, (2001). Para a eletroporação, misturou-se em uma cubeta de eletroporação de 1 mm, 50 μ L de *E. coli* eletrocompetente com 20 μ L da extração de plasmídeo e a cubeta foi colocada no gelo por 1 min. Foi, então, selecionado o modo Ec1 do eletroporador (*E. coli* cubeta 0,1cm – voltagem 1,8 kV) e, após remover qualquer gelo ou água da parte externa da cubeta, foi aplicado o pulso elétrico. Imediatamente após o choque a solução foi transferida para um tubo contendo 400 μ L de SOC (temperatura ambiente) (anexo 2) e incubada a 37°C por no mínimo 90 minutos. Após esse período, 100 μ L da cultura foi semeada em placas de Petri de 90 x 15 mm contendo 20 mL de TSA com ampicilina (concentração final 50 μ g/mL). A placa foi incubada a 37°C/ON. As colônias transformantes foram selecionadas posteriormente com ertapenem e cefotaxima para seleção dos plasmídeos que carregam o *bla*_{KPC-2} e *bla*_{CTX-M-15}, respectivamente, e as colônias resistentes foram submetidas a PCR com primers específicos para a confirmação da presença dos genes de resistência a antimicrobianos *bla*_{KPC-2} (Rasheed et al, 2008) e *bla*_{CTX-M-15} (Muzaheed et al, 2008).

3.7 Extração do DNA genômico e plasmidial para biblioteca genômica

O DNA genômico foi extraído com o Pure Link Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen) e os plasmídeos pelo kit Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System (Promega, USA). Posteriormente, foi realizada a medição da concentração (ng/ μ L) e a relação 260/280 e 260/230 das amostras extraídas para verificação da qualidade de DNA em espectrofotômetro (Eppendorf BioEspectrometer), além da eletroforese em

gel de agarose (0,8%) feita a 90 volts por 2 horas e 30 minutos para confirmação da presença do DNA e ausência de RNA. As amostras com concentração maior que 0,2 ng/μL, relação 260/280 entre 1,8 e 2,0 e 260/230 maior que 2 foram consideradas aptas para realização da construção da biblioteca genômica.

3.8 Montagem da biblioteca genômica e sequenciamento

3.8.1 Plataforma Illumina com sistema MiSeq

Para o preparo da biblioteca genômica foram utilizados os equipamentos do Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa (CEFAP) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo e realizada pela equipe do CEFAP.

Primeiramente, foi realizada a quantificação do DNA por fluorescência pelo Qubit 2.0. A seguir, foi realizada a etapa de fragmentação do DNA por quebra enzimática e ligação dos adaptadores e barcodes com o Kit Nextera XT (Illumina). Para checar a distribuição do tamanho da biblioteca foi utilizado o Agilent Technology 2100 Bioanalyzer.

Em seguida, a biblioteca foi sequenciada pelo Sistema Miseq (Illumina) utilizando-se o kit MiSeq reagent v.3 600 ciclos (Illumina)

3.8.2 Plataforma Illumina com sistema NextSeq

A biblioteca genômica foi preparada da mesma maneira que o sistema Miseq, no entanto, o kit utilizado para o sequenciamento foi o NextSeq High Output 300 ciclos (Illumina).

3.9 Montagem dos plasmídeos

Após o sequenciamento, as sequências com qualidade PHRED ≥ 20 foram submetidas ao montador A5-miseq e ao Software Geneious v9. Os

contigs obtidos foram alinhados contra o genoma de referência da *E. coli* str. K12 substr. DH10B (número de acesso NC_010473), as reads não mapeadas foram montadas *de novo*. Para a geração de um scaffold preliminar e o fechamento dos gaps remanescentes foi realizado o fechamento de gaps *in silico* proposto por Cerdeira et al. (2011). A sequência final teve sequências degeneradas de N adicionadas a suas extremidades 5' e 3', a fim de estender *in silico* até sua circularização, de acordo com o proposto por Cerdeira et al. 2011.

A sequência completa do plasmídeo foi anotada pela ferramenta RAST e, então, foi feita uma curadoria manual utilizando o banco de dados do BLAST e do UNIPROT. Para confirmação dos genes de resistência aos antimicrobianos foi utilizada a ferramenta on line ResFinder (Zankari et al., 2012), e para determinação do grupo de incompatibilidade utilizou-se a ferramenta PlasmidFinder (Carattoli et al., 2014). As regiões contendo elementos móveis foram identificadas pela ferramenta ISFinder. Para análise da possível função das proteínas hipotéticas, utilizou-se o banco de dados do Protein BLAST e do InterPro e para a construção das figuras de comparação foi utilizado o programa EasyFig.

3.10 Montagem do cromossomo

Após o sequenciamento, as reads com qualidade PHRED ≥ 20 foram analisadas com diferentes montadores. As reads das amostras KP148, PINH-4900 e KP196, TIET-4200 foram submetidas ao montador A5-MiSeq e ao Software Geneious v. R9 (Biomatters Ltd, New Zealand), utilizando-se a estratégia *de novo*. As reads da amostra Kp314/11 foram submetidas apenas ao montador Velvet v1.2.10 do Software Geneious v.R9 também se utilizando a estratégia *de novo*.

Após a montagem, os contigs pertencentes ao plasmídeo que carrega o gene *bla*_{KPC} foram retirados, pois já haviam sido depositados no Genbank, e os contigs restantes foram anotados com a ferramenta NCBI Prokaryotic

Genome Annotation Pipeline v.3.2 e depositados no banco de dados do NCBI.

Para confirmação da identificação bacteriana, identificação dos genes de resistência a metais pesados, virulência e sistemas de efluxo foi utilizado o banco de dados do Instituto Pasteur. Para detecção de genes de resistência a metais e biocidas antibacterianos foi utilizado o banco de dados do BacMet (Pal et al., 2014).

Para identificação dos genes de resistência aos antimicrobianos foi utilizada a ferramenta *on line* ResFinder 3.0 (Zankari et al., 2012), e para determinação dos grupos de incompatibilidade dos plasmídeos presentes em cada isolado, utilizou-se a ferramenta PlasmidFinder 1.3 (Carattoli et al., 2014).

3.11 Teste de estabilidade do plasmídeo que carrega o *bla*_{KPC-2}

O experimento foi realizado com base na técnica de contagem de colônias descrita por Menart et al., 2003. As 3 cepas do estudo foram submetidas ao experimento em triplicata.

A partir do crescimento ON em LB ágar de 1 colônia da cepa carreadora do plasmídeo, foi escolhida 1 colônia e incubada em 5 mL de caldo LB com ertapenem (1 µg/mL) a 37°C com agitação (110 rpm) por 24 h para garantir 100% da presença do plasmídeo. Este crescimento foi considerado o caldo T0. Uma alíquota de 4,9 µL foi transferida do crescimento T0 para 5 mL de LB sem ertapenem e incubada a 37°C com agitação (110 rpm) por 24 h. Este procedimento foi repetido dez vezes. A cada nova transferência de meio, de T0 a T10, uma alíquota de 100 µL foi submetida a uma diluição seriada de 10⁻¹ até 10⁻⁶ e a partir das diluições 10⁻⁵ e 10⁻⁶ foram utilizados 100 µL para semeadura de cultura em ágar LB contendo ou não ertapenem (1µg/mL) e posterior contagem das colônias.

Das colônias provenientes dos caldos T0, T5 e T10 da placa sem antimicrobiano, 50 colônias foram ressemeadas em placas com e sem ertapenem (1µg/mL) para confirmação da presença ou não dos plasmídeos.

Em caso de não crescimento da colônia na placa com ertapenem, a colônia correspondente na placa sem ertapenem foi submetida a PCR para confirmação da perda do plasmídeo.

3.12 Hibridação com sonda marcada para detecção do plasmídeo carreador do *bla*_{CTX-M-15}

Os géis dos testes de PFGE pela enzima *S1* foram fotografados e utilizados para transferência do DNA à membrana de Nylon®. A metodologia foi realizada por vácuo, em máquina de sucção através do tratamento manual com tampões de depurinação, desnaturação e neutralização. Após a transferência a membrana foi submetida ao processo de hibridação com sonda marcada para o gene *bla*_{CTX-M-15} pelos kits Biotin DecaLabel DNA Labeling (Thermo Scientific) e outro kit DIG DNA Labeling and Detection (Roche, Alemanha), segundo recomendações do fabricante. Após a hibridação *overnight* em 42 °C, a membrana foi lavada e foi realizada a detecção segundo o protocolo de cada kit. A descrição completa do protocolo de hibridação por ambos os kits, bem como as soluções utilizadas estão descritas no anexo 4.

4 RESULTADOS

4.1 Concentração Inibitória Mínima

As cepas foram resistentes e apresentaram CIM em alto nível para a maioria dos antimicrobianos testados. A cepa Kp148, PINH-4900 foi sensível apenas para gentamicina, amicacina e tigeciclina, a cepa Kp196, TIET-4200 foi sensível para gentamicina, amicacina, tigeciclina e polimixina B e a cepa clínica Kp314/11 foi sensível para gentamicina, amicacina, tigeciclina, cloranfenicol e polimixina B. A Figura 11 apresenta os valores de CIM para cada antimicrobiano de cada cepa.

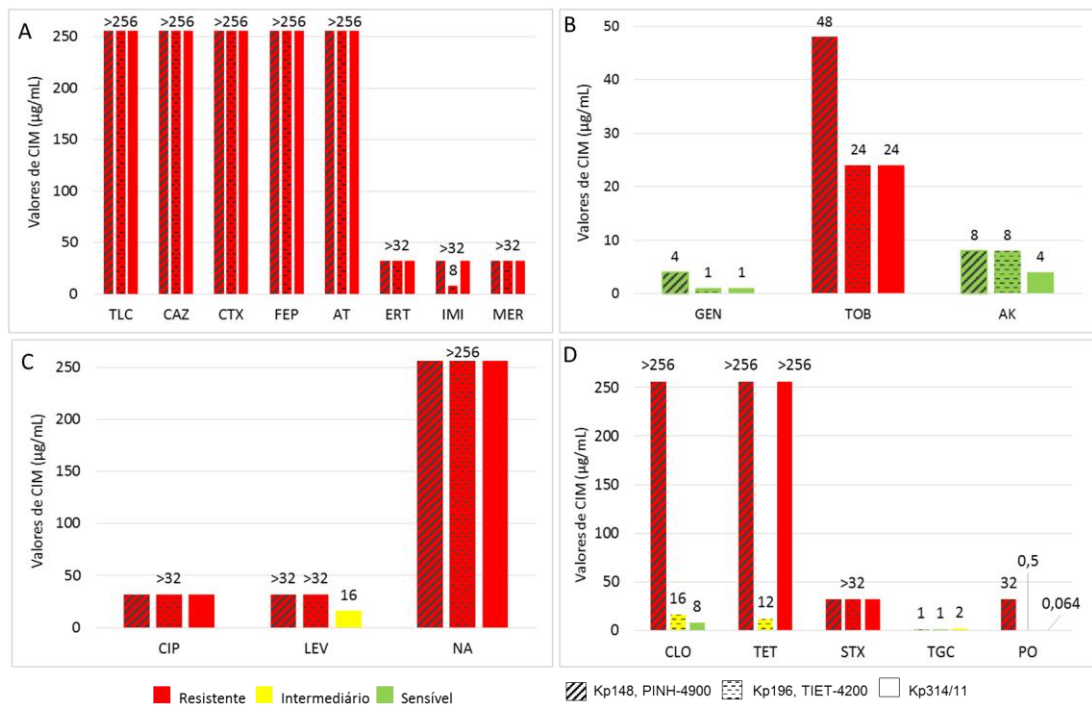


Figura 11 - Resultado do teste de CIM para as cepas do estudo. “A” representa o resultado para os betalactâmicos, “B” aminoglicosídeos, “C” quinolonas e “D” outras classes de antimicrobianos. CAZ (ceftazidima); CTX (cefotaxima); FEP (cefepime); AT (aztreonam); ERT (ertapenem); IMI (imipenem); MER (meropenem); GEN (gentamicina); TOB (tobramicina); AK (amicacina); CIP (ciprofloxacina); LEV (levofloxacina); NA (ácido nalidíxico); TLC (ticarcilina-ácido clavulânico); CLO (cloranfenicol); TET (tetraciclina); SXT (sulfametoxazol-trimetoprim); TGC (tigeciclina); PO (polimixina B).

4.2 PFGE

A técnica de PFGE demonstrou que as cepas pertencem ao mesmo grupo clonal, apresentando mais de 80% de similaridade entre elas, sendo que as cepas isoladas dos rios apresentaram 93,3% de similaridade entre elas. No entanto, por não apresentarem 100% de similaridade, foram consideradas como subtipos diferentes. O dendrograma representado na Figura 12 mostra essa comparação.

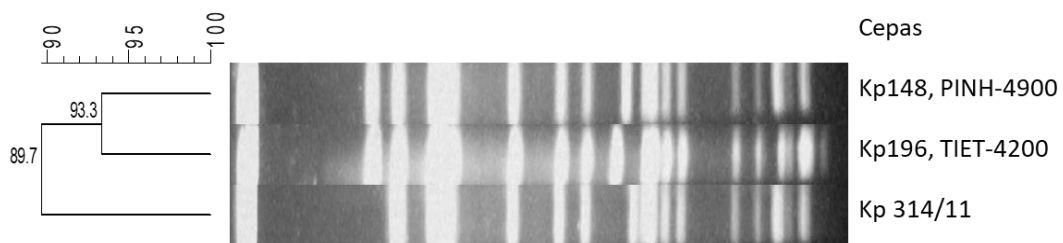


Figura 12 - Dendrograma mostrando o perfil de PFGE das cepas de *Klebsiella pneumoniae*, digeridas com a enzima de restrição *XbaI* com base no coeficiente de similaridade de Dice com tolerância de 1,0%.

4.3 S1 Nuclease - PFGE

A técnica de S1 nuclease-PFGE demonstrou a presença e tamanho dos plasmídeos em cada cepa. As cepas Kp148, PINH-4900 e KP314/11 possuem 3 plasmídeos e a cepa Kp196, TIET-4200 possui 4, com tamanhos próximos, conforme a Figura 13.

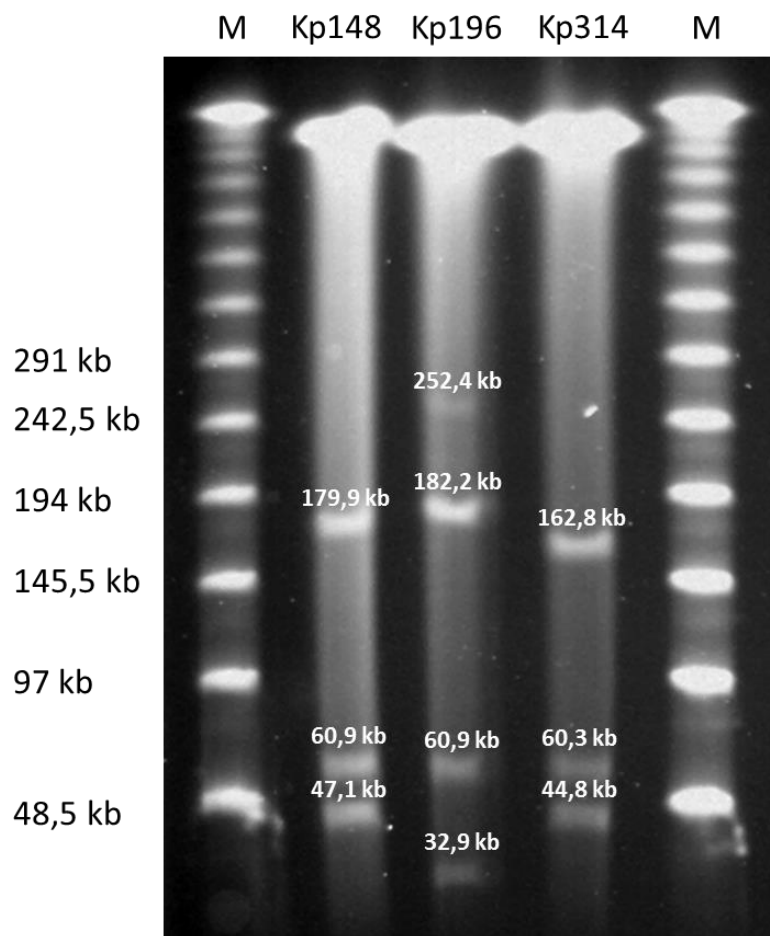


Figura 13 - Plasmídeos observados nas cepas de *K. pneumoniae*, após digestão com a enzima S1 nuclease e eletroforese em campo pulsado com marcador Lambda Ladder PFGE (M). O tamanho dos plasmídeos foi determinado pelo software bionumerics 7.5, com curva de calibração feita pelo modelo logarithmic dependence cubic spline fit.

Foi realizada também a comparação da cepa selvagem com a cepa transformada para o gene *bla_{KPC-2}*, a fim de se determinar qual dos plasmídeos carrega o gene *bla_{KPC-2}*. A Figura 14 mostra esta comparação e em destaque o plasmídeo carreador do *bla_{KPC-2}*. A cepa Kp196, TIET-4200 não está representada na figura pois após diversas tentativas não obtivemos cepas transformadas para o *bla_{KPC-2}*.

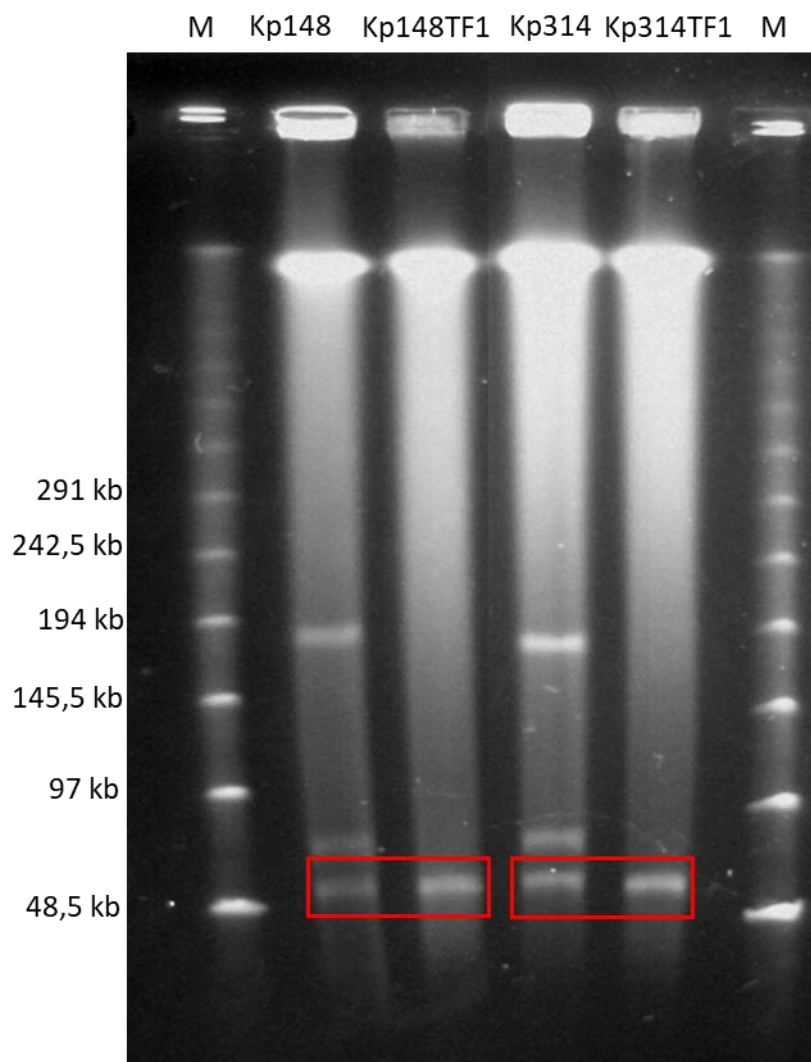


Figura 14 – Comparação dos plasmídeos das cepas selvagens (Kp148 e Kp314) com as respectivas cepas transformadas para o gene *bla*_{KPC-2} (Kp148TF1 e Kp314TF1) de *K. pneumoniae*, após digestão com a enzima S1 nuclease e eletroforese em campo pulsado com marcador Lambda Ladder PFGE (M).

4.4 Sequenciamento completo e análise dos plasmídeos que carregam o gene *bla*_{KPC-2}

Foram sequenciados os plasmídeos que carregam o gene *bla*_{KPC-2} das 3 cepas do estudo, sendo que os plasmídeos de *bla*_{KPC-2} das cepas Kp148, PINH-4900 e KP314/11 foram sequenciados a partir de uma *E. coli* DH10B

transformada e o plasmídeo da cepa Kp196, TIET-4200 foi recuperado do DNA total e montado por referência a partir das sequências dos outros dois plasmídeos. Os três plasmídeos pertencem ao grupo de incompatibilidade N (IncN). O gene *bla_{KPC-2}* está flanqueado pelas IS*Kpn7* e IS*Kpn6*, inserido no transposon Tn*4401* isoforma b. A Tabela 7 mostra as principais informações de cada um deles.

Tabela 7 –Informações gerais dos plasmídeos carreadores do *bla_{KPC-2}* sequenciados

Cepa	Plasmídeo	Tamanho (pb)	Cobertura	Número de acesso
Kp148, PINH-4900	pKP148, PINH-4900(1)	52536	17303,1	KX062091
Kp196, TIET-4200	pKp196, TIET-4200	55902	54,9	KX397572
Kp314	pKp314/11a	54609	12401,3	KX276209

O plasmídeo pKP148, PINH-4900(1) contém 68 ORFs (“Open Read Frame”) (Figura 15), o pKP196, TIET-4200 76 ORFs (Figura 16) e o pKp314/11a 63 ORFs (Figura 17). Possuem a mesma composição gênica em relação à região de transferência e estabilidade durante a conjugação. A região de transferência é composta por 14 genes *tra* (A-G, I-O) e a estabilidade durante a conjugação é conferida pelos genes *stbABC*.

O plasmídeo pKP196, TIET-4200 possui menor cobertura quando comparado aos outros dois plasmídeos porque foi obtido a partir do sequenciamento do DNA total da cepa KP196, TIET-4200, enquanto que os plasmídeos pKP148, PINH-4900(1) e pKp314/11a foram obtidos a partir de cepas transformadas e a extração de plasmídeo foi sequenciada.

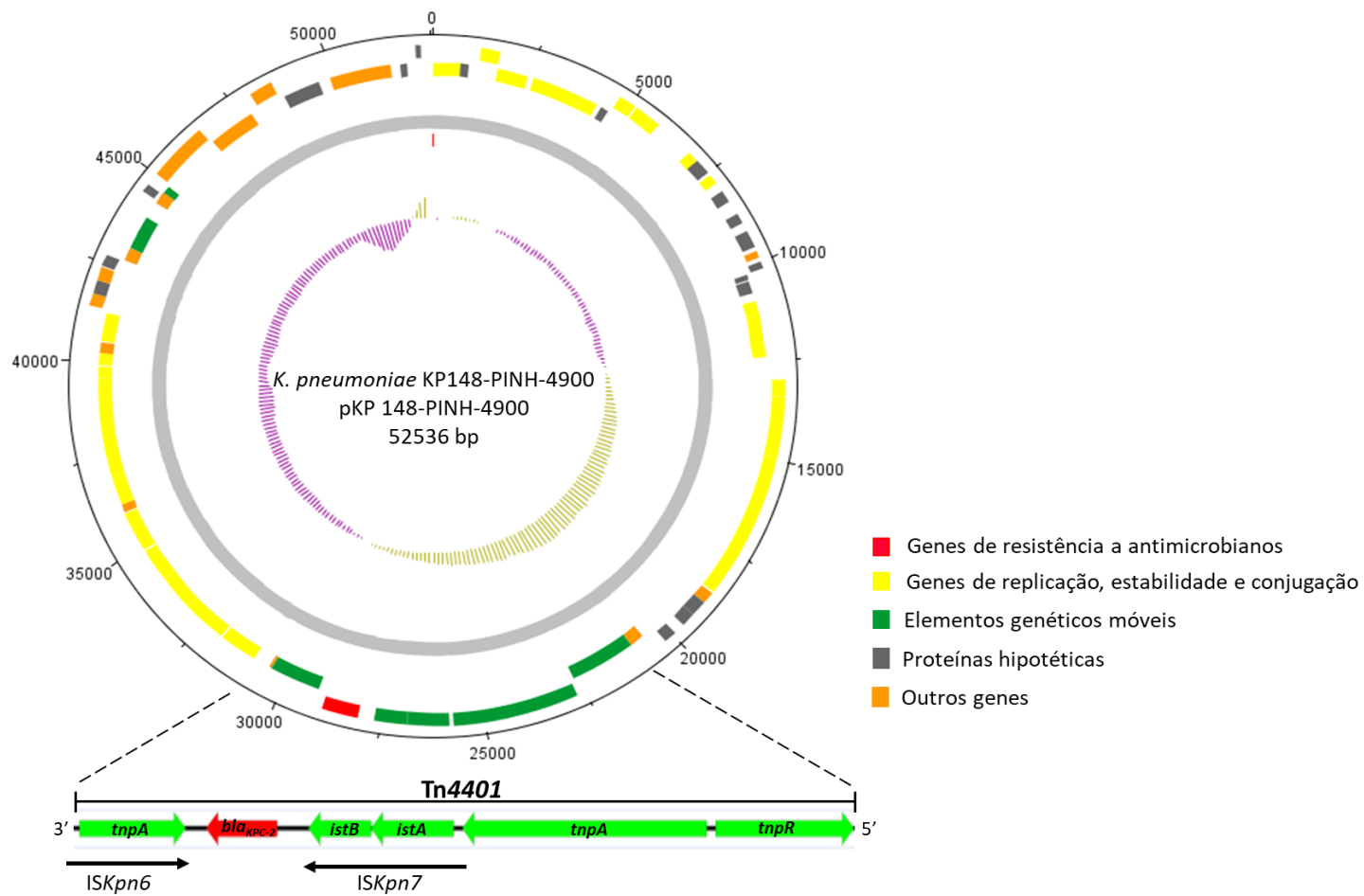


Figura 15 - Estrutura do plasmídeo IncN pKP148, PINH-4900(1) que carrega o gene *bla_{KPC-2}*. Os círculos internos na cor magenta e amarelo indicam o conteúdo G+C. Em destaque a estrutura do Tn4401 onde está inserido o gene *bla_{KPC-2}*

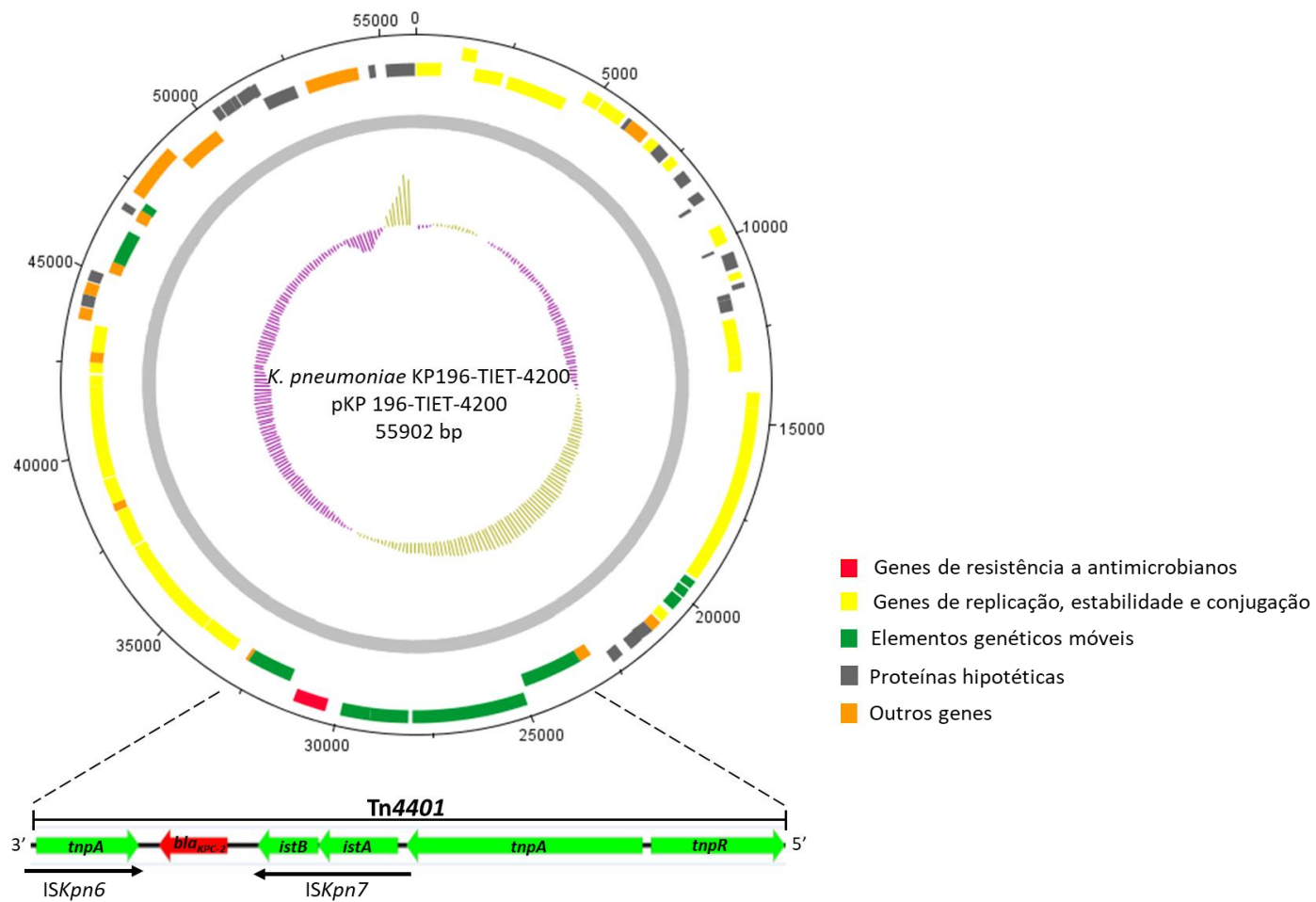


Figura 16 - Estrutura do plasmídeo IncN pKP196, TIET-4200 que carrega o gene *bla_{KPC-2}*. Os círculos internos na cor magenta e amarelo indicam o conteúdo G+C. Em destaque a estrutura do Tn4401 onde está inserido o gene *bla_{KPC-2}*.

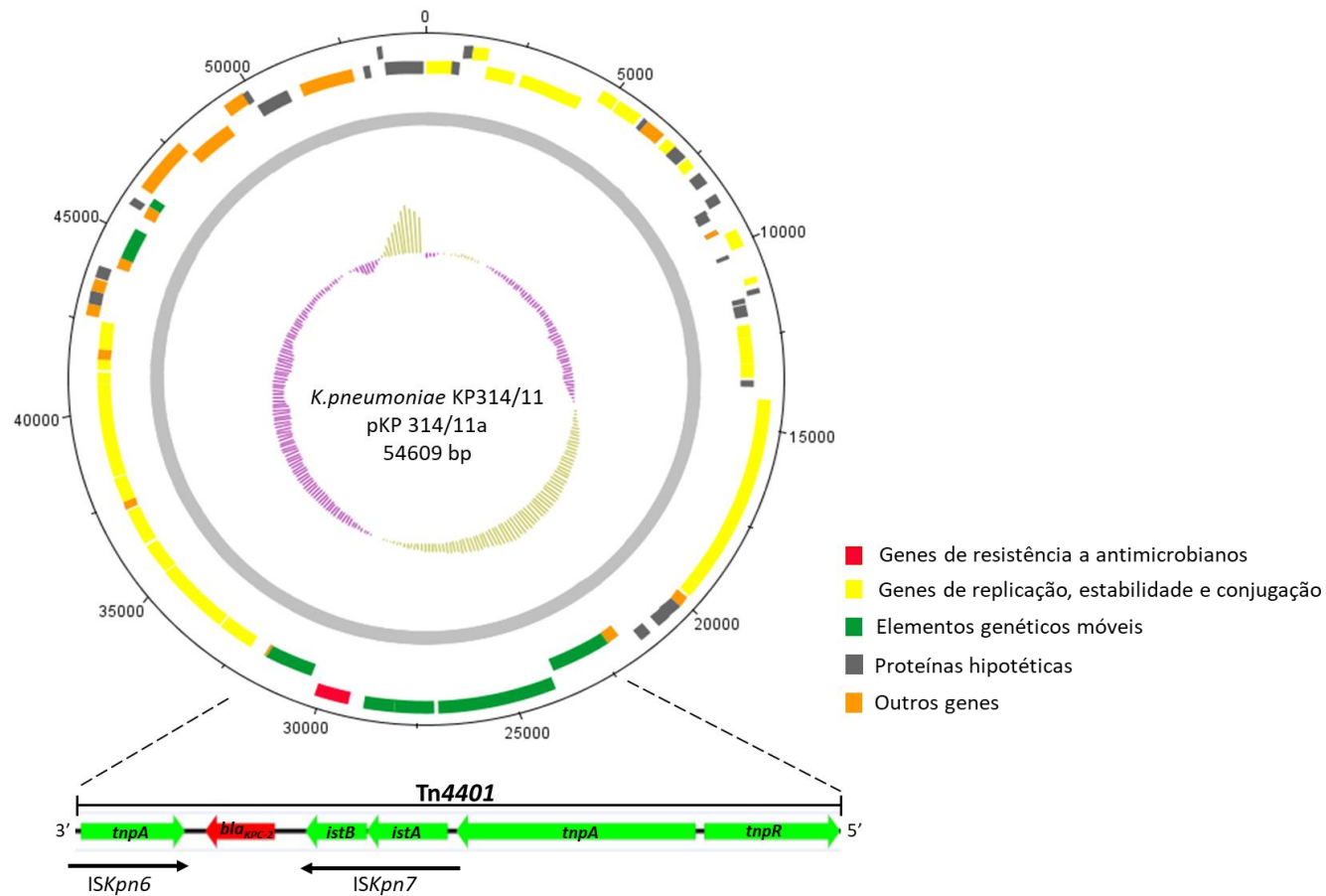


Figura 17 - Estrutura do plasmídeo IncN pKp314/11a que carrega o gene *bla_{KPC-2}*. Os círculos internos na cor magenta e amarelo indicam o conteúdo G+C. Em destaque a estrutura do Tn4401 onde está inserido o gene *bla_{KPC-2}*.

Com relação aos elementos móveis, os 3 plasmídeos contêm o Tn4401 isoforma b, composto pela *tnpR*, *tnpA*, IS*Kpn7* (formada pelos genes *istA* e *istB*), *bla_{KPC-2}* e IS*Kpn6* (formada por uma transposase). Também possuem a IS903B e a IS1, ambas compostas por uma transposase. O plasmídeo pKp196, TIET-4200 também possui a ISR1 formada pelos genes *insA* e *insB* e uma transposase. A comparação dos plasmídeos está demonstrada na Figura 18.

Foi realizada também uma análise da possível função das proteínas hipotéticas, visto que se pode observar pela Figura 18 que algumas das diferenças entre os plasmídeos está exatamente na presença ou ausência destas proteínas. No entanto, não foi possível identificar a função de grande parte delas. O plasmídeo pKp196, TIET-4200, possui 2 proteínas hipotéticas com função relacionada a recombinação de DNA em uma região divergente, que nos outros dois corresponde à região da proteína ResP, que tem função de DNA-invertase. O anexo 3 mostra todas as proteínas hipotéticas identificadas nos plasmídeos carreadores de *bla_{KPC-2}* das três cepas do estudo e sua possível função.

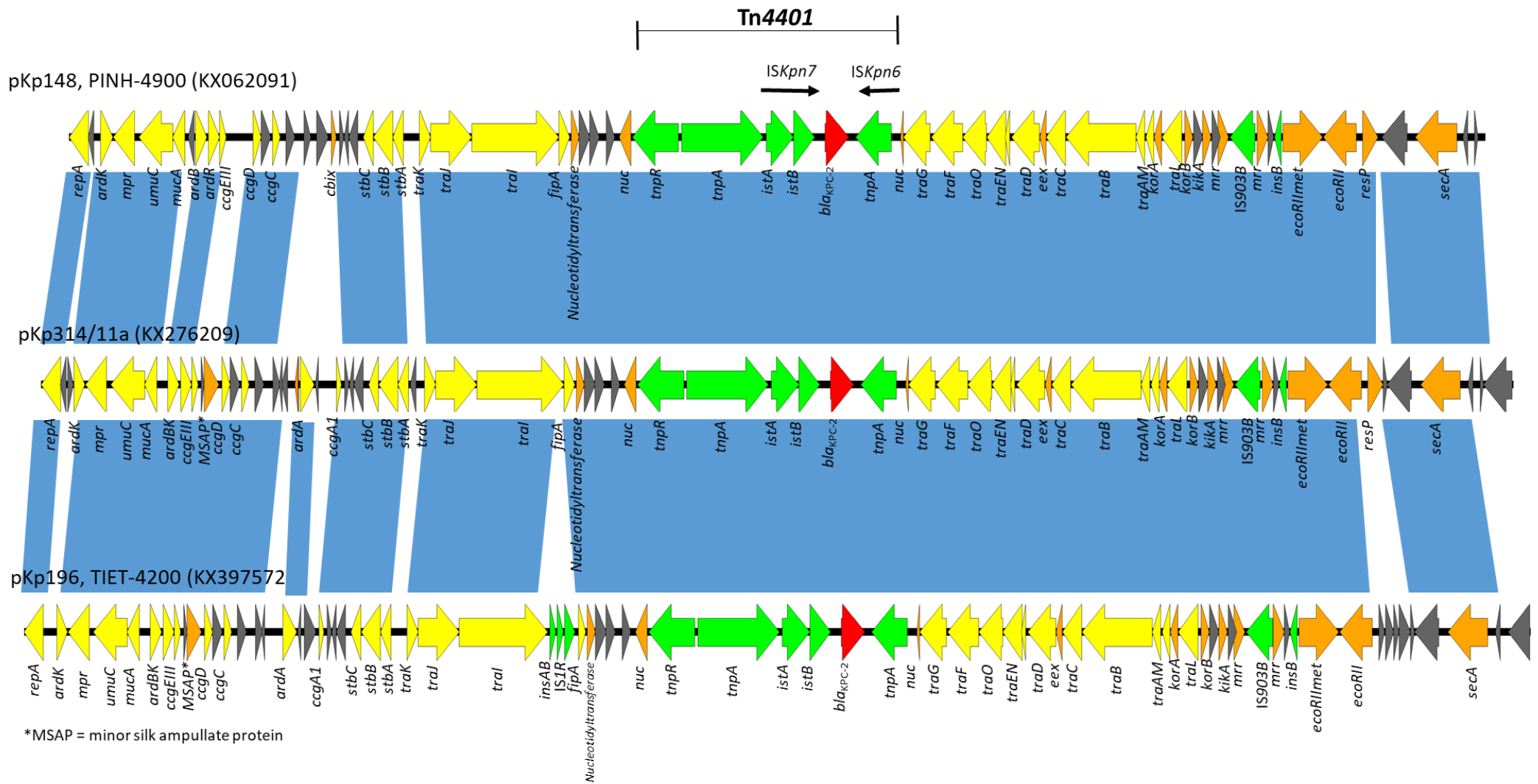


Figura 18 - Alinhamento dos 3 plasmídeos pKp148, PINH-4900(1), pKp196, TIET-4200 e pKp314/11a. As áreas sombreadas de azul indicam regiões com um alto grau de homologia. As ORFs estão representadas por flechas, coloridas de acordo com suas funções. Flechas amarelas indicam genes de transferência, estabilidade e acessórios da conjugação. As flechas vermelhas indicam os genes de resistência a antimicrobianos, flechas verdes representam os elementos móveis, flechas cinzas indicam genes que codificam proteínas hipotéticas com função desconhecida e flechas laranja indicam outros genes.

4.5 Teste de estabilidade plasmidial

O teste de estabilidade demonstrou que o plasmídeo que carrega o gene *bla*_{KPC-2} é estável, pois permaneceu na célula bacteriana mesmo após aproximadamente 100 gerações. A Figura 19 mostra a contagem de colônias nas placas com e sem ertapenem, é possível observar que a curva representada pelas placas com ertapenem (vermelha) está sempre muito próxima ou acima da curva das placas sem ertapenem (preta), demonstrando a manutenção do plasmídeo na célula e por consequência a resistência ao ertapenem.

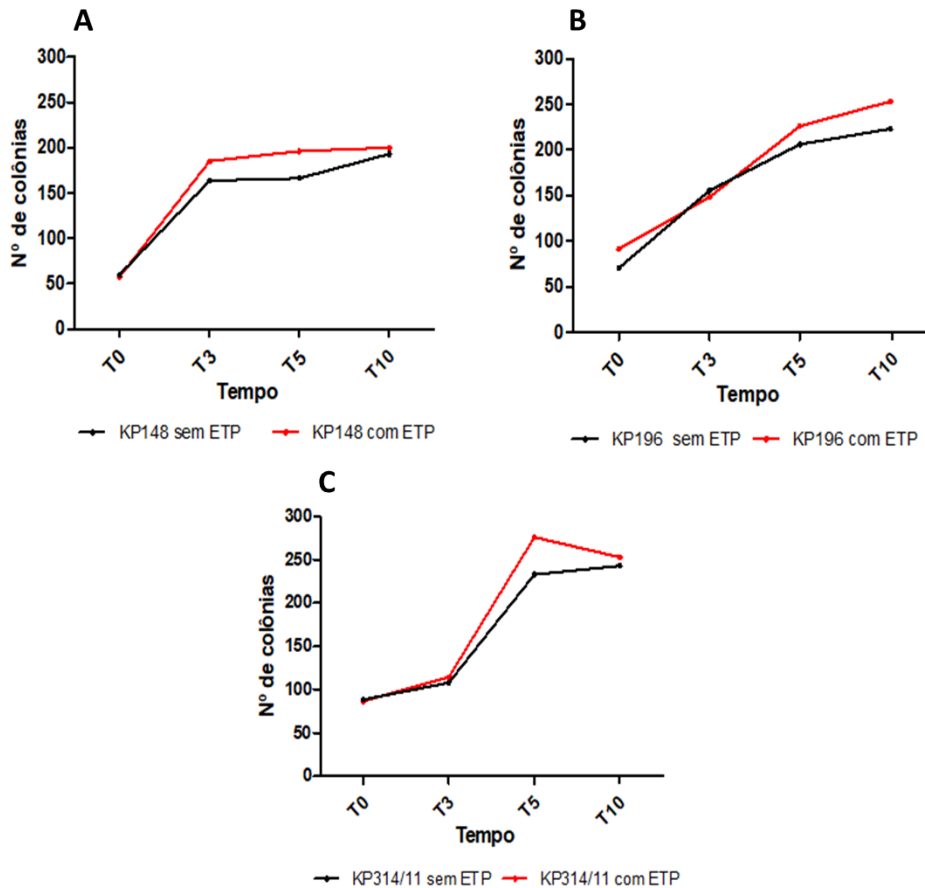


Figura 19 - Representação do número de colônias nas placas contendo meio de cultura com e sem ertapenem ao longo dos dias T0, T3, T5 e T10 na diluição 10^{-5} . A - cepa KP148, PINH-4900. B - cepa KP196, TIET-4200 e C - cepa KP314/11.

A Figura 20, mostra as 50 colônias re-semeadas nos tempos T0, T5 e T10. Foi possível observar que no tempo T10 houve 2 colônias (Kp148 colônia 26 e Kp196 colônia 33) que não cresceram na placa contendo ertapenem, indicando uma possível perda do plasmídeo que carrega o *bla*_{KPC-2} nas cepas KP148, PINH-4900 e KP196, TIET-4200, ambas isoladas de rio.

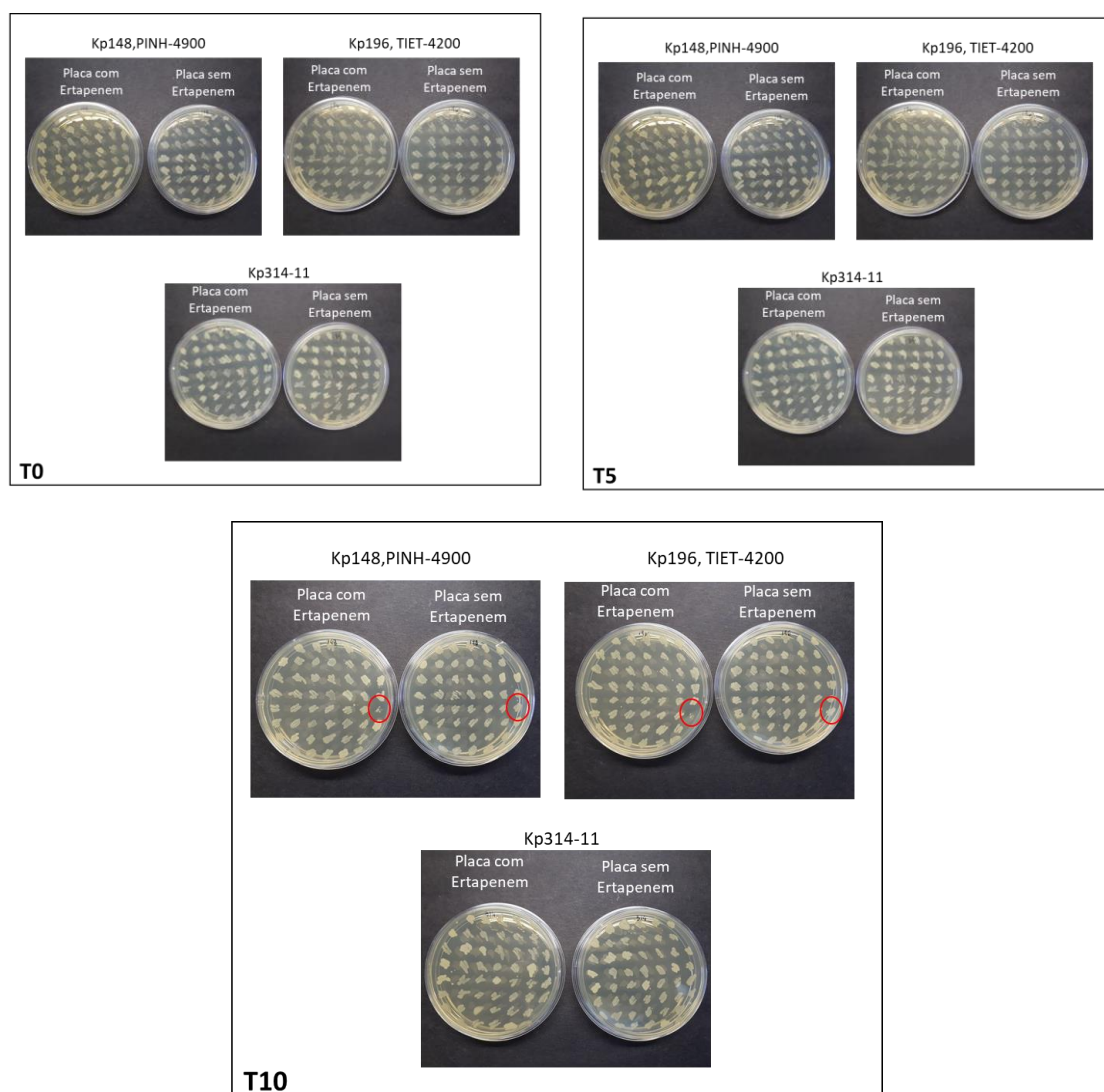


Figura 20 - Teste de estabilidade plasmidial. 50 colônias de cada isolado foram re-semeadas em placas com e sem ertapenem para verificação da presença ou não do plasmídeo que carrega *bla*_{KPC-2} nos tempos T0, T5 e T10. No tempo T10, o círculo vermelho destaca a possível perda do gene.

A perda do gene *bla*_{KPC-2} foi confirmada por PCR e foi realizada provas bioquímicas e PCR para o gene *bla*_{SHV} para confirmar identificação como *K. pneumoniae* (Figuras 21 e 22).

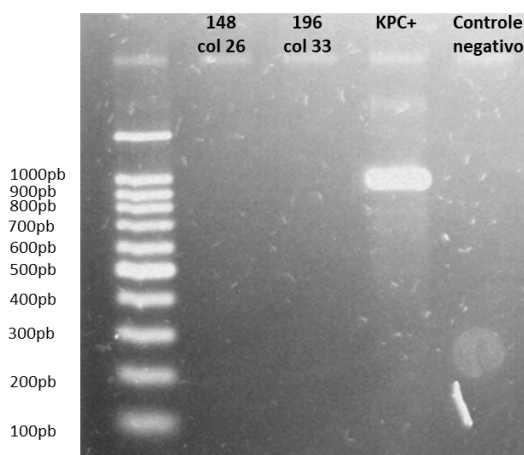


Figura 21 – PCR confirmando a ausência do *bla*_{KPC-2} nas colônias 26 da cepa Kp148-PINH,4900 e 33 da cepa Kp196-TIET,4200 da placa sem ertapenem do tempo T10.

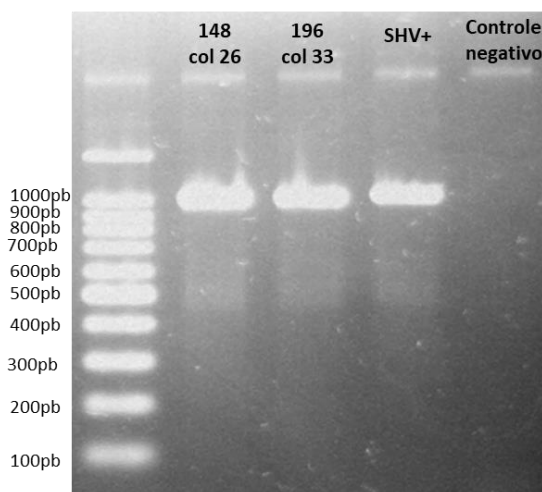


Figura 22 - PCR confirmando a presença do *bla*_{SHV} nas colônias 26 da cepa Kp148-PINH,4900 e 33 da cepa Kp196-TIET,4200 da placa sem ertapenem do tempo T10.

Após análise de PFGE e S1-PFGE (Figura 23) destas colônias, foram identificadas diferenças que indicam uma possível contaminação por outra *K. pneumoniae*.

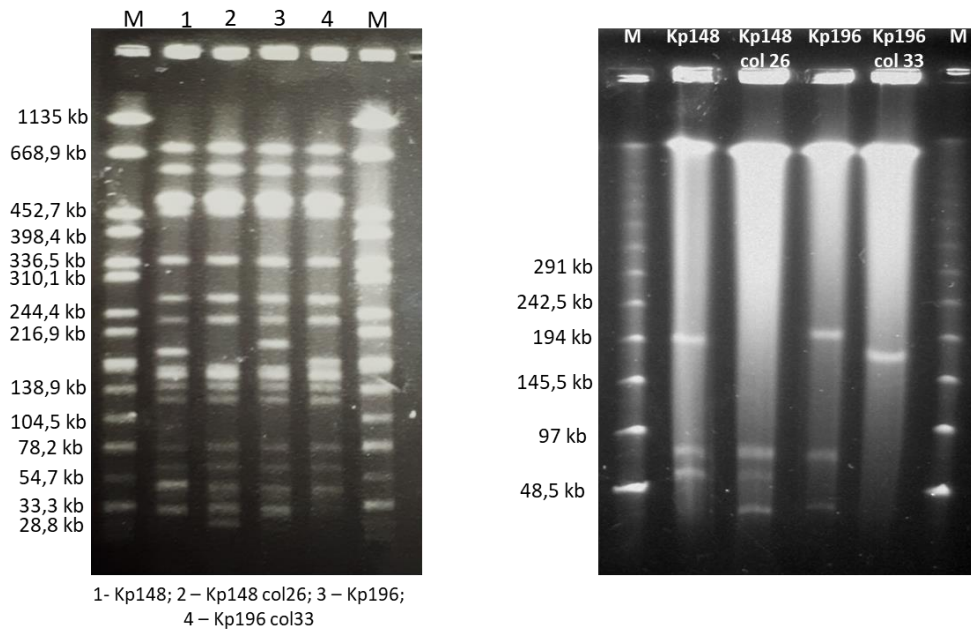


Figura 23 – PFGE com a enzima *Xba*I e S1-nuclease PFGE das cepas Kp148 e Kp196 e das respectivas colônias Kp148 colônia 26 e Kp196 colônia 33.

4.6 Análise do ambiente genético dos plasmídeos carreadores do *bla*_{CTX-M-15}

Não foi possível realizar a montagem completa do plasmídeo carreador do gene *bla*_{CTX-M-15}, pois os contigs apresentavam muitas seqüências de inserção, principalmente IS26, e devido a estas várias regiões de repetição, ficaram alguns *gaps* grandes impossibilitando a circularização do plasmídeo, devido a metodologia utilizada. O ambiente genético do *bla*_{CTX-M-15} foi recuperado a partir do sequenciamento do DNA total das cepas do estudo.

O *bla*_{CTX-M-15} das três cepas do estudo está flanqueado por uma cópia truncada da *ISEcp1* 48 pb a montante do gene *bla*_{CTX-M-15} e a proteína

WbuC, de função desconhecida, a jusante, seguido por uma transposase Tn2 truncada em ambos os lados. Este arranjo $\Delta IS_{Ecp1}-bla_{CTX-M-15}-wbuC-\Delta tnpA$ está flanqueado por duas cópias completas da IS26. Após a segunda cópia da IS26 vem um região de multirresistência composta pelos genes *aac(6')-Ib-cr*, *bla_{OXA-1}* e *catB4*, essa região está também flanqueada por duas cópias de IS26, sendo que a última cópia de IS26 se sobrepõe ao *catB4* em 107 pb, conforme mostra a Figura 24. Foi realizada também a técnica de hibridização com sonda marcada para o *bla_{CTX-M-15}* para determinação de qual era o plasmídeo carreador deste gene. No entanto não foi possível obter a visualização das bandas na membrana.

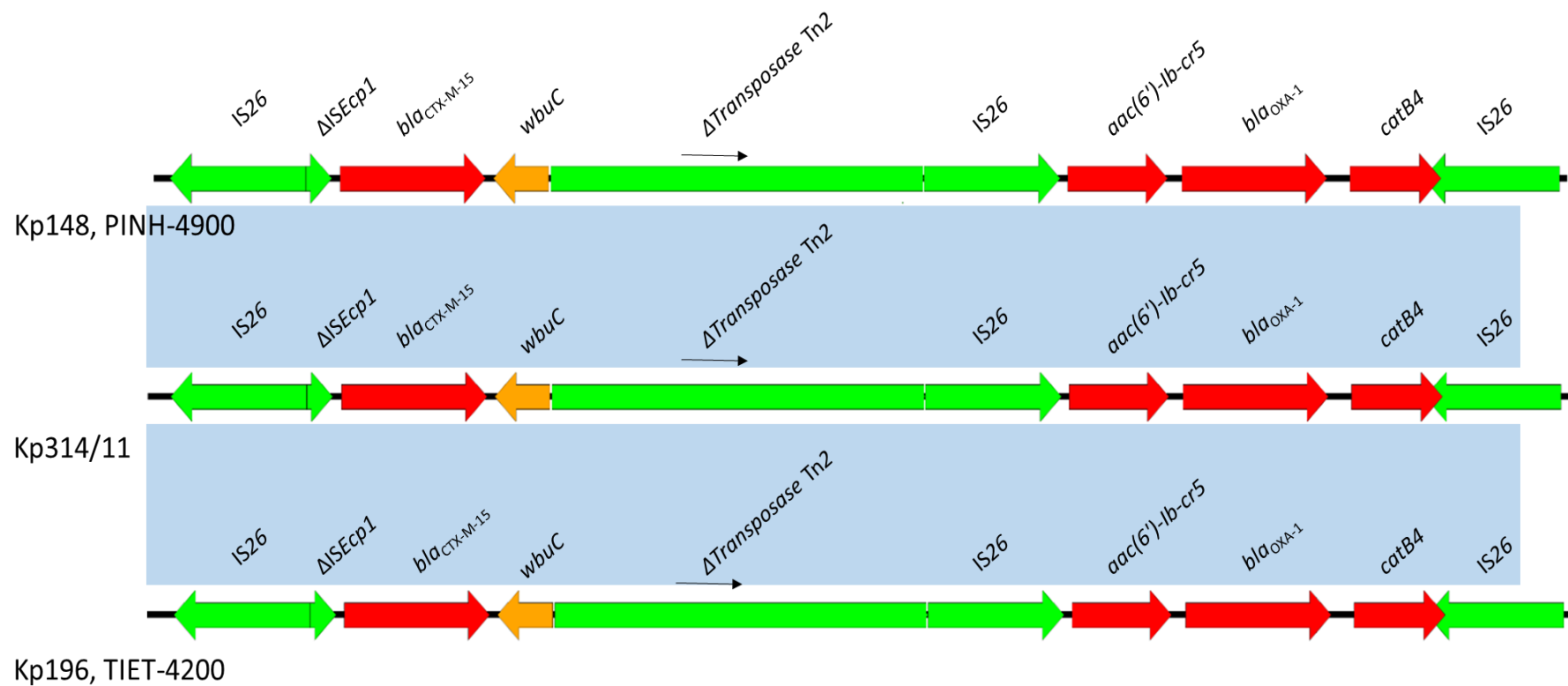


Figura 24 - Alinhamento do ambiente genético do *bla*_{CTX-M-15} das três cepas KP148, PINH-4900, KP196, TIET-4200 e Kp314/11. As áreas sombreadas de azul indicam regiões com um alto grau de homologia. As ORFs estão representadas por flechas, coloridas de acordo com suas funções. As flechas vermelhas indicam os genes de resistência, flechas verdes representam os elementos móveis e flechas laranja indicam genes com outras funções.

Foi realizada também comparação do ambiente genético do *bla*_{CTX-M-15} da cepa Kp314/11 com outros ambientes genéticos descritos em cepas brasileiras isoladas de fontes animais, vegetais e ambientais. Foram selecionadas, pelo banco de dados do Genbank, as seguintes cepas para comparação: *K. pneumoniae* RUC232 isolada de rúcula (MG84173), *E. coli* REP215 isolada de repolho (MG844172), *K. pneumoniae* 606B (LYMZ01000041) e *E. coli* 181 (KX452374) isoladas de porco e *K. pneumoniae* FSP1271/09 (KT001476) e *E. coli* FSP1314/09 (KT001477) isoladas de estação de tratamento de esgoto. Foi possível observar que a *ISEcp1* estava 48 pb a montante do *bla*_{CTX-M-15} em todos os ambientes genéticos analisados. Não foi possível analisar a presença da IS26 e da *tnpA* do Tn2 em todos os arranjos devido a falta desta informação nos depósitos. A Figura 25 mostra essa comparação.

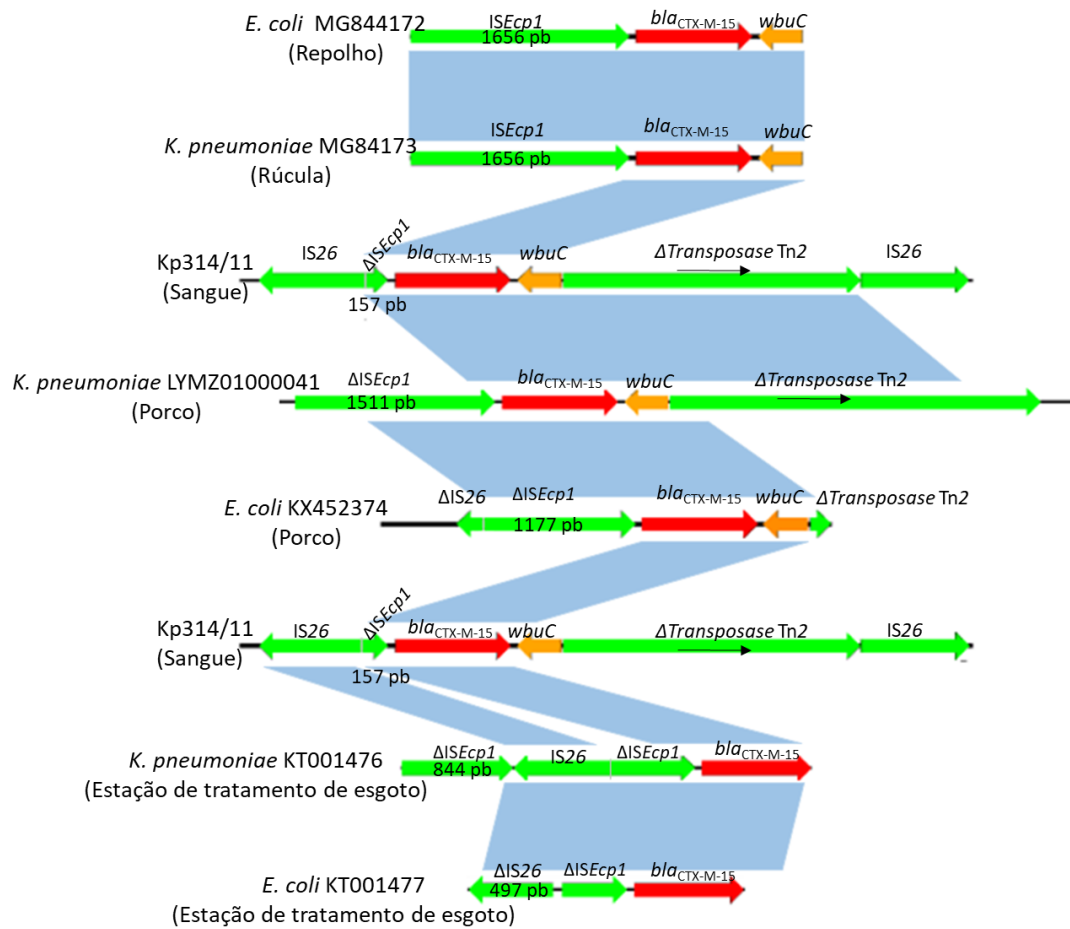


Figura 25 - Alinhamento do ambiente genético do *bla*_{CTX-M-15} da cepa Kp314/11 com outros ambientes genéticos descritos no Brasil. As áreas sombreadas de azul indicam regiões com um alto grau de homologia. As ORFs estão representadas por flechas, coloridas de acordo com suas funções. As flechas vermelhas indicam os genes de resistência, flechas verdes representam os elementos móveis e flechas laranja indicam genes com outras funções.

4.7 Análise do genoma

O MLST das amostras foi confirmado como ST437 pelo MLSTFinder e o tipo capsular foi confirmado como KL36 pelo site do Instituto Pasteur.

A anotação do genoma da cepa KP148, PINH-4900 resultou em 5.549 genes codificadores de proteína, 121 genes codificadores de RNA (81 tRNAs, 28 rRNAs e 12 ncRNAs) e 159 pseudogenes. A cepa KP196, TIET-4200 teve como resultado 5.506 genes codificadores de proteínas, 121 genes codificadores de RNA (80 tRNAs, 29 rRNAs e 12 ncRNAs) e 154 pseudogenes, enquanto que a cepa clínica Kp314/11 apresentou 5.525 genes codificadores de proteína, 75 genes codificadores de RNA (59 tRNAs, 3 rRNAs e 13 ncRNAs) e 272 pseudogenes. A Tabela 8 apresenta os dados gerais do sequenciamento das amostras.

Tabela 8 - Número de reads, cobertura, contigs gerados, tamanho (pb), conteúdo GC e número de acesso das cepas de *Klebsiella pneumoniae* sequenciadas.

Cepa	Reads	Cobertura	Contigs gerados	Tamanho (pb)	Conteúdo GC	Número de acesso
Kp148, PINH-4900	1.463.504	78	53	5.464.058	57,4	LZCY00000000
Kp196, TIET-4200	1.024.364	54	95	5.437.723	57,4	LZCZ00000000
Kp314/11	11.865.174	635,6	375	5.319.218	57.3	MAOP00000000

As 3 cepas analisadas apresentaram resistência a diversas classes de antimicrobianos, sendo consideradas XDR. Além da produção de KPC e CTX-M-15 foram identificados diversos outros genes responsáveis pela resistência aos antimicrobianos e também mutações cromossômicas. É importante destacar que o perfil dos genes de resistência aos antimicrobianos observados é praticamente igual, mudando apenas alguns genes, conforme Tabela 9, que mostra os genes de resistência aos

antimicrobianos identificados pelo ResFinder e as mutações em genes cromossomais que levam à resistência aos antimicrobianos.

Tabela 9 - Identificação dos genes de resistência aos antimicrobianos observados através da ferramenta Resfinder e mutações cromossomais das cepas de *Klebsiella pneumoniae* sequenciadas.

Classe de antimicrobianos	Kp148, PINH-4900	Kp196, TIET-4200	Kp314/11
Aminoglicosídeos	<i>aph(3')-Ia</i> , <i>aac(6')Ib-cr</i>	<i>aph(3')-Ia</i> , <i>aac(6')Ib-cr</i>	<i>aac(6')Ib-cr</i> e <i>aadA2</i>
Betalactâmicos	<i>bla_{OXA-1}</i> , <i>bla_{SHV-11}</i> , <i>bla_{CTX-M-15}</i> e <i>bla_{KPC-2}</i>	<i>bla_{OXA-1}</i> , <i>bla_{SHV-11}</i> , <i>bla_{CTX-M-15}</i> e <i>bla_{KPC-2}</i>	<i>bla_{OXA-1}</i> , <i>bla_{SHV-11}</i> , <i>bla_{CTX-M-15}</i> , e <i>bla_{KPC-2}</i>
Fluorquinolonas	<i>aac(6')Ib-cr</i> , <i>oqxA</i> , <i>oqxB</i> , mutação <i>gyrA</i> e <i>parC</i>	<i>aac(6')Ib-cr</i> , <i>oqxA</i> , <i>oqxB</i> mutação <i>gyrA</i> e <i>parC</i>	<i>aac(6')Ib-cr</i> , <i>oqxA</i> , <i>oqxB</i> , mutação <i>gyrA</i> e <i>parC</i>
Fosfomicina	<i>fosA^{KP}</i>	<i>fosA^{KP}</i>	<i>fosA^{KP}</i>
Macrolídeos	<i>mph(A)</i>	<i>mph(A)</i>	<i>mph(A)</i>
Fenicol	<i>catA1</i> e <i>catB4</i>	<i>catB4</i>	<i>catB4</i>
Sulfonamidas	<i>sul1</i>	<i>sul1</i>	<i>sul1</i>
Tetraciclinas	<i>tet(A)</i>	-	<i>tet(A)</i>
Polimixina B	<i>mgrB</i> truncado	-	-
Trimetoprim	<i>dfrA30</i>	<i>dfrA30</i>	<i>dfrA30</i>

Foi identificada uma mutação nos genes *gyrA* e *parC*, houve troca da Tirosina pela Isoleucina no códon 83 no *gyrA* e troca da Serina pela Isoleucina no códon 80 no *parC*. A comparação das cepas do estudo com a cepa *K. pneumoniae* MGM75878, que não possui mutação nesses genes, foi feita pelo clustal Omega e está demonstrada no anexo 5.

A resistência à polimixina B na cepa KP148, TIET-4900 é devido a um evento de inserção que truncou o gene *mgrB*. A Figura 26, mostra o ambiente genético do *mgrB* das cepas do estudo e a inserção da *ISEc11* que truncou o *mrgB*, restando apenas 40pb na porção 3' do gene *mgrB* o que levou à resistência em alto nível para polimixina B (32 µg/mL).

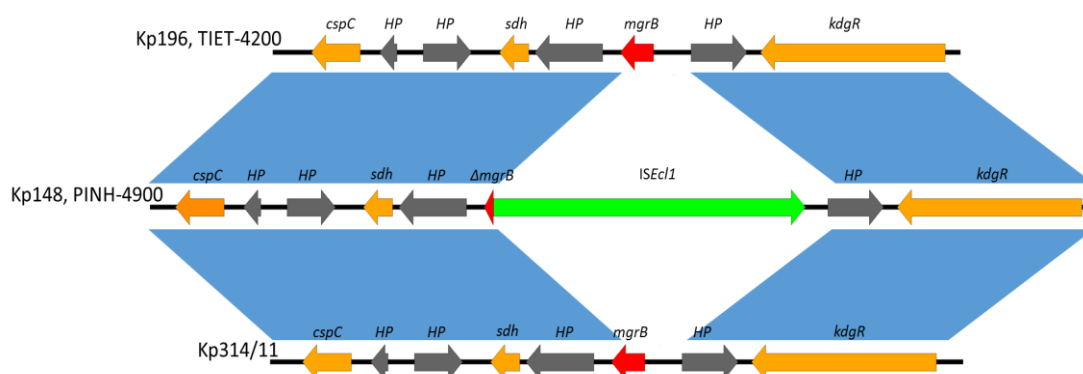


Figura 26 - Alinhamento do ambiente genético do *mgrB* das três cepas do estudo KP148, PINH-4900, KP196, TIET-4200 e Kp314/11. As áreas sombreadas de azul indicam regiões com um alto grau de homologia. As ORFs estão representadas por flechas, coloridas de acordo com suas funções. Flechas vermelhas indicam o *mgrB*, flechas verdes indicam elementos móveis, flechas cinzas indicam genes que codificam proteínas hipotéticas com função desconhecida e flechas laranja indicam outros genes.

Embora o Resfinder tenha identificado o gene *fosA*, a porcentagem de identidade foi de 99,27% para as três cepas do estudo. Foi feita então, uma análise mais detalhada da sequência do gene e comparada com as sequências já depositadas, e após comparação, este gene foi identificado na verdade como *fosA^{KP}*, mais semelhante com o *fosA6*, conforme mostra a Figura 27.

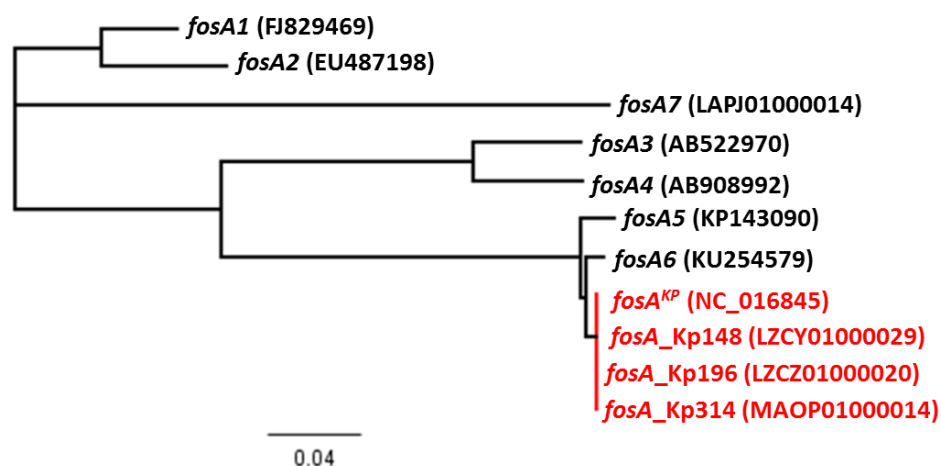


Figura 27 – Árvore construída com o software Geneious utilizando-se o método de neighbor-joining para comparação das sequências de *fosA* depositadas no Genbank. Entre parênteses está o número de acesso de cada isolado.

A identificação dos genes de resistência a metais pesados, virulência e sistema de efluxo reforçaram a similaridade desses 3 isolados, que apresentaram os mesmos genes, exceto por uma diferença no gene *mrkD* conforme Tabela 10.

Tabela 10 - Identificação dos genes do sistema de efluxo, resistência a metais e metais pesados, Resistência a desinfetantes, antissépticos e compostos de amônio quaternário, porinas e virulência das cepas de *Klebsiella pneumoniae* sequenciadas.

Genes	Kp148, PINH-4900	Kp196, TIET-4200	Kp314/11
Sistema de efluxo	<i>acrABR, envR, fis, marAR, oqxABR, rarA, rob, sdiA, soxRS</i>	<i>acrABR, envR, fis, marAR, oqxABR, rarA, rob, sdiA, soxRS</i>	<i>acrABR, envR, fis, marAR, oqxABR, rarA, rob, sdiA, soxRS</i>
Resistência a metais e metais pesados	<i>pcoABCDERS, silCRS, arsBHD, cadC, corA, nikABCDE, rcnAB, tehAB</i>	<i>pcoABCDERS, silCRS, arsBHDR, cadC, corA, nikABCDE, rcnAB, tehAB</i>	<i>pcoABCDERS, silCRS, arsBHDR, cadC, corA, nikABCDE, rcnAB, tehAB</i>
Resistência a desinfetantes, antissépticos e compostos de amônio quaternário	<i>mdtABCNO, qacAEEΔ1</i>	<i>mdtABCNO, qacAEEΔ1</i>	<i>mdtABCNO, qacAEEΔ1</i>
Porinas	<i>ompK35 e ompK36</i>	<i>ompK35 e ompK36</i>	<i>ompK35 e ompK36</i>
Virulência	<i>mrkABCD*FHIJ</i>	<i>mrkABCD*FHIJ</i>	<i>mrkABCDFHIJ</i>

pco: resistência ao cobre; *sil*: resistência à prata; *ars*: resistência ao arsênio; *cad*: resistência ao cádmio; *cor*: resistência ao magnésio, cobalto, níquel e manganês; *nik*: resistência ao níquel; *rcn*: resistência ao cobalto e níquel; *teh*: resistência ao telurito; *mdt*: resistência a SDS, deoxicolato e benzalbônio; *qac*: resistência aos compostos de amônios quaternários; *mrk*: formação de biofilme. * Mutações no gene *mrkD*

Uma análise mais detalhada das sequências do gene *mrkD* revelou que as cepas KP148, PINH-4900 e KP196, TIET-4200 possuem o *mrkD*, no entanto, há uma troca de nucleotídeo G→T na posição 326 no isolado KP148, PINH-4900 e uma troca de G→A na posição 326 no isolado KP196, TIET-4200 o que levou a alteração 109(Gly→Val) no isolado KP148, PINH-4900 e 109 (Gly→Asp) no isolado KP196, TIET-4200. A Figura 28 mostra o ambiente genético do *mrkD* nas três cepas do estudo. No anexo 6 pode-se observar a comparação feita pelo clustal Omega da sequência de nucleotídeos e de proteínas do *mrkD* nos isolados do estudo.

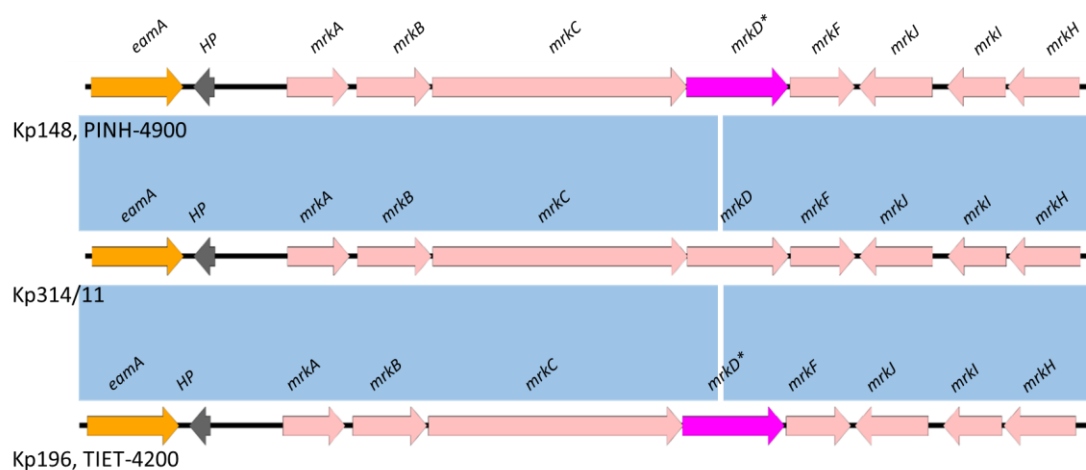


Figura 28 - Alinhamento do ambiente genético do *mrkD* das três cepas do estudo KP148, PINH-4900, KP196, TIET-4200 e Kp314/11. As áreas sombreadas de azul indicam regiões com um alto grau de homologia. As ORFs estão representadas por flechas, coloridas de acordo com suas funções. Flechas rosas indicam genes de virulência, flechas magentas indicam mutação no *mrkD*, flechas cinzas indicam genes que codificam proteínas hipotéticas com função desconhecida e flechas laranja indicam outros genes.

A identificação da presença de plasmídeos pelo PlasmidFinder também demonstrou como a composição gênica dessas amostras são parecidas, elas apresentaram os mesmos grupos de incompatibilidade. A Tabela 11 apresenta os grupos de incompatibilidade (Inc type) dos plasmídeos observados nas amostras.

Tabela 11 – Grupos de incompatibilidade (Inc) observados nas amostras de *Klebsiella pneumoniae* sequenciadas

Cepa	Grupos de incompatibilidade
Kp148, PINH-4900	IncFIB(pQil), IncFII(K), IncFIB(K) e IncN
Kp196, TIET-4200	IncFIB(pQil), IncFII(K), IncFIB(K) e IncN
Kp314/11	IncFIB(pQil), IncFII(K), IncFIB(K) e IncN

A análise completa dos genomas mostrou uma grande similaridade. Fazendo-se uma comparação geral, eles podem ser considerados similares. A Figura 29, reúne todas as informações em relação aos genes procurados nos bancos de dados. A Figura 30, mostra a comparação dos três genomas em relação a cepa *Klebsiella pneumoniae* 30684NJST258_2, indicada para comparações do Complexo Clonal 258. As falhas nos círculos dos isolados do estudo indicam as diferenças em relação à referência, sendo assim as três cepas do estudo apresentam as mesmas diferenças em relação a referência exceto pela falha por volta dos 4000 kb que existe apenas no isolado KP314/11.

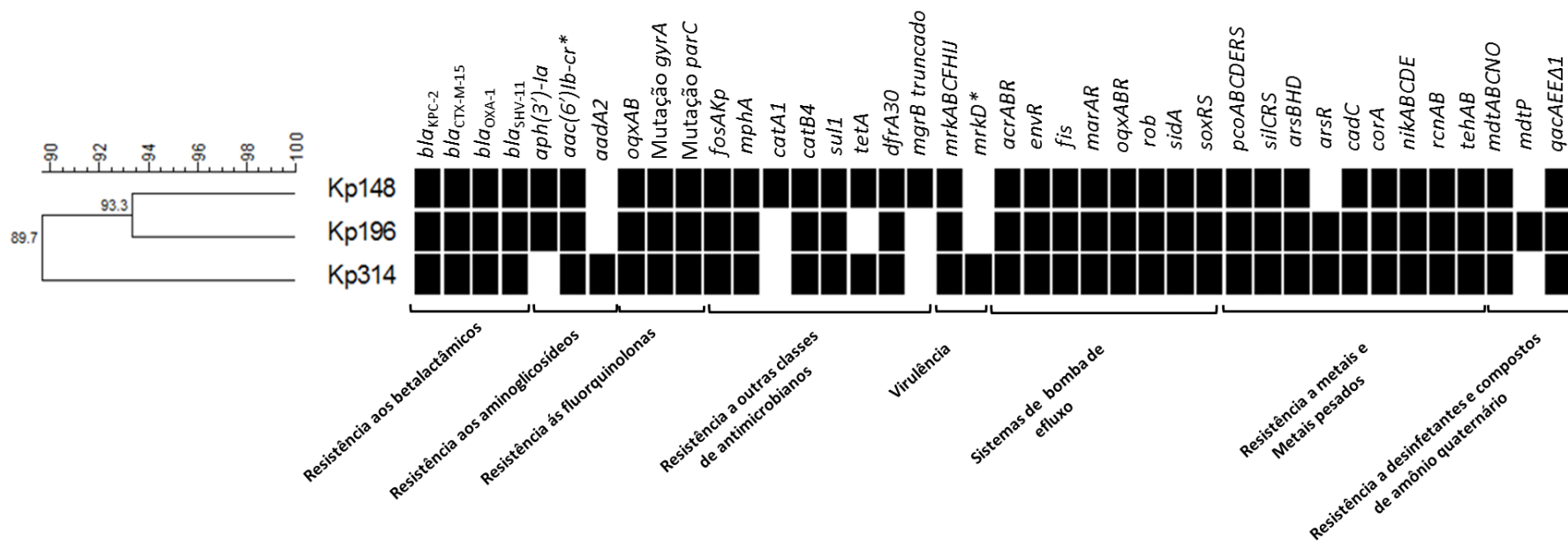


Figura 29 – Comparação das três cepas do estudo em relação à composição gênica referente a resistência à antimicrobianos, virulência, sistemas de efluxo, resistência a metais e metais pesados, resistência a desinfetantes e composto Qac. O retângulo preto indica presença do gene e o espaço em branco indica ausência do gene. * Indica ausência do *mrkD* devido a mutação. O dendrograma representa a similaridade dos isolados pela técnica de PFGE, conforme já demonstrado.

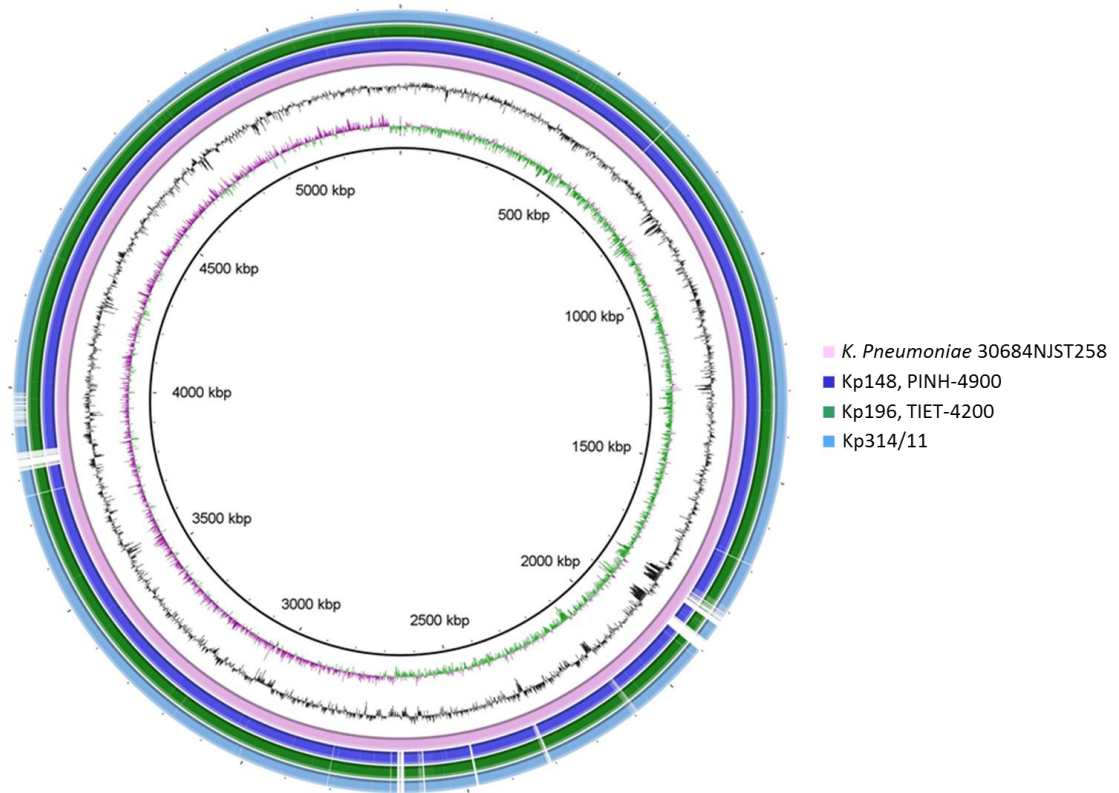


Figura 30 – Comparação feita pelo BRIG (Blast Ring) do genoma das três cepas do estudo com a *Klebsiella pneumoniae* 30684NJST258_2. De dentro para fora estão representados o conteúdo GC nos 2 primeiros círculos, a cepa de referência 30684NJST258_2 representada pelo círculo rosa, KP148, PINH-4900 pelo círculo azul escuro, KP196, TIET-4200 pelo círculo verde e Kp314/11 pelo círculo azul claro.

5 DISCUSSÃO

Convencionalmente, a luta contra o desenvolvimento e disseminação da resistência aos antimicrobianos esteve mais focada nos cenários hospitalar e de comunidade. No entanto, recentemente, o meio ambiente também foi colocado como fonte e rota de disseminação da resistência aos antimicrobianos (Martinez, 2008; Wright, 2010).

A OMS propôs uma estratégia para o combate à resistência aos antimicrobianos chamada “One-Health” (Saúde Única), que consiste em uma abordagem para projetar e implementar programas, políticas, legislação e pesquisa em que vários setores se comunicam e trabalham juntos para alcançar melhores resultados de saúde pública (WHO, 2017). Aumentar o conhecimento sobre os fatores ambientais que conduzem a resistência pode nos permitir construir modelos de como a resistência surge e se dissemina (Bengtsson-Palme et al., 2018). Sendo assim, é importante conhecer o que está circulando tanto no ambiente hospitalar como no meio ambiente e entender como funciona essa dinâmica hospital - meio ambiente.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram uma grande semelhança entre o isolado clínico e os isolados do meio ambiente. Os dados do PFGE agruparam as cepas no mesmo clone, as duas cepas do rio apresentaram semelhança de 93,3% e a cepa clínica apresentou semelhança de 89,7% com as cepas do rio, e a quantidade de plasmídeos e os tamanhos desses plasmídeos observados pela S1-nuclease-PFGE também foram semelhantes. Com relação aos resultados da CIM, as três cepas foram consideradas XDR, pois apresentaram resistência a um ou mais antimicrobianos em quase todas as categorias (exceto uma ou duas) (Magiorakos et al, 2012). Cepas de *K. pneumoniae* XDR já foram relatadas em hospitais dos Estados Unidos (Krapp et al., 2018), Grécia (Bathoorn et al., 2016), China (Bi et al., 2016), Taiwan (Huang et al., 2018), Espanha (Hernández et al., 2018) e Brasil (Aires et al., 2017). No Brasil cepas de *K. pneumoniae* MDR foram relatadas em diversos tipos diferentes de água, tais como, água de lago (Nascimento et al, 2017), praia (Montezzi et al, 2014),

estação de tratamento de esgoto (Dropa et al, 2016), estação de tratamento de esgoto hospitalar (Prado et al., 2007) e rio (Oliveira et al., 2014).

As cepas deste estudo, foram caracterizadas como ST437, pertencentes ao CC258, prevalente mundialmente. Este complexo clonal é responsável por 68% dos surtos no mundo (Navon-Venezia et al., 2017). O ST437 é SLV (single locus variante) do ST258, assim como de outro importante ST do CC258, o ST11. A maioria dos membros do CC258 são XDR, devido aos seus múltiplos genes de resistência aos antimicrobianos (Navon-Venezia et al., 2017).

No Brasil, já foram identificados diversos STs. Andrade et al (2011) identificaram pela primeira vez o ST258, associado a um surto em Ribeirão Preto (SP), além disso, também encontraram os ST11 e ST437 em isolado de 2007 a 2009. No entanto, Seki et al (2011) descreveram o ST11 em isolados de 2006, o que mostra sua circulação aqui no Brasil antes mesmo do ST258 e mostraram predominância do ST437 em isolados do Rio de Janeiro. Em isolados de 2010, além dos ST11 e ST437, também foi descrito o ST340 que também é SLV do ST258 (Pereira et al, 2013). Os ST340 e ST437 também foram observados em água de rio na cidade de São Paulo (Oliveira et al, 2014) mostrando a disseminação de um mesmo complexo clonal (CC258) composto pelos ST (11, 258, 437, 340) dentro do Brasil.

Seki et al. (2011), relataram a predominância do ST437 em isolados do Rio de Janeiro. Dados ainda não publicados também mostram a predominância deste ST no Estado de São Paulo no período de 2009 a 2011, em que de 100 isolados clínicos não clonais, 73% pertenciam a este ST (Francisco, 2014).

O sucesso internacional de disseminação do ST258 não está totalmente esclarecido. DeLeo et al (2014) tentaram explicar este fato através do sequenciamento do genoma completo deste ST e comparando com outros STs, que resultou na descrição de uma região de divergência que incluía genes envolvidos na síntese de cápsula polissacarídica, esta região parecia estar relacionada com eventos de recombinação de DNA sugerindo que esta região contribuiria para o sucesso da *K. pneumoniae* ST258. Outro estudo

feito por Chmelnitsky et al (2013) compararam os genes presentes em *K. pneumoniae* pertencentes ao ST258 e também do CC258 com outros STs. Os autores identificaram um grupo de 17 genes únicos e ubíquos ao CC258 e outro grupo de 19 genes únicos ao ST258. A maioria das proteínas codificadas por esses genes pertence a dois grupos funcionais: motilidade e secreção celular e reparação e modificação do DNA. Sendo assim, eles sugeriram que estes genes podem estar relacionados com o grande sucesso da disseminação deste ST e dos STs presentes em seu complexo clonal.

Sequenciamento de genoma completo e dados de epidemiologia molecular revelaram que a disseminação global do ST258 ocorreu após a aquisição do plasmídeo carreador do *bla_{KPC}*. Cepas de *K. pneumoniae* ST258 foram relatadas com plasmídeos carreadores do *bla_{KPC-2}* em mais de 90% de todos os casos (Navon-Venezia et al., 2017).

Cepas carreadoras de *bla_{KPC}* têm sido relatadas em todos os continentes, sendo *bla_{KPC-2}* e *bla_{KPC-3}* os mais frequentes e altamente envolvidos em surtos hospitalares em muitos países (Mathers et al., 2015). Possíveis explicações para a rápida disseminação desse gene é a sua localização em uma grande variedade de plasmídeos variando em tamanho, natureza e estrutura. Além de seu contexto genético em associação com o elemento móvel Tn4401 que também contribui para a disseminação efetiva desse gene entre diferentes tipos de Enterobacteriaceae (Naas et al., 2008). Enterobacteriaceae com *bla_{KPC}* são frequentemente resistentes a múltiplas classes de antimicrobianos, tais como os aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e sulfametoxazol-trimetoprim. Os plasmídeos carreadores do *bla_{KPC-2}* das cepas deste estudo pertencem ao IncN. Estes resultados já foram observados no estudo de Navon-Venezia (2017), que correlacionaram o *bla_{KPC-2}* carreado por plasmídeos IncN, não somente em *K. pneumoniae*, como também em *E. coli* e *S. enterica*.

Plasmídeos pertencentes ao grupo de incompatibilidade IncN foram descritos como uma preocupação de saúde humana, pois foram detectados em amostras clínicas. No entanto, além disso, eles também foram encontrados em ambientes associados a animais, tais como estábulos ou

matadouros (Bortolaia et al., 2010), carne de porco (Johnson et al., 2007), porcos e trabalhadores de fazenda (Moodley e Guardabassi, 2009) e efluente de estação de tratamento de águas residuais (Eikmeyer et al., 2012). Plasmídeos IncN carregam genes que conferem resistência a uma variedade de antimicrobianos, especialmente carbapenêmicos e cefalosporinas de terceira geração (Eikmeyer et al., 2012). Já foram descritos em *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* e *E. coli* em todo o mundo, por exemplo, nos EUA (Gootz et al., 2009), China (Shen et al., 2008), Alemanha (Cullik et al., 2010), Espanha (Diestra et al. 2009; Novais et al., 2007), Itália (Bortolaia et al., 2010; Carattoli et al., 2010), Dinamarca (Moodley e Guardabassi, 2009) e Brasil (Pérez-Chaparro et al., 2014). Também já foram descritos plasmídeos IncN carreadores de NDM (Poirel et al., 2011). No Brasil, plasmídeo IncN carreador de *bla_{KPC}* foi relatado no Rio de Janeiro em *K. pneumoniae* ST437 (Andrade et al., 2011) e em *Enterobacter hormaechei* (Pereira et al., 2015).

Eikmeyer e colaboradores (2012), compararam diversos plasmídeos pertencentes ao IncN isolados de diferentes micro-organismos de diferentes fontes, tanto clínica como ambiental e animal. Eles observaram que plasmídeos IncN possuem a capacidade de carrear uma diversidade de genes que conferem resistência aos antimicrobianos. Esta enorme variedade de genes de resistência aos antimicrobianos conferidos pelos plasmídeos IncN demonstra que os plasmídeos desse grupo de incompatibilidade são vetores apropriados para incorporação de diferentes transposons, sequências de inserção e integrons com cassetes gênicos codificadores de genes de resistência aos antimicrobianos. Por conseguinte, os plasmídeos IncN devem ser considerados elementos importantes para a disseminação de genes de resistência a antimicrobianos clinicamente relevantes.

Os plasmídeos possuem um conjunto de genes comuns que desempenham funções na replicação, transferência conjugativa, estabilidade e controle do plasmídeo e são agrupados em módulos funcionais (Eikmeyer et al., 2012).

A replicação de plasmídeos IncN requer a proteína de replicação RepA. Foi mostrado que em plasmídeos IncN o *repA* interage com iterons localizados *upstream* e *downstream* do gene *repA* (Papp e Iyer, 1995). Todos os três plasmídeos sequenciados neste estudo possuem o gene *repA* com sequências nucleotídicas idênticas.

Os plasmídeos pKp148, PINH-4900, pKP196, TIET-4200 e pKp314/11a, possuem a mesma arquitetura plasmidial compreendida por 2 regiões envolvidas na transferência conjugativa de DNA plasmidial. A primeira é composta por 11 genes (*traGFOENDCBAML*) e suas proteínas representam componentes estruturais do pilus sexual, fatores envolvidos no processamento de subunidades e biogênese do pilus, componentes do canal localizado na membrana interna e externa e proteínas que têm como função fornecer energia para o processo de transporte de DNA, biogênese de pilus e dos componentes do canal (Eikmeyer et al., 2012). Também fazem parte dessa região, os genes reguladores *korA* e *korB* (Moré et al., 1996), o gene de exclusão de entrada *eex* (Pohlman et al., 1994), a endonuclease *nuc* (Pohlman et al., 1993) e o *kikA* (Hengen et al., 1992; Holcík e Iyer, 1996; Rodríguez et al., 1995). A segunda região possui três proteínas codificadas pelos genes *tral*, *traJ* e *traK* que têm como função replicação e transferência de DNA e o gene *fipA* localizado a jusante do *tral*, que tem função na inibição de plasmídeos IncP (Santini e Stanisich, 1998). Além dessas regiões, outros genes também foram comuns aos três plasmídeos, como a endonuclease *ecoRII*, os genes *stbABC* responsáveis pela estabilidade durante a conjugação (Paterson et al., 1999), os genes *mucA* e *umuC* que tem relação com a mutagenicidade (Clerch et al., 1996) e os genes *ardBKR* que formam um sistema de antirestrição de DNA (Belogurov et al., 1993). Essa estrutura plasmidial é comum entre os plasmídeos do grupo IncN, todos os plasmídeos IncN descritos no estudo de Eikmeyer e colaboradores (2012) possuem os mesmos genes descritos na estrutura dos plasmídeos deste estudo. Esses resultados nos levam a sugerir que, devido a diversidade das origens do plasmídeo IncN e aos vários genes de resistência identificados em plasmídeos IncN há a necessidade de

compreender a disseminação destes plasmídeos, que circulam entre domicílios particulares, clínicas, pecuária e, finalmente, estações de tratamento de águas residuais que coletam o esgoto de todos esses locais (Eykmeyer et al, 2012). Além disso, os plasmídeos IncN possuem uma estrutura conservada, com capacidade de adquirir diversos elementos móveis como transposons e IS carreadores de genes de resistência aos antimicrobianos assim como grande capacidade de disseminação para diversos hospedeiros em diversas fontes, sendo ela, clínica, animal ou ambiental.

O gene *bla_{KPC}* já foi relatado em diversos tipos de plasmídeos, como, IncF, IncI2, IncX, IncA/C, IncR (García-Fernández et al., 2012; Pitout et al., 2015; Navon-Venezia et al., 2017). Plasmídeos dos tipos IncR, IncN e IncX3 estão em um grande espectro de hospedeiros e são frequentemente associados com a transferência horizontal de *bla_{KPC}* por conjugação para outras Enterobacteriaceae (Navon-Venezia et al, 2017).

O *bla_{KPC-2}* das cepas deste estudo está flanqueado pelas *ISKpn7* a montante e *ISKpn6* a jusante, inserido em um Tn4401 isoforma b. O Tn4401 tem aproximadamente 10kb e é formado por uma resolvase, seguida por uma transposase, *ISKpn7*, *bla_{KPC-2}* e *ISKpn6*. Esse transposon já foi descrito em diversos tipos de plasmídeos que são, normalmente, conjugativos (Lee et al., 2016). Existem cinco isoformas do Tn4401, que variam de acordo com deleções (68-255pb) entre a *ISKpn7* e o *bla_{KPC}*, e estas isoformas, em alguns casos, estão relacionadas ao tipo de *bla_{KPC}* e ao tipo de plasmídeo. A isoforma *a* está relacionada ao *bla_{KPC-3}* carreado por plasmídeos IncFII_{k2} (Leavitt et al., 2010; Garcia-Fernandez et al., 2012; Chen et al., 2014b), a isoforma *b* está associada a plasmídeos IncN e a isoforma *d* a plasmídeos IncFIA (Chen et al., 2013; Chen et al., 2014a,c). O *bla_{KPC}* já foi descrito em outros contextos genéticos chamados de não-Tn4401 e geralmente tem sequências parciais da *ISKpn6* (Shen et al., 2009).

Neste estudo, foi realizado também o teste de estabilidade do plasmídeo carreador do *bla_{KPC-2}*, e o plasmídeo se manteve estável na célula bacteriana mesmo após aproximadamente 100 gerações. Nossos resultados

corroboram o estudo de Di Luca e colaboradores (2017), que analisaram a estabilidade e o custo biológico para manutenção de plasmídeos carreadores de carbapenemases em *E. coli*. No estudo de Di Luca et al (2017), o plasmídeo carreador do *bla*_{KPC-2} se manteve estável mesmo após aproximadamente 312 gerações e o custo biológico para manutenção do mesmo foi considerado de baixo a moderado. Adicionando-se a estabilidade e o baixo custo biológico ao fato deste plasmídeo ser facilmente transferido horizontalmente para outras espécies bacterianas, estes resultados são preocupantes, pois podem indicar um grande potencial para uma maior disseminação e estabelecimento do plasmídeo carreador do *bla*_{KPC-2} não somente em *K. pneumoniae* como em outras Enterobacteriaceae, e no caso do nosso estudo, não ficar restrito somente ao ambiente hospitalar, e também se disseminar para o meio ambiente.

Além do baixo custo energético, outros fatores podem influenciar na estabilidade e manutenção do plasmídeo. Cottell e colaboradores (2014), analisaram seis fatores que poderiam contribuir para o sucesso do plasmídeo pCT carreador do *bla*_{CTX-M-14}: uma região codificadora de um sistema toxina-antitoxina (*pndACB*), operons envolvidos na conjugação (locus *tra* e *pil*), gene de recombinase (*rci*), fator sigma 70 e um gene envolvido na divisão plasmidial (*parB*). A inativação do *bla*_{CTX-M-14} não teve efeito no plasmídeo ou no hospedeiro na ausência de pressão seletiva pelo antimicrobiano e nenhum dos fatores estudados alteraram a estabilidade do plasmídeo. Eles concluíram que o sucesso de um plasmídeo não está apenas em um fator, e sim na combinação de diversos fatores como uma conjugação eficiente, permitindo uma maior disseminação para outras espécies e a estabilidade em diversos hospedeiros (devido, em parte, à presença de numerosos genes envolvidos na estabilidade do plasmídeo). Outra questão levantada por eles é devido ao fato de que a redução da pressão seletiva por antimicrobianos, nem sempre reduzirá o número de bactérias transportando esses plasmídeos carreadores de genes de resistência aos antimicrobianos e a reexposição aos antimicrobianos provavelmente pode amplificar o número de cepas resistentes. O estudo de

Stevenson et al (2017), analisou como a frequência de pulsos positivos de seleção afetava a dinâmica de plasmídeos resistentes a mercúrio e seus resultados sugeriram que variações temporais no ambiente de seleção, como aqueles criados durante o tratamento com antimicrobianos, podem ajudar a explicar a estabilidade de plasmídeos carreadores de resistência aos antimicrobianos.

Não foi possível montar todo o plasmídeo carreador do *bla*_{CTX-M-15}. Esta dificuldade na montagem de plasmídeos foi devida ao tipo de sequenciamento utilizado de “short reads”, pois outras tecnologias como o PacBio RS II single-molecule real-time (SMRT) e o MinION possibilitam o sequenciamento de reads muito maiores que diminuem o problema das regiões de repetição (Rhoads et al., 20115; Lu et al., 2016).

O *bla*_{CTX-M-15} é carregado, na sua maioria, por plasmídeos IncF e geralmente está associado a outros genes de resistência. A causa da disseminação do *bla*_{CTX-M-15} pode ser devida à forte associação de plasmídeos IncF com *E. coli* ST131 que está globalmente disseminado (Carattoli, 2009; Livermore, 2012).

A análise dos contigs pertencentes ao plasmídeo carreador do *bla*_{CTX-M-15} aliada com a análise do gel de S1-PFGE das cepas deste estudo indicam que ele pertence ao IncFIB, estes resultados concordam com o descrito na literatura (Carattoli, 2009; Livermore, 2012; Zurfluh et al., 2015). Já foram descritos plasmídeos carreadores do *bla*_{CTX-M-15} com multireplicons, no estudo de Zurfluh e colaboradores (2015), a maioria dos plasmídeos carreadores de *bla*_{CTX-M-15} eram IncF, com uma combinação de multireplicons dos tipos IncFII, IncFIA e IncFIB.

Diferentes elementos genéticos estão envolvidos na aquisição do *bla*_{CTX-M}, incluindo sequências de inserção *ISCR1* e *ISEcp1* e elementos relacionados a fagos (Poirel et al., 2008). A *ISEcp1*, está associada com as enzimas do grupo CTX-M-1, CTX-M-2 e CTX-M-9 e atuam como potentes promotoras para uma super-expressão do *bla*_{CTX-M} (Poirel et al., 2008; Mathers et al., 2015).

O ambiente genético de *bla*_{CTX-M-15} normalmente consiste em uma *ISEcp1* 48 pb a montante e a ORF477 a jusante, este arranjo pode ou não estar flanqueado por uma IS26 (Boyd et al., 2004; Cantón e Coque, 2006; Eckert et al., 2006).

O ambiente genético do *bla*_{CTX-M-15} descrito neste estudo (*IS26-ΔISEcp1-bla*_{CTX-M-15-wbuC}) é semelhante aos descritos por Dhanji e colaboradores (2011) e Woodford e colaboradores (2009), diferenciando-se apenas pelo local onde a *ISEcp1* é truncada. Zong et al, 2015, também descreveram o mesmo contexto genético para o *bla*_{CTX-M-15} em plasmídeos IncI1.

O *bla*_{CTX-M-3}, que aparentemente deu origem ao *bla*_{CTX-M-15}, parece ter sido capturado do cromossomo de *Kluyvera ascorbata* pela inserção da *ISEcp1* (Rodríguez et al., 2004). *ISEcp1* é delimitada por repetições invertidas de 14 pb (IRL e IRR) e pode ser promotora para a expressão de genes adjacentes (Poirel et al., 2003, 2005). Poirel e colaboradores (2003) sugeriram que o *bla*_{CTX-M} possuíam sequências promotoras de baixa intensidade em *Kluyvera* spp. que não permitem um alto nível de sua expressão. Já dentre espécies receptoras, como *E. coli*, *K. pneumoniae* e *S. enterica* serovar Typhimurium, sequências semelhantes a *ISEcp1* podem promover maior nível de expressão do *bla*_{CTX-M} localizado no plasmídeo.

No Brasil, Dropa et al, (2016), descreveram o contexto genético do *bla*_{CTX-M-15} em isolados de estação de tratamento de água de esgoto e também observaram associação com *bla*_{CTX-M-15} e a *ISEcp1* e IS26.

Devido a inativação da *ISEcp1*, a provável mobilizadora do *bla*_{CTX-M-15} nas cepas do estudo é a IS26. A sequência de inserção IS26 tem um importante papel na disseminação de genes de resistência em bactérias Gram-negativas, estando associada com genes que conferem resistência a diferentes classes de antimicrobianos (Harmer e Hall, 2015). A IS26 forma uma co-integração entre a molécula de DNA a qual pertence e a molécula alvo resultando em duas cópias de IS26 em cada extremidade entre as duas moléculas participantes (Iida et al, 1984).

As três cepas do estudo apresentaram o mesmo contexto genético para o *bla*_{CTX-M-15}, e comparando-se com os outros contextos já descritos é possível

inferir que existe uma frequente transferência horizontal de plasmídeos codificadores de ESBL tanto inter como intra-específica, o que leva a uma grande disseminação deste tipo de resistência para todos os nichos do planeta, dificultando o tratamento de infecções tanto humanas como animais.

A análise do resistoma das cepas mostrou a grande capacidade da *K. pneumoniae* em agrupar diversos mecanismos de resistência. Foram observados genes de resistência aos antimicrobianos de nove classes diferentes, sendo elas, aminoglicosídeos, betalactâmicos, fluorquinolonas, fosfomicina, macrolídeos, fenicol, sulfonamidas, tetraciclina e trimetoprim, além da inserção cromossômica no gene *mgrB* que levou à resistência à polimixina B na cepa Kp148, PINH-4900.

As cepas Kp148, PINH-4900 e Kp196, TIET-4299, possuem a fosfo-transferase *aph(3')-Ia* que confere resistência em baixo nível apenas para neomicina (Shaw et al., 1993) e a cepa Kp314/11 possui a adenil-transferase *aadA2* que confere resistência a estreptomicina e espectinomicina (Bito et al, 1994), estes antimicrobianos não foram testados, pois não são comuns no tratamento de infecções por BGN. Todas as cepas do estudo possuem a acetil-transferase *aac(6')-Ib-cr*, que confere resistência em baixo nível a tobramicina, amicacina, dibercacina e netilmicina (Shaw et al., 1993), mas fenotipicamente só apresentaram resistência a tobramicina. Este fenótipo pode ser explicado pois, de acordo com estudo de Bremmer et al, (2014), cepas que possuem a acetil-transferase *aac(6')-Ib-cr* podem se manter susceptíveis a amicacina e isto pode ser devido a eficiência da amicacina em se proteger da ação das transferases. A amicacina é o único entre os aminoglicosídeos em que uma cadeia lateral protege o antimicrobiano da maioria dos AMEs (Mingeot-Leclercq et al., 1999).

Os genes de resistência aos betalactâmicos, fluorquinolonas, fosfomicina, macrolídeos, sulfonamidas e trimetoprim foram iguais nas três cepas do estudo.

Com relação a resistência às fluorquinolonas, além de genes de resistência adquiridos também foram observadas a bomba de efluxo *oqxAB*

e mutações nos genes *gyrA* e *parC* nas três cepas do estudo. A bomba de efluxo *oqxAB* é frequentemente relatada em *K. pneumoniae* e outras Enterobacteriaceae, tanto cromossômicas como plasmidiais (Hansen et al., 2007; Yuan et al., 2012; Bialek-Davenet et al., 2015; Wong et al., 2015). Já com relação às mutações, *gyrA* possui uma região chamada de QRDR entre os aminoácidos 67 e 106, que pode possuir diversas mutações que levam à resistência às quinolonas (Giraud et al., 2006). As cepas deste estudo apresentaram mutação no códon 83 o que corrobora com os estudos descritos (Giraud et al., 2006; Fu et al., 2013). A mutação em *parC* foi no códon 80 nas três cepas do estudo, e está de acordo com o descrito em outros estudos (Giraud et al., 2006; Al-Marzooq et al., 2014).

No estudo de Al-Marzoor et al., (2014), foi observado um aumento no valor da CIM de ciprofloxacina correlacionado com o número de determinantes de resistência a fluorquinolonas. As cepas com único determinante de resistência a fluorquinolona (um único gene PMQR - plasmid-mediated quinolone resistance (*qnr* ou *aac(6')-Ib-cr*) ou uma única mutação *gyrA83*) demonstraram CIM para ciprofloxacina menores que os isolados expressando dois determinantes da resistência incluindo dois genes PMQR ou um PMQR mais uma única mutação *gyrA83*. Resultados semelhantes também foram observados no estudo de Ruiz e colaboradores (2012). Tanto a cepa clínica como as cepas isoladas de rio apresentaram CIM para ciprofloxacina maior que 32 µg/mL, isto indica que os efeitos dos diferentes determinantes de resistência tem efeito cumulativo na CIM para ciprofloxacina, uma vez que nas cepas deste estudo foram observados além de uma resistência mediada por plasmídeo (*aac(6')-Ib-cr*), mutações em dois genes (*gyrA* e *parC*) mais o sistema de efluxo (*oqxAB*).

O gene de resistência à fosfomicina observado nas três cepas do estudo, foi classificado como *fosA*^{KP} semelhante ao *fosA6*.

O *fosA* está frequentemente presente no cromossomo de muitos Gram-negativos, incluindo *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* e *Serratia marcescens*, e confere resistência intrínseca à fosfomicina (Ito et al., 2017). No estudo de Ito e colaboradores (2017), foram analisados 1631 genomas

de *K. pneumoniae* e *fosA* foi identificado em 99,7% dos genomas analisados.

Guo et al., (2016) descreveram *fosA6* mediado por plasmídeo em um isolado de *E. coli* produtor de CTX-M-2 em amostras de urina de um hospital dos EUA. De acordo com uma pesquisa no BLASTN, este gene é amplamente distribuído em cromossomos de *K. pneumoniae*. Dados de análises de sequências adjacentes indicam que o gene pode ser mobilizado a partir de cromossomos de *K. pneumoniae* para plasmídeos de *E. coli* através de elementos móveis IS 10 (Yang et al., 2017).

A nomenclatura para FosA tem baixa consistência, provavelmente devido à diversidade da família de enzimas, e também em parte devido à ambiguidade em relação à origem e localização de *fosA*, por exemplo, intrínseca versus adquirida e cromossômica versus mediada por plasmídeo. Tanto do ponto de vista clínico quanto do “One Health”, as enzimas FosA preocupam, pois podem ser adquiridas por espécies que não possuem o gene *fosA* intrínseco (Ito et al., 2017).

A partir destas informações, Ito e colaboradores (2017) propuseram uma nova nomenclatura na qual os genes *fosA* adquiridos continuem seguindo a numeração sequencial, até o momento foram descritos 7 (*fosA1* até *fosA7*) e o *fosA* intrínseco venha acompanhado das iniciais do micro-organismo correspondente, por exemplo, *fosA*^{KP} em *K. pneumoniae* e *fosA*SM em *S. marcescens*.

A cepa KP148, TIET-4900 foi a única cepa do estudo que apresentou resistência a polimixina B, esta resistência é devido a um evento de inserção que truncou o *mgrB*. A inserção de um elemento móvel truncando o *mgrB* já foi relatada em diversos estudos (Cannatelli et al., 2013; Cheng et al., 2015; Giani et al., 2015; Poirel et al., 2015; Mavroidi et al., 2016). A *ISEc1*, elemento móvel que truncou o *mgrB* na cepa deste estudo, pertence a família IS3 e foi descrita em plasmídeo de *Enterobacter cloacae* (número de acesso AF342826).

Estudos relacionaram essa inserção no gene *mgrB* com a *IS5-like* (Cannatelli et al., 2013; Cheng et al., 2015; Poirel et al., 2015; Mavroidi et al.,

2016), IS10R (Cheng et al., 2015), IS*Kpn13* (Poirel et al., 2015), IS*Kpn14* (Poirel et al., 2015; Mavroidi et al., 2016) e IS*Kpn26* (Giani et al., 2015). A IS*Ecl1* foi associada com o contexto genético do gene *mcr-8*, em uma cepa de *K. pneumoniae* da China (Wang et al., 2018), mas até o momento não foi associada a inserção no *mgrB*.

As cepas deste estudo apresentaram o tipo capsular KL36, não pertencendo aos grupos considerados virulentos (K1, K2, K4 e K5) (Podschun e Ullmann, 1998). A cepa clínica Kp314/11 apresentou o operon *mrkABCDFHIJ*, responsável pela síntese de fímbria tipo 3 (Li et al., 2014), enquanto que as cepas isoladas do rio apresentaram mutação no gene *mrkD*, que liga a subunidade fimbrial as moléculas de colágeno (Li et al., 2014). Já foram descritas mutações no gene *mrkD* (Sebghati e Clegg, 1999; Stahlhut et al., 2013). No entanto, são necessários estudos mais profundos para verificar se a mutação observada nas cepas deste estudo afeta a função e impedem a formação da fímbria.

Não podemos afirmar que as cepas do estudo são pouco virulentas devido aos poucos genes relacionados a virulência, pois elas apresentam muitas proteínas hipotéticas que podem ter sua função relacionadas à virulência.

As três cepas do estudo apresentaram genes de resistência a metais e metais pesados, tais como, resistência a cobre (*pco*), prata (*sil*), arsênico (*ars*), cádmio (*cad*), magnésio, cobalto, zinco e manganês (*nik* e *rcn*) e telurito (*teh*). Muitas bactérias possuem mecanismos genéticos específicos de resistência a metais tóxicos. No meio ambiente, metais podem selecionar essas variantes resistentes de maneira similar à seleção de cepas resistentes a antimicrobianos. De fato, é relativamente comum a associação de resistência a metais e antimicrobianos já que ambos os genes de resistência estão frequentemente localizados em elementos genéticos móveis (Foster, 1983; Mcintosh et al., 2008). Consequentemente, pode-se inferir que a pressão seletiva exercida pelos metais pesados possa contribuir para a co-seleção indireta da resistência aos antimicrobianos,

particularmente em ambientes contaminados com os dois elementos (Lima De Silva et al, 2012).

Além de genes de resistência a metais e metais pesados, as cepas do estudo também apresentaram genes de resistência a desinfetantes, antissépticos e compostos de amônio quaternário. Os genes *mdtABC* ou *yegMNO*, no estudo de Nichino e Yamaguchi (2001), elevaram as CIM dos antimicrobianos ácido nalidíxico, norfloxacina, novobiocina e fosfomicina e também dos compostos benzacônio (utilizado como antisséptico e bactericida), SDS (Dodecil sulfato de sódio – que possibilita a lise do DNA) e desoxicolato (bactericida).

Outro importante grupo de genes observados nas cepas deste estudo foi o *qac* (A, E e $\Delta E1$). Já foi demonstrado anteriormente que a expressão de sistemas de efluxo é um dos principais mecanismos de resistência aos biocidas (Paulsen et al., 1993; Poole, 2005). *K. pneumoniae*, assim como outras bactérias Gram-negativas, pode possuir genes que são responsáveis por esse tipo de resistência, como *qacE* e *qacE Δ 1* (Paulsen et al., 1993; Kazama et al., 1998; Kücken et al., 2000). Os sistemas de efluxo de biocidas em Gram-negativas são geralmente codificados pelo cromossomo, com exceção dos genes *qacE*, *qacE Δ 1*, que são associados a elementos móveis. Essa talvez seja uma possível explicação para a ampla distribuição entre as bactérias Gram-negativas dos genes *qacE*, especialmente *qacE Δ 1*, que está relacionado a extremidade 3' de integrons de classe 1 (Poole, 2005).

As três cepas do estudo foram semelhantes em relação às características analisadas, como o resistoma, viruloma e tipos de plasmídeos. Este fato gera uma preocupação, pois o mesmo tipo de cepa presente nos isolados clínicos de hospitais, também estão presentes no meio ambiente.

Este estudo utilizou-se de técnicas de sequenciamento de genoma completo para comparar cepas multirresistentes isoladas de diferentes fontes, meio ambiente e ambiente hospitalar, e mostrou a semelhança existente entre elas. Essas semelhanças sobressaltam um problema maior do que o previsto para o contexto hospitalar, onde a multirresistência é considerada um sério problema de saúde humana. O hospital não está

isolado do meio ambiente e o efluente gerado acaba por ser despejado na rede de esgoto que chega então até os rios sem tratamento prévio, ou quando tratado não prevê a eliminação de bactérias multirresistentes ou resíduos de antimicrobianos. Este estudo nos deu evidências de que esse cenário é real e pode ser utilizado para informar as autoridades competentes que criem uma nova legislação que prevê esse tipo de tratamento para o efluente hospitalar, diminuindo a contaminação dos rios e do meio ambiente no sentido geral.

6 CONCLUSÕES

- As três cepas do estudo apresentaram resistoma similar, diferenciando-se apenas pela presença de genes relacionados a resistência aos aminoglicosídeos, tetraciclina e polimixina B.
- Foi identificado apenas o operon *mrk* relacionado a virulência
- Foram identificados os genes de resistência a metais e metais pesados, resistência a cobre (*pco*), prata (*sil*), arsênico (*ars*), cádmio (*cad*), magnésio, cobalto, zinco e manganês (*nik* e *rcn*) e telurito (*teh*) e os genes de resistência a amônios quaternários *qacAEΔE1* e *mdtABC*.
- Os grupos de incompatibilidade dos plasmídeos das três cepas do estudo foram iguais, sendo eles, IncN, IncFIB e IncFII.
- O plasmídeo carreador do gene *bla_{KPC-2}* pertence ao IncN e está inserido em um transposon Tn4401 isoforma b. Foi observada estabilidade deste plasmídeo por aproximadamente 100 gerações.
- O ambiente genético do *bla_{CTX-M-15}* mostrou uma associação com *ISEcp1* inativa e IS26 (transposon composto completo)
- Não foram observadas diferenças significantes no genoma da cepa clínica em relação às cepas isoladas do rio que indiquem uma maior adaptação ao seu ambiente, hospitalar ou meio ambiente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abboud CS, Bergamasco MD, Doi MA, Zandonadi EC, Barbosa V, Cortez D et al. First report of investigation into an outbreak due to carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary Brazilian hospital, with extension to a patient in the community. J. Infect. Prev. 2011; 12:150-153

Aires CAM, Rybak MJ, Yim J, Pereira PS, Rocha-de-Souza CM, Albano RM, et al. Genomic characterization of an extensively drug-resistant KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST855 (CC258) only susceptible to ceftazidime-avibactam isolated in Brazil. Diagn Microbiol Infect Dis. 2017;89(4):324-7.

Allen HK, Donato J, Wang HH, Cloud-Hansen KA, Davies J, Handelsman J. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. Nat Rev Microbiol. 2010;8(4):251-9.

Allen HK. Antibiotic resistance gene discovery in food-producing animals. Curr Opin Microbiol. 2014;19:25-9.

Al-Marzooq F, Mohd Yusof MY, Tay ST. Molecular analysis of ciprofloxacin resistance mechanisms in Malaysian ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates and development of mismatch amplification mutation assays (MAMA) for rapid detection of *gyrA* and *parC* mutations. Biomed Res Int. 2014;2014:601630.

Ambler RP. The structure of beta-lactamases. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 1980;289:321-31.

Andrade LN, Curiao T, Ferreira JC, Longo JM, Clímaco EC, Martinez R, et al. Dissemination of *bla*_{KPC-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.* 2011;55(7):3579-83.

ANVISA – Resistência Microbiana - Mecanismos e impacto clínico. 2007 Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_contr_ole/opas_web/modulo3), acesso em 30/07/2018.

Barbas III CF, Burton DR, Scott JK, Silverman GJ. Selection from antibody libraries protocol 10.1: Preparation of electrocompetent *E. coli*. In: *Phage display, A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; 2001. P. 10.2-10.4.

BacMet: Antibacterial Biocide & Metal Resistance Genes Database. Disponível em: <http://bacmet.biomedicine.gu.se/>, acesso em: 31/07/2018.

Baquero F, Martínez JL, Cantón R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr Opin Biotechnol.* 2008;19(3):260-5.

Baraniak A, Izdebski R, Herda M, Fiett J, Hryniewicz W, Gniadkowski M, et al. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* ST258 with KPC-2 in Poland. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(10):4565-7.

Bathorn E, Tsioutis C, da Silva Voorham JM, Scoulica EV, Ioannidou E, Zhou K, et al. Emergence of pan-resistance in KPC-2 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Crete, Greece: a close call. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(5):1207-12.

Bauernfeind A. Perspectives of beta-lactamases inhibitors in therapy of infections caused by *Escherichia coli* or *Klebsiella* with plasmidic resistance to third generation cephalosporins. *Infection.* 1990;18(1):48-52.

Belogurov AA, Delver EP, Rodzevich OV. Plasmid pKM101 encodes two nonhomologous antirestriction proteins (ArdA and ArdB) whose expression is controlled by homologous regulatory sequences. *J Bacteriol.* 1993;175(15):4843-50.

Benavides JA, Shiva C, Virhuez M, Tello C, Appelgren A, Vendrell J, et al. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in common vampire bats *Desmodus rotundus* and livestock in Peru. *Zoonoses Public Health.* 2018;65(4):454-8.

Bengtsson-Palme J, Kristiansson E, Larsson DGJ. Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 2018;42(1): fux053.

Bennett PM. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br J Pharmacol.* 2008;153 Suppl 1:S347-57.

Bialek-Davenet S, Lavigne JP, Guyot K, Mayer N, Tournebize R, Brisse S, et al. Differential contribution of AcrAB and OqxAB efflux pumps to multidrug resistance and virulence in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70(1):81-8.

Bito A, Susani M. Revised analysis of *aadA2* gene of plasmid pSa. *Antimicrob Agents Chemother.* 1994;38(5):1172-5.

Bi W, Liu H, Dunstan RA, Li B, Torres VVL, Cao J, et al. Extensively Drug-Resistant. *Front Microbiol.* 2017;8:1230.

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool. Disponível em: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, acesso em 26/07/2018.

Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(1):1-14.

Bortolaia V, Guardabassi L, Trevisani M, Bisgaard M, Venturi L, Bojesen AM. High diversity of extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* isolates from Italian broiler flocks. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(4):1623-6.

Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, et al. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2009;48(1):1-12.

Boyd DA, Tyler S, Christianson S, McGeer A, Muller MP, Willey BM, et al. Complete nucleotide sequence of a 92-kilobase plasmid harboring the CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase involved in an outbreak in long-term-care facilities in Toronto, Canada. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(10):3758-64.

Bratu S, Brooks S, Burney S, Kochar S, Gupta J, Landman D, et al. Detection and spread of *Escherichia coli* possessing the plasmid-borne carbapenemase KPC-2 in Brooklyn, New York. *Clin Infect Dis.* 2007;44(7):972-5.

Bratu S, Landman D, Alam M, Tolentino E, Quale J. Detection of KPC carbapenem-hydrolyzing enzymes in *Enterobacter* spp. from Brooklyn, New York. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(2):776-8.

Braun G, Cayô R, Matos AP, de Mello Fonseca J, Gales AC. Temporal evolution of polymyxin B-resistant *Klebsiella pneumoniae* clones recovered from blood cultures in a teaching hospital during a 7-year period. *Int J Antimicrob Agents.* 2018;51(3):522-7.

Bremmer DN, Clancy CJ, Press EG, Almaghrabi R, Chen L, Doi Y, et al. KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* strains that harbor AAC(6)-Ib exhibit intermediate resistance to amikacin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(12):7597-600.

Brisse S, Passet V, Haugaard AB, Babosan A, Kassis-Chikhani N, Struve C, et al. wzi Gene sequencing, a rapid method for determination of capsular type for *Klebsiella* strains. *J Clin Microbiol.* 2013;51(12):4073-8.

Bueno MF, Francisco GR, O'Hara JA, de Oliveira Garcia D, Doi Y. Coproduction of 16S rRNA methyltransferase RmtD or RmtG with KPC-2 and CTX-M group extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(5):2397-400.

Bush K. Bench-to-bedside review: The role of beta-lactamases in antibiotic-resistant Gram-negative infections. *Crit Care.* 2010;14(3):224.

Bush K, Courvalin P, Dantas G, Davies J, Eisenstein B, Huovinen P, et al. Tackling antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol.* 2011;9(12):894-6.

Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(3):969-76.

Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39(6):1211-33.

Cambray G, Guerout AM, Mazel D. Integrons. *Annu Rev Genet.* 2010;44:141-66.

Cannatelli A, D'Andrea MM, Giani T, Di Pilato V, Arena F, Ambretti S, et al. In vivo emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* producing

KPC-type carbapenemases mediated by insertional inactivation of the PhoQ/PhoP *mgrB* regulator. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(11):5521-6.

Cantón R, Coque TM. The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol.* 2006;9(5):466-75.

Carattoli A, Aschbacher R, March A, Larcher C, Livermore DM, Woodford N. Complete nucleotide sequence of the IncN plasmid pKOX105 encoding VIM-1, QnrS1 and SHV-12 proteins in Enterobacteriaceae from Bolzano, Italy compared with IncN plasmids encoding KPC enzymes in the USA. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65(10):2070-5.

Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods.* 2005;63(3):219-28.

Carattoli A. Plasmids in Gram negatives: molecular typing of resistance plasmids. *Int J Med Microbiol.* 2011;301(8):654-8.

Carattoli A. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(6):2227-38.

Carattoli A, Zankari E, García-Fernández A, Voldby Larsen M, Lund O, Villa L, et al. In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(7):3895-903.

Center for Genomic Epidemiology. MLST 1.8. Disponível em: <https://cge.cbs.dtu.dk/services/MLST/>, acesso em 20/05/2018.

Center for Genomic Epidemiology. PlasmidFinder 1.3. Disponível em: <https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>, acesso em 31/07/2018.

Center for Genomic Epidemiology. ResFinder 3.0. Disponível em: <https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>, acesso em 31/07/2018.

Cerdeira LT, Carneiro AR, Ramos RT, de Almeida SS, D'Afonseca V, Schneider MP, et al. Rapid hybrid de novo assembly of a microbial genome using only short reads: *Corynebacterium pseudotuberculosis* I19 as a case study. *J Microbiol Methods*. 2011;86(2):218-23.

Chagas TP, Seki LM, da Silva DM, Asensi MD. Occurrence of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in hospital wastewater. *J Hosp Infect*. 2011;77(3):281.

Chang MR, Biberg CA, Lopes FA, Tetila AF, Pignatari AC. The first report of infection with *Klebsiella pneumoniae* carrying the *bla*_{KPC} gene in State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2013;46(1):114-5.

Chen L, Chavda KD, Al Laham N, Melano RG, Jacobs MR, Bonomo RA, et al. Complete nucleotide sequence of a *bla*_{KPC}-harboring IncI2 plasmid and its dissemination in New Jersey and New York hospitals. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(10):5019-25.

Chen L, Chavda KD, Melano RG, Hong T, Rojzman AD, Jacobs MR, et al. Molecular survey of the dissemination of two *bla*_{KPC}-harboring IncFIA plasmids in New Jersey and New York hospitals. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014c;58(4):2289-94.

Chen L, Chavda KD, Melano RG, Jacobs MR, Koll B, Hong T, et al. Comparative genomic analysis of KPC-encoding pKpQIL-like plasmids and

their distribution in New Jersey and New York Hospitals. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014b;58(5):2871-7.

Chen L, Mathema B, Chavda KD, DeLeo FR, Bonomo RA, Kreiswirth BN. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: molecular and genetic decoding. *Trends Microbiol.* 2014a;22(12):686-96.

Cheng YH, Lin TL, Pan YJ, Wang YP, Lin YT, Wang JT. Colistin resistance mechanisms in *Klebsiella pneumoniae* strains from Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(5):2909-13.

Chmelnitsky I, Shklyar M, Hermesh O, Navon-Venezia S, Edgar R, Carmeli Y. Unique genes identified in the epidemic extremely drug-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* sequence type 258. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(1):74-83.

Chroma M, Kolar M. Genetic methods for detection of antibiotic resistance: focus on extended-spectrum β -lactamases. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2010;154(4):289-96.

Clements A, Tull D, Jenney AW, Farn JL, Kim SH, Bishop RE, et al. Secondary acylation of *Klebsiella pneumoniae* lipopolysaccharide contributes to sensitivity to antibacterial peptides. *J Biol Chem.* 2007;282(21):15569-77.

Clerch B, Bravo JM, Llagostera M. Efficiency of MucAB and *Escherichia coli* UmuDC proteins in quinolone and UV mutagenesis in *Salmonella typhimurium*: effect of MucA and UmuD processing. *Mutat Res.* 1996;349(2):201-8.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-three

informational supplement, M100-S23. Clinical and Laboratory Institute; Wayne, PA. 2013.

Couturier M, Bex F, Bergquist PL, Maas WK. Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiol Rev.* 1988;52(3):375-95.

Cottell JL, Saw HT, Webber MA, Piddock LJ. Functional genomics to identify the factors contributing to successful persistence and global spread of an antibiotic resistance plasmid. *BMC Microbiol.* 2014;14:168.

Cullik A, Pfeifer Y, Prager R, von Baum H, Witte W. A novel IS26 structure surrounds *bla*_{CTX-M} genes in different plasmids from German clinical *Escherichia coli* isolates. *J Med Microbiol.* 2010;59(Pt 5):580-7.

Curiao T, Morosini MI, Ruiz-Garbajosa P, Robustillo A, Baquero F, Coque TM, et al. Emergence of *bla*_{KPC-3-Tn4401a} associated with a pKPN3/4-like plasmid within ST384 and ST388 *Klebsiella pneumoniae* clones in Spain. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65(8):1608-14.

Cuzon G, Naas T, Demachy MC, Nordmann P. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolate from Greece. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(2):796-7.

DAEE – Departamento de Águas e Energia Elétrica do Estado de São Paulo 2018, Disponível em: http://www.dae.sp.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=793%3Ahistorico-do-rio-tiete&catid=40%3Acobranca&Itemid=53, acesso em 02/12/2018.

Dalmolin TV, Martins AF, Zavascki AP, de Lima-Morales D, Barth AL. Acquisition of the *mcr-1* gene by a high-risk clone of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST437/CC258, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2018;90(2):132-3.

Datta N, Hedges RW. Compatibility groups among fi-R factors. *Nature*. 1971;234(5326):222-3.

Datta N, Hughes VM. Plasmids of the same Inc groups in Enterobacteria before and after the medical use of antibiotics. *Nature*. 1983;306(5943):616-7.

Davin-Regli A, Bolla JM, James CE, Lavigne JP, Chevalier J, Garnotel E, et al. Membrane permeability and regulation of drug "influx and efflux" in enterobacterial pathogens. *Curr Drug Targets*. 2008;9(9):750-9.

Davis MA, Baker KN, Orfe LH, Shah DH, Besser TE, Call DR. Discovery of a gene conferring multiple-aminoglycoside resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(6):2666-9.

De Boeck H, Miwanda B, Lunguya-Metila O, Muyembe-Tamfum JJ, Stobberingh E, Glupczynski Y, et al. ESBL-positive Enterobacteria isolates in drinking water. *Emerg Infect Dis*. 2012;18(6):1019-20.

Deleo FR, Chen L, Porcella SF, Martens CA, Kobayashi SD, Porter AR, et al. Molecular dissection of the evolution of carbapenem-resistant multilocus sequence type 258 *Klebsiella pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(13):4988-93.

DeNap JC, Hergenrother PJ. Bacterial death comes full circle: targeting plasmid replication in drug-resistant bacteria. *Org Biomol Chem*. 2005;3(6):959-66.

Deshpande LM, Rhomberg PR, Sader HS, Jones RN. Emergence of serine carbapenemases (KPC and SME) among clinical strains of Enterobacteriaceae isolated in the United States Medical Centers: report

from the MYSTIC Program (1999-2005). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2006;56(4):367-72.

Dhanji H, Patel R, Wall R, Doumith M, Patel B, Hope R, et al. Variation in the genetic environments of *bla*_{CTX-M-15} in *Escherichia coli* from the faeces of travellers returning to the United Kingdom. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66(5):1005-12.

Diestra K, Juan C, Curiao T, Moyá B, Miró E, Oteo J, et al. Characterization of plasmids encoding *bla*_{ESBL} and surrounding genes in Spanish clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother*. 2009;63(1):60-6.

Di Luca MC, Sørum V, Starikova I, Kloos J, Hülter N, Naseer U, et al. Low biological cost of carbapenemase-encoding plasmids following transfer from *Klebsiella pneumoniae* to *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother*. 2017;72(1):85-9.

Di Martino P, Livrelli V, Sirot D, Joly B, Darfeuille-Michaud A. A new fimbrial antigen harbored by CAZ-5/SHV-4-producing *Klebsiella pneumoniae* strains involved in nosocomial infections. *Infect Immun*. 1996;64(6):2266-73.

Doi Y, de Oliveira Garcia D, Adams J, Paterson DL. Coproduction of novel 16S rRNA methylase RmtD and metallo-beta-lactamase SPM-1 in a panresistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(3):852-6.

Doi Y, Yokoyama K, Yamane K, Wachino J, Shibata N, Yagi T, et al. Plasmid-mediated 16S rRNA methylase in *Serratia marcescens* conferring high-level resistance to aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(2):491-6.

Dropa M, Lincopan N, Balsalobre LC, Oliveira DE, Moura RA, Fernandes MR, et al. Genetic background of novel sequence types of CTX-M-8 and CTX-M-15-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from public wastewater treatment plants in São Paulo, Brazil. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2016;23(5):4953-8.

Eckert C, Gautier V, Arlet G. DNA sequence analysis of the genetic environment of various *bla*_{CTX-M} genes. *J Antimicrob Chemother*. 2006;57(1):14-23.

Eikmeyer F, Hadiati A, Szczepanowski R, Wibberg D, Schneiker-Bekel S, Rogers LM, et al. The complete genome sequences of four new IncN plasmids from wastewater treatment plant effluent provide new insights into IncN plasmid diversity and evolution. *Plasmid*. 2012;68(1):13-24.

Falagas ME, Kasiakou SK. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis*. 2005;40(9):1333-41.

Fehlberg LC, Carvalho AM, Campana EH, Gontijo-Filho PP, Gales AC. Emergence of *Klebsiella pneumoniae*-producing KPC-2 carbapenemase in Paraíba, Northeastern Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2012;16(6):577-80.

Fernandes SA, Camargo CH, Francisco GR, Bueno MFC, Garcia DO, Doi Y, et al. Prevalence of Extended-Spectrum β -Lactamases CTX-M-8 and CTX-M-2-Producing *Salmonella* Serotypes from Clinical and Nonhuman Isolates in Brazil. *Microb Drug Resist*. 2017;23(5):580-9.

Fluit AC, Schmitz FJ. Resistance integrons and super-integrons. *Clin Microbiol Infect*. 2004;10(4):272-88.

Foster TJ. Plasmid-determined resistance to antimicrobial drugs and toxic metal ions in bacteria. *Microbiol Rev.* 1983;47(3):361-409.

Francisco G. Diversidade genética de *K. pneumoniae* produtora de KPC-2 isoladas de diversos hospitais do Estado de São Paulo. [Dissertação]. São Paulo: Coordenadoria do Controle de Doenças, Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo; 2014.

Future Learn - Bacterial Genomes: Disease Outbreaks and Antimicrobial Resistance, disponível em: www.futurelearn.com/courses/bacterial-genomes-bioinformatics, acesso em 20/05/2018

Fu Y, Zhang W, Wang H, Zhao S, Chen Y, Meng F, et al. Specific patterns of *gyrA* mutations determine the resistance difference to ciprofloxacin and levofloxacin in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *BMC Infect Dis.* 2013;13:8.

Gales AC, Castanheira M, Jones RN, Sader HS. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012;73(4):354-60.

Galimand M, Courvalin P, Lambert T. Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in Enterobacteriaceae due to 16S rRNA methylation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(8):2565-71.

Galimand M, Courvalin P, Lambert T. RmtF, a new member of the aminoglycoside resistance 16S rRNA N7 G1405 methyltransferase family. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(7):3960-2.

Garcia DO, Abboud CS, Doy C, Saraiva CR, Pereira GH. Interhospital dissemination of KPC producing *Klebsiella pneumoniae* single clone in São

Paulo city, Brazil – First report. In: Interscience Conference on Antimicrob Agents Chemother, 50th, 2010, Boston. Abstract.

García-Fernández A, Villa L, Carta C, Venditti C, Giordano A, Venditti M, et al. *Klebsiella pneumoniae* ST258 producing KPC-3 identified in Italy carries novel plasmids and OmpK36/OmpK35 porin variants. Antimicrob Agents Chemother. 2012;56(4):2143-5.

Garneau-Tsodikova S, Labby KJ. Mechanisms of Resistance to Aminoglycoside Antibiotics: Overview and Perspectives. Medchemcomm. 2016;7(1):11-27.

Gautam RK. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of *Escherichia coli* O157:H7 and other Gram-negative organisms in 1 day. J Clin Microbiol. 1997;35(11):2977-80.

Ghaly TM, Chow L, Asher AJ, Waldron LS, Gillings MR. Evolution of class 1 integrons: Mobilization and dispersal via food-borne bacteria. PLoS One. 2017;12(6):e0179169.

Giani T, Arena F, Vaggelli G, Conte V, Chiarelli A, Henrici De Angelis L, et al. Large Nosocomial Outbreak of Colistin-Resistant, Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Traced to Clonal Expansion of an *mgrB* Deletion Mutant. J Clin Microbiol. 2015;53(10):3341-4.

Giani T, D'Andrea MM, Pecile P, Borgianni L, Nicoletti P, Tonelli F, et al. Emergence in Italy of *Klebsiella pneumoniae* sequence type 258 producing KPC-3 Carbapenemase. J Clin Microbiol. 2009;47(11):3793-4.

Giedraitienė A, Vitkauskienė A, Naginienė R, Pavilionis A. Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. Medicina (Kaunas). 2011;47(3):137-46.

Giraud E, Baucheron S, Cloeckaert A. Resistance to fluoroquinolones in *Salmonella*: emerging mechanisms and resistance prevention strategies. *Microbes Infect.* 2006;8(7):1937-44.

Gootz TD, Lescoe MK, Dib-Hajj F, Dougherty BA, He W, Della-Latta P, et al. Genetic organization of transposase regions surrounding *bla*_{KPC} carbapenemase genes on plasmids from *Klebsiella* strains isolated in a New York City hospital. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(5):1998-2004.

Guo Q, Tomich AD, McElheny CL, Cooper VS, Stoesser N, Wang M, et al. Glutathione-S-transferase FosA6 of *Klebsiella pneumoniae* origin conferring fosfomycin resistance in ESBL-producing *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(9):2460-5.

Hansen LH, Jensen LB, Sørensen HI, Sørensen SJ. Substrate specificity of the OqxAB multidrug resistance pump in *Escherichia coli* and selected enteric bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 2007;60(1):145-7.

Harmer CJ e Hall RM. IS26-Mediated Precise Excision of the IS26-*aphA1a* Translocatable Unit. *MBio.* 2015;6(6):e01866-15.

Hengen PN, Denicourt D, Iyer VN. Isolation and characterization of *kikA*, a region on IncN group plasmids that determines killing of *Klebsiella oxytoca*. *J Bacteriol.* 1992;174(9):3070-7.

Hernández-Allés S, Albertí S, Alvarez D, Doménech-Sánchez A, Martínez-Martínez L, Gil J, et al. Porin expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiology.* 1999;145 (Pt 3):673-9.

Hernández M, Quijada NM, Lorente LL, de Frutos M, Rodríguez-Lázaro D, Eiros JM. Infrequent isolation of extensively drug-resistant (XDR) *Klebsiella*

pneumoniae resistant to colistin in Spain. Int J Antimicrob Agents. 2018;51(3):531-3.

Hirakawa H, Takumi-Kobayashi A, Theisen U, Hirata T, Nishino K, Yamaguchi A. AcrS/EnvR represses expression of the *acrAB* multidrug efflux genes in *Escherichia coli*. J Bacteriol. 2008;190(18):6276-9.

Hong YP, Wang YW, Huang IH, Liao YC, Kuo HC, Liu YY, et al. Genetic Relationships among Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Strains from Humans and Animals. Antimicrob Agents Chemother. 2018;62(5).

Holcík M, Iyer VN. Structure and mode of action of *kikA*, a genetic region lethal to *Klebsiella oxytoca* and associated with conjugative antibiotic-resistance plasmids of the IncN group. Plasmid. 1996;35(3):189-203.

Huang YH, Chou SH, Liang SW, Ni CE, Lin YT, Huang YW, et al. Emergence of an XDR and carbapenemase-producing hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* strain in Taiwan. J Antimicrob Chemother. 2018.

Iida S, Mollet B, Meyer J, Arber W. Functional characterization of the prokaryotic mobile genetic element IS26. Mol Gen Genet. 1984;198(2):84-9.

INSTITUT PASTEUR MLST and whole genome MLST database. Disponível em: <http://bigsdbs.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>, acesso em 02/06/2018.

InterPro database. Disponível em: <https://www.ebi.ac.uk/interpro/>, acesso em 11/06/2018.

IS Finder. Disponível em: <https://www-is.biotoul.fr/index.php>, acesso em 23/06/2018.

Ito R, Mustapha MM, Tomich AD, Callaghan JD, McElheny CL, Mettus RT, et al. Widespread Fosfomycin Resistance in Gram-Negative Bacteria Attributable to the Chromosomal. *MBio*. 2017;8(4).

Jans C, Sarno E, Collineau L, Meile L, Stärk KDC, Stephan R. Consumer Exposure to Antimicrobial Resistant Bacteria From Food at Swiss Retail Level. *Front Microbiol*. 2018;9:362.

Jayol A, Poirel L, Brink A, Villegas MV, Yilmaz M, Nordmann P. Resistance to colistin associated with a single amino acid change in protein PmrB among *Klebsiella pneumoniae* isolates of worldwide origin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(8):4762-6.

Jones CH, Tuckman M, Keeney D, Ruzin A, Bradford PA. Characterization and sequence analysis of extended-spectrum beta-lactamase-encoding genes from *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* isolates collected during tigecycline phase 3 clinical trials. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(2):465-75.

Johnson TJ, Wannemuehler YM, Johnson SJ, Logue CM, White DG, Doetkott C, et al. Plasmid replicon typing of commensal and pathogenic *Escherichia coli* isolates. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73(6):1976-83.

Kallmeyer J, Pockalny R, Adhikari RR, Smith DC, D'Hondt S. Global distribution of microbial abundance and biomass in subseafloor sediment. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(40):16213-6.

Kaplan E, Sela N, Doron-Faigenboim A, Navon-Venezia S, Jurkevitch E, Cytryn E. Genomic and Functional Characterization of *qnr*-Encoding Plasmids from Municipal Wastewater Biosolid *Klebsiella pneumoniae* Isolates. *Front Microbiol*. 2015;6:1354.

Kazama H, Hamashima H, Sasatsu M, Arai T. Distribution of the antiseptic-resistance genes *qacE* and *qacEΔ1* in Gram-negative bacteria. FEMS Microbiol Lett. 1998;159(2):173-8.

Krapp F, Ozer EA, Qi C, Hauser AR. Case Report of an Extensively Drug-Resistant. Open Forum Infect Dis. 2018;5(5):ofy074.

Kitchel B, Rasheed JK, Patel JB, Srinivasan A, Navon-Venezia S, Carmeli Y, et al. Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: clonal expansion of multilocus sequence type 258. Antimicrob Agents Chemother. 2009;53(8):3365-70.

Krawiec M, Woźniak-Biel A, Bednarski M, Wieliczko A. Antimicrobial Susceptibility and Genotypic Characteristic of *Campylobacter* spp. Isolates from Free-Living Birds in Poland. Vector Borne Zoonotic Dis. 2017;17(11):755-63.

Kücken D, Feucht H, Kaulfers P. Association of *qacE* and *qacEΔ1* with multiple resistance to antibiotics and antiseptics in clinical isolates of Gram-negative bacteria. FEMS Microbiol Lett. 2000;183(1):95-8.

Leavitt A, Chmelnitsky I, Carmeli Y, Navon-Venezia S. Complete nucleotide sequence of KPC-3-encoding plasmid pKpQIL in the epidemic *Klebsiella pneumoniae* sequence type 258. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54(10):4493-6.

Ledina T, Mohar-Lorbeg P, Golob M, Djordjevic J, Bogovič-Matijašić B, Bulajic S. Tetracycline resistance in lactobacilli isolated from Serbian traditional raw milk cheeses. J Food Sci Technol. 2018;55(4):1426-34.

Lee CR, Lee JH, Park KS, Kim YB, Jeong BC, Lee SH. Global Dissemination of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Genetic

Context, Treatment Options, and Detection Methods. *Front Microbiol.* 2016;7:895.

Li B, Zhao Y, Liu C, Chen Z, Zhou D. Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. *Future Microbiol.* 2014;9(9):1071-81.

Li XZ, Nikaido H, Poole K. Role of *mexA-mexB-oprM* in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39(9):1948-53.

Lima de Silva AA, de Carvalho MA, de Souza SA, Dias PM, da Silva Filho RG, de Meirelles Saramago CS, et al. Heavy metal tolerance (Cr, Ag AND Hg) in bacteria isolated from sewage. *Braz J Microbiol.* 2012;43(4):1620-31.

Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis.* 2016;16(2):161-8.

Livermore DM. Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1995;8(4):557-84.

Livermore DM. Fourteen years in resistance. *Int J Antimicrob Agents.* 2012;39(4):283-94.

Llobet E, Campos MA, Giménez P, Moranta D, Bengoechea JA. Analysis of the networks controlling the antimicrobial-peptide-dependent induction of *Klebsiella pneumoniae* virulence factors. *Infect Immun.* 2011;79(9):3718-32.

Lu H, Giordano F, Ning Z. Oxford Nanopore MinION Sequencing and Genome Assembly. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 2016;14(5):265-79.

Lupo A, Coyne S, Berendonk TU. Origin and evolution of antibiotic resistance: the common mechanisms of emergence and spread in water bodies. *Front Microbiol.* 2012;3:18.

Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(3):268-81.

Magnet S, Blanchard JS. Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. *Chem Rev.* 2005;105(2):477-98.

Mahillon J, Chandler M. Insertion sequences. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998;62(3):725-74.

Martinez JL. Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. *Science.* 2008;321(5887):365-7.

Martínez J, Martínez L, Rosenblueth M, Silva J, Martínez-Romero E. How are gene sequence analyses modifying bacterial taxonomy? The case of *Klebsiella*. *Int Microbiol.* 2004;7(4):261-8.

Martínez-Martínez L, Pascual A, Jacoby GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet.* 1998;351(9105):797-9.

Mathers AJ, Peirano G, Pitout JD. The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Rev.* 2015;28(3):565-91.

Mavroidi A, Katsiari M, Likousi S, Palla E, Roussou Z, Nikolaou C, et al. Characterization of ST258 Colistin-Resistant, *bla*_{KPC}-Producing *Klebsiella pneumoniae* in a Greek Hospital. *Microb Drug Resist.* 2016;22(5):392-8.

Mazel D. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat Rev Microbiol.* 2006;4(8):608-20.

Mazzariol A, Zuliani J, Cornaglia G, Rossolini GM, Fontana R. AcrAB Efflux System: Expression and Contribution to Fluoroquinolone Resistance in *Klebsiella* spp. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(12):3984-6.

McIntosh D, Cunningham M, Ji B, Fekete FA, Parry EM, Clark SE, et al. Transferable, multiple antibiotic and mercury resistance in Atlantic Canadian isolates of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* is associated with carriage of an IncA/C plasmid similar to the *Salmonella enterica* plasmid pSN254. *J Antimicrob Chemother.* 2008;61(6):1221-8.

Mena A, Plasencia V, García L, Hidalgo O, Ayestarán JI, Alberti S, et al. Characterization of a large outbreak by CTX-M-1-producing *Klebsiella pneumoniae* and mechanisms leading to in vivo carbapenem resistance development. *J Clin Microbiol.* 2006;44(8):2831-7.

Menart V, Jevsevar S, Vilar M, Trobis A, Pavko A. Constitutive versus thermoinducible expression of heterologous proteins in *Escherichia coli* based on strong PR,PL promoters from phage lambda. *Biotechnol Bioeng.* 2003;83(2):181-90.

Michán C, Manchado M, Pueyo C. SoxRS down-regulation of *rob* transcription. *J Bacteriol.* 2002;184(17):4733-8.

Mingeot-Leclercq MP, Glupczynski Y, Tulkens PM. Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43(4):727-37.

Miriagou V, Tzouvelekis LS, Rossiter S, Tzelepi E, Angulo FJ, Whichard JM. Imipenem resistance in a *Salmonella* clinical strain due to plasmid-mediated

class A carbapenemase KPC-2. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(4):1297-300.

Mitrophanov AY, Jewett MW, Hadley TJ, Groisman EA. Evolution and dynamics of regulatory architectures controlling polymyxin B resistance in enteric bacteria. *PLoS Genet.* 2008;4(10):e1000233.

Mojica MF, Correa A, Vargas DA, Maya JJ, Montealegre MC, Rojas LJ, et al. Molecular correlates of the spread of KPC-producing Enterobacteriaceae in Colombia. *Int J Antimicrob Agents.* 2012;40(3):277-9.

Monteiro J, Santos AF, Asensi MD, Peirano G, Gales AC. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(1):333-4.

Montezzi LF, Campana EH, Corrêa LL, Justo LH, Paschoal RP, da Silva IL, et al. Occurrence of carbapenemase-producing bacteria in coastal recreational waters. *Int J Antimicrob Agents.* 2015;45(2):174-7.

Moodley A, Guardabassi L. Transmission of IncN plasmids carrying *bla*_{CTX-M-1} between commensal *Escherichia coli* in pigs and farm workers. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(4):1709-11.

Moré MI, Pohlman RF, Winans SC. Genes encoding the pKM101 conjugal mating pore are negatively regulated by the plasmid-encoded KorA and KorB proteins. *J Bacteriol.* 1996;178(15):4392-9.

Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA, Schwaber MJ, Daikos GL, Cormican M, et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis.* 2013;13(9):785-96.

Muzaheed, Doi Y, Adams-Haduch JM, Endimiani A, Sidjabat HE, Gaddad

SM, et al. High prevalence of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* among inpatients and outpatients with urinary tract infection in Southern India. *J Antimicrob Chemother.* 2008; 1393-1394.

Naas T, Cuzon G, Villegas MV, Lartigue MF, Quinn JP, Nordmann P. Genetic structures at the origin of acquisition of the beta-lactamase *bla*_{KPC} gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(4):1257-63.

Naas T, Nordmann P, Vedel G, Poyart C. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from France. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(10):4423-4.

Nandi S, Maurer JJ, Hofacre C, Summers AO. Gram-positive bacteria are a major reservoir of Class 1 antibiotic resistance integrons in poultry litter. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(18):7118-22.

Nascimento T, Cantamessa R, Melo L, Fernandes MR, Fraga E, Dropa M, et al. International high-risk clones of *Klebsiella pneumoniae* KPC-2/CC258 and *Escherichia coli* CTX-M-15/CC10 in urban lake waters. *Sci Total Environ.* 2017;598:910-5.

Naseer U, Sundsfjord A. The CTX-M conundrum: dissemination of plasmids and *Escherichia coli* clones. *Microb Drug Resist.* 2011;17(1):83-97.

Naves ZVF, Tonon LS, Ogassawara CT, Garcia DO. Rapid dissemination of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* single clone in several hospitals in Great São Paulo, Brazil. In: Congress of European Microbiologists, 4th, 2011, Geneva. Abstract.

Navon-Venezia S, Chmelnitsky I, Leavitt A, Schwaber MJ, Schwartz D, Carmeli Y. Plasmid-mediated imipenem-hydrolyzing enzyme KPC-2 among

multiple carbapenem-resistant *Escherichia coli* clones in Israel. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(9):3098-101.

Navon-Venezia S, Kondratyeva K, Carattoli A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 2017;41(3):252-75.

Navon-Venezia S, Leavitt A, Schwaber MJ, Rasheed JK, Srinivasan A, Patel JB, et al. First report on a hyperepidemic clone of KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* in Israel genetically related to a strain causing outbreaks in the United States. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(2):818-20.

NCBI - Banco de Betalactamases, Disponível em: <ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pathogen/betalactamases/Allele.tab>, acesso em 06/05/2018.

Nicoletti AG, Fehlberg LC, Picão RC, Machado AeO, Gales AC. Clonal complex 258, the most frequently found multilocus sequence type complex in KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in Brazilian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(8):4563-4; author reply 5.

Nikaido H. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science.* 1994;264(5157):382-8.

Nishino K, Yamaguchi A. Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 2001;183(20):5803-12.

NOTA TÉCNICA N.º 01/2013. Medidas e prevenção e controle de infecções por enterobactérias multirresistentes. Agência Nacional de Vigilância Sanitária; Brasília, DF. 2013.

Novais A, Cantón R, Moreira R, Peixe L, Baquero F, Coque TM. Emergence and dissemination of Enterobacteriaceae isolates producing CTX-M-1-like enzymes in Spain are associated with IncFII (CTX-M-15) and broad-host-range (CTX-M-1, -3, and -32) plasmids. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(2):796-9.

Novović K, Trudić A, Brkić S, Vasiljević Z, Kojić M, Medić D, et al. Molecular Epidemiology of Colistin-Resistant, Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Serbia from 2013 to 2016. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(5).

O'Hara JA, McGann P, Snesrud EC, Clifford RJ, Waterman PE, Lesho EP, et al. Novel 16S rRNA methyltransferase RmtH produced by *Klebsiella pneumoniae* associated with war-related trauma. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(5):2413-6.

Oliveira S, Moura RA, Silva KC, Pavez M, McCulloch JA, Dropa M, et al. Isolation of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains belonging to the high-risk multiresistant clonal complex 11 (ST437 and ST340) in urban rivers. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69(3):849-52.

Österblad M, Kirveskari J, Hakanen AJ, Tissari P, Vaara M, Jalava J. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Finland: the first years (2008-11). *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(12):2860-4.

Oteo J, Hernández JM, Espasa M, Fleites A, Sáez D, Bautista V, et al. Emergence of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* and the novel carbapenemases OXA-244 and OXA-245 in Spain. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(2):317-21.

Padilla E, Llobet E, Doménech-Sánchez A, Martínez-Martínez L, Bengoechea JA, Albertí S. *Klebsiella pneumoniae* AcrAB efflux pump

contributes to antimicrobial resistance and virulence. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(1):177-83.

Padilla G, Costa SOP. Genética bacteriana. In: Trabulsi LR & Alterthum F. *Microbiologia* 6ª ed. São Paulo: Ed. Atheneu, 2015. p 37-49.

Pal C, Bengtsson-Palme J, Rensing C, Kristiansson E, Larsson DG. BacMet: antibacterial biocide and metal resistance genes database. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(Database issue):D737-43.

Palasubramaniam S, Muniandy S, Navaratnam P. Resistance to extended-spectrum beta-lactams by the emergence of SHV-12 and the loss of OmpK35 in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Malaysia. *J Microbiol Immunol Infect.* 2009;42(2):129-33.

Pan YJ, Lin TL, Lin YT, Su PA, Chen CT, Hsieh PF, et al. Identification of capsular types in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains by wzc sequencing and implications for capsule depolymerase treatment. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(2):1038-47.

Papp PP, Iyer VN. Determination of the binding sites of RepA, a replication initiator protein of the basic replicon of the IncN group plasmid pCU1. *J Mol Biol.* 1995;246(5):595-608.

Partridge SR, Tsafnat G, Coiera E, Iredell JR. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol Rev.* 2009;33(4):757-84.

Pasteran FG, Otaegui L, Guerriero L, Radice G, Maggiora R, Rapoport M, et al. *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-2, Buenos Aires, Argentina. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(7):1178-80.

Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. Clin Microbiol Rev. 2005;18(4):657-86.

Paterson DL. Resistance in Gram-negative bacteria: enterobacteriaceae. Am J Med. 2006;119(6 Suppl 1):S20-8; discussion S62-70.

Paterson ES, Moré MI, Pillay G, Cellini C, Woodgate R, Walker GC, et al. Genetic analysis of the mobilization and leading regions of the IncN plasmids pKM101 and pCU1. J Bacteriol. 1999;181(8):2572-83

Paulsen IT, Littlejohn TG, Rådström P, Sundström L, Sköld O, Swedberg G, et al. The 3' conserved segment of integrons contains a gene associated with multidrug resistance to antiseptics and disinfectants. Antimicrob Agents Chemother. 1993;37(4):761-8.

Pavez M, Mamizuka EM, Lincopan N. Early dissemination of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. Antimicrob Agents Chemother. 2009;53(6):2702.

Peirano G, Seki LM, Val Passos VL, Pinto MC, Guerra LR, Asensi MD. Carbapenem-hydrolysing beta-lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. J Antimicrob Chemother. 2009;63(2):265-8.

Pereira PS, Borghi M, Albano RM, Lopes JC, Silveira MC, Marques EA, et al. Coproduction of NDM-1 and KPC-2 in *Enterobacter hormaechei* from Brazil. Microb Drug Resist. 2015;21(2):234-6.

Pereira PS, de Araujo CF, Seki LM, Zahner V, Carvalho-Assef AP, Asensi MD. Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: spread of clonal complex 11 (ST11, ST437 and ST340). J Antimicrob Chemother. 2013;68(2):312-6.

Pérez-Chaparro PJ, Cerdeira LT, Queiroz MG, de Lima CP, Levy CE, Pavez M, et al. Complete nucleotide sequences of two *bla*_{KPC-2}-bearing IncN Plasmids isolated from sequence type 442 *Klebsiella pneumoniae* clinical strains four years apart. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(5):2958-60.

Piazza RMF, Rocha LB, Horton DSPN. Fatores de Virulência II: Toxinas. In: Trabulsi LR & Alterthum F. *Microbiologia* 6^a ed. São Paulo: Ed. Atheneu, 2015. p 147-154.

Picão RC, Cardoso JP, Campana EH, Nicoletti AG, Petrolini FV, Assis DM, et al. The route of antimicrobial resistance from the hospital effluent to the environment: focus on the occurrence of KPC-producing *Aeromonas* spp. and Enterobacteriaceae in sewage. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013;76(1):80-5.

Piddock LJ. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin Microbiol Rev*. 2006;19(2):382-402.

Pillai DR, Melano R, Rawte P, Lo S, Tijet N, Fuksa M, et al. *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase, Canada. *Emerg Infect Dis*. 2009;15(5):827-9.

Pitout JD, Nordmann P, Poirel L. Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*, a Key Pathogen Set for Global Nosocomial Dominance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(10):5873-84.

Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev*. 1998;11(4):589-603.

Pohlman RF, Genetti HD, Winans SC. Entry exclusion of the IncN plasmid pKM101 is mediated by a single hydrophilic protein containing a lipid attachment motif. *Plasmid*. 1994;31(2):158-65.

Pohlman RF, Liu F, Wang L, Moré MI, Winans SC. Genetic and biochemical analysis of an endonuclease encoded by the IncN plasmid pKM101. *Nucleic Acids Res.* 1993;21(21):4867-72.

Poirel L, Barbosa-Vasconcelos A, Simões RR, Da Costa PM, Liu W, Nordmann P. Environmental KPC-producing *Escherichia coli* isolates in Portugal. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(3):1662-3.

Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. Analysis of the resistome of a multidrug-resistant NDM-1-producing *Escherichia coli* strain by high-throughput genome sequencing. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(9):4224-9.

Poirel L, Decousser JW, Nordmann P. Insertion sequence *ISEcp1B* is involved in expression and mobilization of a *bla*_{CTX-M} beta-lactamase gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(9):2938-45.

Poirel L, Jayol A, Bontron S, Villegas MV, Ozdamar M, Türkoglu S, et al. The *mgrB* gene as a key target for acquired resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70(1):75-80.

Poirel L, Lartigue MF, Decousser JW, Nordmann P. *ISEcp1B*-mediated transposition of *bla*_{CTX-M} in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(1):447-50.

Poirel L, Naas T, Nordmann P. Genetic support of extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14 Suppl 1:75-81.

Poole K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2005;56(1):20-51.

Portal de Segurança alimentar. Disponível em: <http://www.segurancaalimentar.com/conteudos.php?id=188>, acesso em 16/04/2018.

Poupart MC, Chanal C, Sirot D, Labia R, Sirot J. Identification of CTX-2, a novel cefotaximase from a *Salmonella mbandaka* isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991;35(7):1498-500.

Prado T, Pereira WC, Silva DM, Seki LM, Carvalho AP, Asensi MD. Detection of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in effluents and sludge of a hospital sewage treatment plant. *Lett Appl Microbiol.* 2008;46(1):136-41.

Protein BLAST database. Disponível em: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BLASTSearch&LINK_LOC=blasthome, acesso em 12/06/2018.

Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20(3):440-58, table of contents.

Quinn JP, Studemeister AE, DiVincenzo CA, Lerner SA. Resistance to imipenem in *Pseudomonas aeruginosa*: clinical experience and biochemical mechanisms. *Rev Infect Dis.* 1988;10(4):892-8.

Radice M, Power P, Di Conza J, Gutkind G. Early dissemination of CTX-M-derived enzymes in South America. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(2):602-4.

Rådström P, Sköld O, Swedberg G, Flensburg J, Roy PH, Sundström L. Transposon Tn5090 of plasmid R751, which carries an integron, is related to Tn7, Mu, and the retroelements. *J Bacteriol.* 1994;176(11):3257-68.

Ramos PI, Picão RC, Vespero EC, Pelisson M, Zuleta LF, Almeida LG, et al. Pyrosequencing-based analysis reveals a novel capsular gene cluster in a KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate identified in Brazil. *BMC Microbiol.* 2012;12:173.

Rasheed JK, Biddle JW, Anderson KF, Washer L, Chenoweth C, Perrin J, et al. Detection of the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase type 2 Carbapenem-hydrolyzing enzyme in clinical isolates of *Citrobacter freundii* and *K. oxytoca* carrying a common plasmid. J Clin Microbiol. 2008;46(6):2066-9.

RAST – Rapid Annotation using Subsystem Technology. Disponível em: <http://rast.nmpdr.org/>, acesso em 31/07/2018.

Recchia GD, Hall RM. Origins of the mobile gene cassettes found in integrons. Trends Microbiol. 1997;5(10):389-94.

Rede de vigilância a resistência aos antimicrobianos europeia. Disponível em: <http://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx>, acesso em 02/05/2018.

Rhoads A, Au KF. PacBio Sequencing and Its Applications. Genomics Proteomics Bioinformatics. 2015;13(5):278-89.

Rincón G, Radice M, Giovanakis M, Di Conza JA, Gutkind G. First report of plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump QepA in *Escherichia coli* clinical isolate ST68, in South America. Diagn Microbiol Infect Dis. 2014;79(1):70-2.

Rizzo L, Manaia C, Merlin C, Schwartz T, Dagot C, Ploy MC, et al. Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: a review. Sci Total Environ. 2013;447:345-60.

Robledo IE, Aquino EE, Santé MI, Santana JL, Otero DM, León CF, et al. Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54(3):1354-7.

Roche C, Cotter M, O Connell N, Crowley B. First identification of class A carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in the Republic of Ireland. Euro Surveill. 2009;14(13).

Rodríguez M, Holcík M, Iyer VN. Lethality and survival of *Klebsiella oxytoca* evoked by conjugative IncN group plasmids. J Bacteriol. 1995;177(22):6352-61.

Rolain JM. Food and human gut as reservoirs of transferable antibiotic resistance encoding genes. Front Microbiol. 2013;4:173.

Romão C, Miranda CA, Silva J, Mandetta Clementino M, de Filippis I, Asensi M. Presence of *qacEΔ1* gene and susceptibility to a hospital biocide in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* resistant to antibiotics. Curr Microbiol. 2011;63(1):16-21.

Rosen DA, Pinkner JS, Walker JN, Elam JS, Jones JM, Hultgren SJ. Molecular variations in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* FimH affect function and pathogenesis in the urinary tract. Infect Immun. 2008;76(7):3346-56.

Rossi F, Andreazzi DB. Resistência Bacteriana: Interpretando o antibiograma. São Paulo. 2005. Ed Atheneu: 21-26.

Rossolini GM, D'Andrea MM, Mugnaioli C. The spread of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases. Clin Microbiol Infect. 2008;14 Suppl 1:33-41.

Ruiz J, Pons MJ, Gomes C. Transferable mechanisms of quinolone resistance. Int J Antimicrob Agents. 2012;40(3):196-203.

Sampaio JL, Gales AC. Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae in Brazil: focus on β -lactams and polymyxins. *Braz J Microbiol.* 2016;47 Suppl 1:31-7.

Samuelsen Ø, Naseer U, Tofteland S, Skutlaberg DH, Onken A, Hjetland R, et al. Emergence of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates of sequence type 258 producing plasmid-mediated KPC carbapenemase in Norway and Sweden. *J Antimicrob Chemother.* 2009;63(4):654-8.

Santini JM, Stanisich VA. Both the *fipA* gene of pKM101 and the *pifC* gene of F inhibit conjugal transfer of RP1 by an effect on *traG*. *J Bacteriol.* 1998;180(16):4093-101

Sartori L, Fernandes MR, lenne S, de Souza TA, Gregory L, Cerdeira L, et al. Draft genome sequences of two fluoroquinolone-resistant CTX-M-15-producing *Escherichia coli* ST90 (ST23 complex) isolated from a calf and a dairy cow in South America. *J Glob Antimicrob Resist.* 2017;11:145-7.

Scarpate E, Cossatis J. A presença da *Klebsiella pneumoniae* produtora de β -lactamase de Espectro Estendido no ambiente hospitalar. *Saúde & Amb. Rev.* 2009. p. 1-11.

Schneiders T, Levy SB. MarA-mediated transcriptional repression of the *rob* promoter. *J Biol Chem.* 2006;281(15):10049-55.

Schultsz C, Geerlings S. Plasmid-mediated resistance in Enterobacteriaceae: changing landscape and implications for therapy. *Drugs.* 2012;72(1):1-16.

Seara N, Oteo J, Carrillo R, Pérez-Blanco V, Mingorance J, Gómez-Gil R, et al. Interhospital spread of NDM-7-producing *Klebsiella pneumoniae* belonging to ST437 in Spain. *Int J Antimicrob Agents.* 2015;46(2):169-73.

Sebghati TA, Clegg S. Construction and characterization of mutations within the *Klebsiella* mrkD1P gene that affect binding to collagen type V. *Infect Immun*. 1999;67(4):1672-6.

Seki LM, Pereira PS, de Souza MaP, Conceição MeS, Marques EA, Porto CO, et al. Molecular epidemiology of KPC-2- producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Brazil: the predominance of sequence type 437. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011;70(2):274-7.

Sellera FP, Fernandes MR, Moura Q, Souza TA, Nascimento CL, Cerdeira L, et al. Draft genome sequence of an extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate belonging to ST644 isolated from a footpad infection in a Magellanic penguin (*Spheniscus magellanicus*). *J Glob Antimicrob Resist*. 2018;12:88-9.

Shaw KJ, Rather PN, Hare RS, Miller GH. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Rev*. 1993;57(1):138-63.

Shen P, Jiang Y, Zhou Z, Zhang J, Yu Y, Li L. Complete nucleotide sequence of pKP96, a 67 850 bp multiresistance plasmid encoding *qnrA1*, *aac(6')-Ib-cr* and *bla_{CTX-M-24}* from *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother*. 2008;62(6):1252-6.

Shen P, Wei Z, Jiang Y, Du X, Ji S, Yu Y, et al. Novel genetic environment of the carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2 among Enterobacteriaceae in China. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(10):4333-8.

Siguié P, Gourbeyre E, Chandler M. Bacterial insertion sequences: their genomic impact and diversity. *FEMS Microbiol Rev*. 2014;38(5):865-91.

Skurnik D, Lasocki S, Bremont S, Muller-Serieys C, Kitzis MD, Courvalin P, et al. Development of ertapenem resistance in a patient with mediastinitis caused by *Klebsiella pneumoniae* producing an extended-spectrum beta-lactamase. J Med Microbiol. 2010;59(Pt 1):115-9.

Spratt BG. Hybrid penicillin-binding proteins in penicillin-resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae*. Nature. 1988;332(6160):173-6.

Stahlhut SG, Chattopadhyay S, Kisiela DI, Hvidtfeldt K, Clegg S, Struve C, et al. Structural and population characterization of MrkD, the adhesive subunit of type 3 fimbriae. J Bacteriol. 2013;195(24):5602-13.

Stevenson C, Hall JPJ, Brockhurst MA, Harrison E. Plasmid stability is enhanced by higher-frequency pulses of positive selection. Proc Biol Sci. 2018;285(1870).

Struve C, Bojer M, Krogfelt KA. Identification of a conserved chromosomal region encoding *Klebsiella pneumoniae* type 1 and type 3 fimbriae and assessment of the role of fimbriae in pathogenicity. Infect Immun. 2009;77(11):5016-24.

Taddei CR, Martinez MB. Fatores de Virulência I: Adesão, Invasão e Sideróforos. In: Trabulsi LR & Alterthum F. Microbiologia 6ª ed. São Paulo: Ed. Atheneu, 2015. p 143-6.

Tegmark Wisell K, Haeggman S, Gezelius L, Thompson O, Gustafsson I, Ripa T, et al. Identification of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in Sweden. Euro Surveill. 2007;12(12):E071220.3.

Toleman MA, Walsh TR. Combinatorial events of insertion sequences and ICE in Gram-negative bacteria. FEMS Microbiol Rev. 2011;35(5):912-35.

Tollentino FM, Polotto M, Nogueira ML, Lincopan N, Neves P, Mamizuka EM, et al. High prevalence of *bla*_{CTX-M} extended spectrum beta-lactamase genes in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a tertiary care hospital: first report of *bla*_{SHV-12}, *bla*_{SHV-31}, *bla*_{SHV-38}, and *bla*_{CTX-M-15} in Brazil. *Microb Drug Resist.* 2011;17(1):7-16.

Tsai YK, Fung CP, Lin JC, Chen JH, Chang FY, Chen TL, et al. *Klebsiella pneumoniae* outer membrane porins OmpK35 and OmpK36 play roles in both antimicrobial resistance and virulence. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(4):1485-93.

UniProt. Disponível em: <http://www.uniprot.org/blast/>, acesso em 29/05/2018.

Veleba M, Higgins PG, Gonzalez G, Seifert H, Schneiders T. Characterization of RarA, a novel AraC family multidrug resistance regulator in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(8):4450-8.

Villa L, García-Fernández A, Fortini D, Carattoli A. Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65(12):2518-29.

Villegas MV, Lolans K, Correa A, Kattan JN, Lopez JA, Quinn JP, et al. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(4):1553-5.

Wachino J, Arakawa Y. Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: an update. *Drug Resist Updat.* 2012;15(3):133-48.

Wachino J, Shibayama K, Kurokawa H, Kimura K, Yamane K, Suzuki S, et al. Novel plasmid-mediated 16S rRNA m1A1408 methyltransferase, NpmA,

found in a clinically isolated *Escherichia coli* strain resistant to structurally diverse aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(12):4401-9.

Wachino J, Yamane K, Shibayama K, Kurokawa H, Shibata N, Suzuki S, et al. Novel plasmid-mediated 16S rRNA methylase, RmtC, found in a *Proteus mirabilis* isolate demonstrating extraordinary high-level resistance against various aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(1):178-84.

Walsh TR. Emerging carbapenemases: a global perspective. *Int J Antimicrob Agents.* 2010;36 Suppl 3:S8-14.

Wang XD, Cai JC, Zhou HW, Zhang R, Chen GX. Reduced susceptibility to carbapenems in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates associated with plasmid-mediated beta-lactamase production and OmpK36 porin deficiency. *J Med Microbiol.* 2009;58(Pt 9):1196-202.

Wang X, Wang Y, Zhou Y, Li J, Yin W, Wang S, et al. Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, *mcr-8*, in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Emerg Microbes Infect.* 2018;7(1):122

Wang ZC, Huang CJ, Huang YJ, Wu CC, Peng HL. FimK regulation on the expression of type 1 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* CG43S3. *Microbiology.* 2013;159(Pt 7):1402-15.

Wei ZQ, Du XX, Yu YS, Shen P, Chen YG, Li LJ. Plasmid-mediated KPC-2 in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from China. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(2):763-5.

Whitfield C, Paiment A. Biosynthesis and assembly of Group 1 capsular polysaccharides in *Escherichia coli* and related extracellular polysaccharides in other bacteria. *Carbohydr Res.* 2003;338(23):2491-502.

WHO – World Health Organization (2017). One Health. Disponível em: <http://www.who.int/features/qa/one-health/en/>, acesso em 31/07/2018.

Wong MH, Chan EW, Chen S. Evolution and dissemination of OqxAB-like efflux pumps, an emerging quinolone resistance determinant among members of Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(6):3290-7.

Woodford N, Carattoli A, Karisik E, Underwood A, Ellington MJ, Livermore DM. Complete nucleotide sequences of plasmids pEK204, pEK499, and pEK516, encoding CTX-M enzymes in three major *Escherichia coli* lineages from the United Kingdom, all belonging to the international O25:H4-ST131 clone. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(10):4472-82.

Woodford N, Tierno PM, Young K, Tysall L, Palepou MF, Ward E, et al. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase, KPC-3, in a New York Medical Center. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(12):4793-9.

Woodford N, Turton JF, Livermore DM. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 2011;35(5):736-55.

Woodford N, Zhang J, Warner M, Kaufmann ME, Matos J, Macdonald A, et al. Arrival of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC carbapenemase in the United Kingdom. *J Antimicrob Chemother.* 2008;62(6):1261-4.

Wright GD. Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic? *Curr Opin Microbiol.* 2010;13(5):589-94.

Yamane K. KPC carbapenemase producing Gram-negative bacteria. *Nihon Rinsho.* 2012;70(2):267-71.

Yang TY, Lu PL, Tseng SP. Update on fosfomycin-modified genes in Enterobacteriaceae. J Microbiol Immunol Infect. 2017.

Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. 2001;45(4):1151-61.

Yokoyama K, Doi Y, Yamane K, Kurokawa H, Shibata N, Shibayama K, et al. Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. Lancet. 2003;362(9399):1888-93.

Yuan J, Xu X, Guo Q, Zhao X, Ye X, Guo Y, et al. Prevalence of the *oqxAB* gene complex in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* clinical isolates. J Antimicrob Chemother. 2012;67(7):1655-9.

Zaha, A. Biología Molecular Básica. 1ª ed. Porto Alegre: Mercado Aberto; 1996.

Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. J Antimicrob Chemother. 2012;67(11):2640-4.

Zhou Y, Yu H, Guo Q, Xu X, Ye X, Wu S, et al. Distribution of 16S rRNA methylases among different species of Gram-negative bacilli with high-level resistance to aminoglycosides. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2010;29(11):1349-53.

Zong Z, Ginn AN, Dobiasova H, Iredell JR, Partridge SR. Different IncI1 plasmids from *Escherichia coli* carry *ISEcp1-bla_{CTX-M-15}* associated with different Tn2-derived elements. Plasmid. 2015;80:118-26.

Zurfluh K, Jakobi G, Stephan R, Hächler H, Nüesch-Inderbilen M. Replicon typing of plasmids carrying *bla*_{CTX-M-1} in Enterobacteriaceae of animal, environmental and human origin. *Front Microbiol.* 2014;5:555.

ANEXOS

Anexo 1 – Aprovação do Comitê de Ética de Pesquisa



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
Comitê de Ética em Pesquisa - CEPIAL
Av. Dr. Arnaldo, 355 – Sala 83 - Cerqueira César - 01246-902
Fone: 3068-2859 e-mail: cepi@ial.sp.gov.br



São Paulo, 17 de fevereiro de 2012.

Protocolo: 008/2012
Registro CEPIAL nº 045/2011 de 05/12/11
1º Parecer – Protocolo nº 094/2011 de 20/12/11

Projeto de Pesquisa: “Caracterização de genes de resistência em *K. pneumoniae* produtoras de KPC isoladas de diversos hospitais do Estado de São Paulo”.

Pesquisador Responsável: Doroti de Oliveira Garcia

Instituição: Instituto Adolfo Lutz - IAL

O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz - CEPIAL analisou e deliberou em reunião de 16 de fevereiro de 2012, de acordo com a Resolução CNS nº 196 de 10 de outubro de 1996 e resoluções complementares, o projeto na categoria **APROVADO**.

Em conformidade com o item IX. 2 da Resolução CNS nº 196/1996 - cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo, sob sua guarda, por 5 anos, os dados da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar, perante o CEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Os relatórios parciais deverão ser encaminhados ao CEPIAL a cada seis meses a partir do início da pesquisa.

Trata-se de estudo com cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de KPC isoladas, depositadas e catalogadas no Núcleo de Coleção de Microrganismos do Centro de Procedimentos Interdisciplinares do Instituto Adolfo Lutz, com declaração expressa do responsável técnico pelo repositório, e não envolve dados secundários e/ou material biológico de humanos, dos quais foram obtidas.

Há declaração expressa da pesquisadora responsável, Doroti de Oliveira Garcia, no que se refere ao cumprimento das Normas de Biossegurança Internacionais da IATA para o transporte das cepas, a partir do IAL ao Laboratório na Faculdade de Medicina da Universidade de Pittsburgh, PA, EUA, sob responsabilidade do Professor Assistente Yohei Doi, o qual declarou colaborar nas etapas propostas no projeto.

Há declaração expressa do diretor geral do IAL, Dr. Alberto José da Silva Duarte, de ciência e concordância com o projeto.



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ

Comitê de Ética em Pesquisa - CEPIAL
Av. Dr. Arnaldo, 355 – Sala 83 - Cerqueira César - 01246-902
Fone: 3068-2859 e-mail: cepi@ial.sp.gov.br



A Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, em projeto similar, declarou não ser concernente a apreciação ética à luz da Resolução CNS 196/1996.

A aplicação da Resolução CNS 196/1996 e resoluções complementares no estudo com cepas de microrganismos, isoladas de material biológico humano, depositadas e catalogadas em repositório institucional, para as quais não há qualquer relação direta ou indireta com seres humanos, é uma questão a se compreender perfeitamente.

O CEPIAL deverá reunir-se com a CONEP para enunciar decisivamente o procedimento de análise de projetos de pesquisa com cepas de microrganismos isoladas, depositadas e catalogadas.

O CEPIAL aprova o projeto de pesquisa e não encaminhará para a CONEP nesse caso específico.

Luz Marina Trujillo
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
Instituto Adolfo Lutz – CEPIAL

1ª via - Coordenador
2ª via - Diretor Geral do IAL
3ª via - CEPIAL
LMT/dvmp

Anexo 2 – Tampões, soluções e meios utilizados

- Para PFGE:

Tris 1 M, pH 8,0

- Tris base 121,1g
- H₂O dest 800 mL
- HCl 42 mL
- H₂O ultrapura q.s.p 1000 mL

Autoclavar

EDTA 0,5M, pH 8,0

- EDTA 93,06g
- H₂O dest. 300 mL
- Ajustar pH ± 10 g de NaOH
- H₂O ultrapura q.s.p. 500 mL

Autoclavar

Tampão TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0)

- Tris 1 M pH 8,0 10 mL
- EDTA 0,5 M pH 8,0 2 mL
- H₂O ultrapura estéril q.s.p. 1000 mL

Tampão de Suspensão Celular - Cell Suspension Buffer – CSB (100 mM

Tris, 100 mM EDTA, pH 8,0)

- Tris 1 M pH 8,0 10 mL
- EDTA 0,5 M pH 8,0 20 mL
- H₂O ultrapura estéril q.s.p. 100 mL

Tampão de lise celular – Cell Lysis Buffer – CLB (50 mM Tris, 50 mM EDTA, pH 8,0, 10% sarcosil)

- Tris 1 M pH 8,0 25 mL
- EDTA 0,5 M pH 8,0 50 mL

- Sarcosil 10% 50 mL
- H₂O ultrapura estéril q.s.p. 500 mL

Agarose para plug

- 1,2g pulsed field certified agarose - ultra pure DNA grade agarose (Bio-Rad – cat 162-0137)
- 100mL TE

Agarose para eletroforese

- 1,0g agarose (SeaKem® Gold)
- 100mL H₂O ultra pura

Tampão Tris Borato (TBE)

a) TBE 5 x []

Ácido bórico	27,5 g
Tris base	54,0 g
EDTA 0,5 M pH 8,0	20 mL
H ₂ O ultrapura estéril q.s.p.	1000 mL

b) TBE 10 x []

Ácido bórico	55 g
Tris base	108,0 g
EDTA 0,5 M pH 8,0	40 mL
H ₂ O ultrapura estéril q.s.p.	1000 mL

Proteinase K

Solução estoque 20 mg/mL

Pesar 0,06 g de Proteinase K para 3 mL de água Ultrapura estéril. Estocar no freezer – 20° C da seguinte maneira: 5 microtubos com alíquota de 100 µL e o restante em alíquotas de 400 µL. Descongelar e usar somente o necessário.

Lisozima

Pesar 0,04 g de Lisozima para 1mL de água Ultrapura estéril. Estocar no freezer – 20° C em microtubo com alíquota de 100 µL.

- Para S1 Nuclease-PFGE

ES Buffer 1%

100mL de EDTA 0,5M

10g sarcosil

Estocar no freezer – 20° C

- Para transformação por eletroporação

SOC

0,5% de extrato de levedura

2% de triptona

10 mM de NaCl

2,5 mM de KCl

10 mM de MgCl₂

10 mM de MgSO₄

20 mM de glicose (adicionada após autoclavagem da solução)

Anexo 3 – Análise da possível função das proteínas hipotéticas anotadas nos 3 plasmídeos carreadores do *bla*_{KPC-2}.

Proteínas hipotéticas identificadas no plasmídeo pKP148, PINH-4900 e sua possível função.

Plasmídeo	Proteína	Início (pb)	Final (pb)	Tamanho (pb)	Orientação	Função
KPC_KP148, PINH-4900	Proteína Hipotética	705	920	216	reverse	Indeterminada
KPC_KP148, PINH-4900	Proteína Hipotética	4414	4638	225	reverse	Indeterminada
KPC_KP148, PINH-4900	Proteína Hipotética	7118	7477	360	forward	Indeterminada
KPC_KP148, PINH-4900	Proteína Hipotética	8039	8371	333	forward	Indeterminada
KPC_KP148, PINH-4900	Proteína Hipotética	8706	8963	258	forward	Indeterminada
KPC_KP148, PINH-4900	Proteína Hipotética	9177	9617	441	forward	Indeterminada
KPC_KP148, PINH-4900	Proteína Hipotética	10025	10180	156	forward	Indeterminada
KPC_KP148, PINH-4900	Proteína Hipotética	10206	10364	159	reverse	Indeterminada
KPC_KP148, PINH-4900	Proteína Hipotética	10371	10715	345	reverse	Indeterminada
KPC_KP148, PINH-4900	Proteína Hipotética	18918	19319	402	forward	Indeterminada
KPC_KP148, PINH-4900	Proteína Hipotética	19309	19665	357	forward	Proteína relacionada à quercetina dioxigenase
KPC_KP148, PINH-4900	Proteína Hipotética	19920	20234	315	forward	Indeterminada
KPC_KP148, PINH-4900	Proteína Hipotética	41710	42054	345	forward	Indeterminada
KPC_KP148, PINH-4900	Proteína Hipotética	42401	42712	312	forward	Indeterminada
KPC_KP148, PINH-4900	Proteína Hipotética	44480	44686	207	forward	Indeterminada
KPC_KP148, PINH-4900	Proteína Hipotética	48703	49638	936	reverse	Indeterminada
KPC_KP148, PINH-4900	Proteína Hipotética	51712	51888	177	reverse	Indeterminada
KPC_KP148, PINH-4900	Proteína Hipotética	52138	52272	135	forward	Indeterminada

Proteínas hipotéticas identificadas no plasmídeo pKP196, TIET-4200 e sua possível função.

Plasmídeo	Proteína	Início (pb)	Final (pb)	Tamanho (pb)	Orientação	Função
KPC_KP196, TIET-4200	Proteína Hipotética	5931	6050	120	forward	Indeterminada
KPC_KP196, TIET-4200	Proteína Hipotética	7001	7360	360	forward	Indeterminada
KPC_KP196, TIET-4200	Proteína Hipotética	7922	8254	333	forward	Indeterminada
KPC_KP196, TIET-4200	Proteína Hipotética	8589	8846	258	forward	Indeterminada
KPC_KP196, TIET-4200	Proteína Hipotética	8826	8939	114	reverse	Indeterminada
KPC_KP196, TIET-4200	Proteína Hipotética	10168	10281	114	reverse	Indeterminada
KPC_KP196, TIET-4200	Proteína Hipotética	10402	10842	441	forward	Indeterminada
KPC_KP196, TIET-4200	Proteína Hipotética	11250	11405	156	forward	Indeterminada
KPC_KP196, TIET-4200	Proteína Hipotética	11431	11589	159	reverse	Indeterminada
KPC_KP196, TIET-4200	Proteína Hipotética	11596	11940	345	reverse	Indeterminada
KPC_KP196, TIET-4200	Proteína Hipotética	21200	21601	402	forward	Indeterminada
KPC_KP196, TIET-4200	Proteína Hipotética	21591	21947	357	forward	Proteína relacionada à quercetina dioxigenase
KPC_KP196, TIET-4200	Proteína Hipotética	22202	22516	315	forward	Indeterminada
KPC_KP196, TIET-4200	Proteína Hipotética	43992	44336	345	forward	Indeterminada
KPC_KP196, TIET-4200	Proteína Hipotética	44683	44994	312	forward	Indeterminada
KPC_KP196, TIET-4200	Proteína Hipotética	46762	46968	207	forward	Indeterminada
KPC_KP196, TIET-4200	Proteína Hipotética	50271	50480	210	forward	Recombinação e ligação de DNA
KPC_KP196, TIET-4200	Proteína Hipotética	50515	50820	306	forward	Indeterminada
KPC_KP196, TIET-4200	Proteína Hipotética	50817	51011	195	forward	Indeterminada
KPC_KP196, TIET-4200	Proteína Hipotética	51017	51448	432	forward	Recombinação e ligação de DNA
KPC_KP196, TIET-4200	Proteína Hipotética	51445	51597	153	forward	Indeterminada
KPC_KP196, TIET-4200	Proteína Hipotética	51594	52499	906	reverse	Indeterminada
KPC_KP196, TIET-4200	Proteína Hipotética	54603	54779	177	reverse	Indeterminada
KPC_KP196, TIET-4200	Proteína Hipotética	55065	55874	810	reverse	Indeterminada

Proteínas hipotéticas identificadas no plasmídeo pKP314/11a sua possível função.

Plasmídeo	Proteína	Início (pb)	Final (pb)	Tamanho (pb)	Orientação	Função
KPC_Kp314	Proteína Hipotética	705	920	216	reverse	Indeterminada
KPC_Kp314	Proteína Hipotética	981	1196	216	forward	Indeterminada
KPC_Kp314	Proteína Hipotética	5931	6050	120	forward	Indeterminada
KPC_Kp314	Proteína Hipotética	7001	7360	360	forward	Indeterminada
KPC_Kp314	Proteína Hipotética	7922	8254	333	forward	Indeterminada
KPC_Kp314	Proteína Hipotética	8589	8846	258	forward	Indeterminada
KPC_Kp314	Proteína Hipotética	8826	8939	114	reverse	Indeterminada
KPC_Kp314	Proteína Hipotética	8923	9138	216	reverse	Indeterminada
KPC_Kp314	Proteína Hipotética	9409	9540	132	reverse	Indeterminada
KPC_Kp314	Proteína Hipotética	10168	10281	114	reverse	Indeterminada
KPC_Kp314	Proteína Hipotética	11253	11408	156	forward	Indeterminada
KPC_Kp314	Proteína Hipotética	11434	11592	159	reverse	Indeterminada
KPC_Kp314	Proteína Hipotética	11599	11943	345	reverse	Indeterminada
KPC_Kp314	Proteína Hipotética	13693	13902	210	reverse	Indeterminada
KPC_Kp314	Proteína Hipotética	20146	20547	402	forward	Indeterminada
KPC_Kp314	Proteína Hipotética	20537	20893	357	forward	Proteína relacionada à quercetina dioxigenase
KPC_Kp314	Proteína Hipotética	21148	21462	315	forward	Indeterminada
KPC_Kp314	Proteína Hipotética	42938	43282	345	forward	Indeterminada
KPC_Kp314	Proteína Hipotética	43629	43940	312	forward	Indeterminada
KPC_Kp314	Proteína Hipotética	45708	45914	207	forward	Indeterminada
KPC_Kp314	Proteína Hipotética	49780	49935	156	forward	Indeterminada
KPC_Kp314	Proteína Hipotética	49932	50837	906	reverse	Indeterminada
KPC_Kp314	Proteína Hipotética	52941	53117	177	reverse	Indeterminada
KPC_Kp314	Proteína Hipotética	53382	53501	120	forward	Indeterminada
KPC_Kp314	Proteína Hipotética	53507	54565	1,059	reverse	Indeterminada

Anexo 4 – Protocolo de Hibridação por sonda marcada

Foi realizada a técnica de hibridação com dois kits, sendo um deles Biotin DecaLabel DNA Labeling (Thermo Scientific) e outro kit DIG DNA Labeling and Detection (Roche, Alemanha). As etapas de PCR e purificação do produto de PCR, S1-Nuclease PFGE, transferência, hibridação e lavagem foi igual para ambos os kits, sendo somente a preparação da sonda e a detecção diferentes.

PCR e purificação do produto de PCR

1. Realizou-se 10 reações (volume final = 50 μ L) de PCR utilizando os primers para detecção de *bla*_{CTX-M-15} (Muzaheed et al, 2008).
2. Juntou-se os volumes de todas as 10 reações e adicionou-se 50 μ L (0,1 volume) de acetato de sódio 3M e 1,1 mL (2 volumes) de etanol 100% frio.
3. Misturou-se por inversão e manteve-se a – 20°C por 18-24 h
4. Centrifugou-se a 12.000 rpm por 30 minutos a 4°C.
5. Desprezou-se o sobrenadante e lavou-se o sedimento com 1000 μ L etanol 70% resfriado previamente. Centrifugou-se novamente como descrito acima
6. Deixou-se o sedimento secar a temperatura ambiente.
7. Ressuspender em 500 μ L de tampão TE. Estocou-se a – 20 °C até o momento do uso

Preparo da sonda

Kit Thermo Scientific

1. Adicionou-se os seguintes componentes em um eppendorf de 1,5 mL: 10 μ L do DNA molde, 10 μ L Decanucleotideo em 5x Reaction Buffer e 24 μ L de água, nuclease-free. Agitou-se em vórtex e centrifugou-se em microcentrífuga (Spin) por 3-5 segundos.

2. Incubou-se o tubo em banho-maria fervente por 5-10 minutos e esfriou-se no gelo. Centrifugou-se (Spin) rapidamente.
3. Adicionou-se os seguintes componentes no mesmo tubo: 5 μL de Biotin Labeling Mix e 1 μL Klenow fragment, exo- (5u).
4. Agitou-se o tubo e centrifugou-se em microcentrífuga (Spin) por 3-5 segundos. Incubou-se por 20 hora a 37°C.
5. Parou-se a reação pela adição de 1 μL de EDTA 0,5 M, pH 8,0.

O DNA marcado é usado diretamente para a hibridação ou estocado a -20°C até o momento do uso.

Kit Roche

1. Adicionou-se 15 μL de DNA molde em um eppendorf e colocou-se em banho maria fervente por 10 min, esfriou-se em banho de gelo e adicionou-se os seguintes componentes 2 μL da mistura de hexanucleotídeos (vial 5), 2 μL de dNTP (vial 6) e 1 μL da enzima Klenow (vial 7).
2. Centrifugou-se em microcentrífuga (Spin) por 3-5 segundos e colocou-se em banho maria a 37 °C por 18 h.
3. Parou-se a reação pela adição de 2 μL de EDTA 0,2 M.
4. Adicionou-se 2,5 μL de cloreto de lítio 4 M e 70 μL de etanol frio. Misturou-se por inversão e deixou-se a -20 °C overnight.
5. Cetrifugou-se a 12.000 rpm por 15 min e lavou-se o sedimento com 100 μL de etanol frio. Repetiu-se a centrifugação conforme descrito anteriormente.
6. Desprezou-se o sobrenadante e deixou-se secar completamente a temperatura ambiente. Adicionou-se 50 μL de tampão TE+SDS 0,1% e estocou-se à -20 °C até o momento do uso.

Transferência para membrana de nylon

1. Cortou-se a membrana de acordo com o molde e tratou-se com água destilada, aproximadamente 5 minutos.
2. Umedeceu-se a membrana com solução 20X SSC.
3. Umedeceu-se com água a tela de suporte do equipamento VACU-Gene.
4. Colocou-se no equipamento: a tela de suporte umidificada, a membrana e a máscara plástica e fechou-se o equipamento.
5. Colocou-se o gel sobre a membrana.
6. Ligou-se a bomba a vácuo e ajustou-se a pressão para 50 mbar
7. Cobriu-se o gel com 250 mL de solução HCl 0,25 M e deixou-se por 15 minutos.
8. Removeu-se essa solução e cobriu-se o gel com 300 mL de solução desnaturação por 15 minutos.
9. Removeu-se essa solução e cobriu-se o gel com 300 mL de solução neutralizadora por 15 minutos.
10. Removeu-se a solução e cobriu-se o gel com solução 20X SSC. Iniciou-se a transferência (60 minutos).
11. Desligou-se a bomba a vácuo
12. Corou-se o gel com brometo de etídeo por 20 minutos e descorou-se por 20 minutos.
13. Visualizou-se, no fotodocumentador de géis, se as bandas foram efetivamente transferidas para a membrana (não deve aparecer bandas, ou aparecer bem fracas).
14. Fixou-se o DNA à membrana utilizando o equipamento “Stratalinker” – 1.200 μ J.
15. Enrolou-se a membrana, deixando o DNA voltado para cima e colocar na garrafa de hibridação. Estocou-se na geladeira até o momento do uso.

Hibridação

Tampão de hibridação (para uma membrana)

10 mL de formamida

5 mL de 20X SSC

4 mL de solução bloqueadora 10% (Blocking solution do kit de detecção)

0,2 mL de N-laurilsarcosina 10%

0,04 mL de SDS 10%

0,76 mL de H₂O destilada

Pré-hibridação

1. Umedeceu-se a membrana com 20 mL de tampão 2 X SSC.
2. Colocou-se 10 mL de tampão de hibridação no fundo do tubo contendo a membrana e incubou no forno de hibridação a 42 °C por 2 h.

Hibridação

3. Desnaturou-se 50 µL de sonda marcada (colocou-se em água fervente por 10 minutos e esfriou-se em banho de gelo).
4. Adicionou-se a sonda desnaturada em 10 mL do tampão de hibridação.
5. Substituiu-se a solução de pré-hibridação pela solução contendo a sonda desnaturada.
6. Deixou-se no forno de hibridação por 18-20 h a 42 °C.

LAVAGEM

1. Lavou-se a membrana 2 vezes com 50mL 2X SSC, SDS 0,1%. Realizou-se cada lavagem por 5 minutos em temperatura ambiente.
2. Lavou-se a membrana 2 vezes com SSC 0,5X, SDS 0,1%. Realizou-se cada lavagem por 15 minutos à 68°C.

3. Removeu-se o excesso de líquido da membrana colocando-a brevemente em papel de filtro.

Detecção

Kit Thermo Scientific

1. Lavou-se a membrana em 30 mL de Blocking/washing buffer por 5 minutos em temperatura ambiente em plataforma de agitação, com moderada agitação.
2. Bloqueou-se a membrana em 30 mL de Blocking Solution por 30 minutos em temperatura ambiente com moderada agitação.
3. Preparou-se 20 mL de Streptavidina conjugada com fosfatase alcalina diluída.
4. Incubou-se a membrana em 20 mL de estreptavidina conjugada com fosfatase alcalina por 30 minutos em temperatura ambiente com moderada agitação.
5. Lavou-se a membrana em temperatura ambiente com moderada agitação com 60 mL de Blocking/washing buffer por 15 minutos. Descartou-se a solução e repetiu-se a lavagem mais uma vez com Blocking/washing buffer.
7. Colocou-se com 20 mL de Detection buffer por 10 minutos e descartou-se a solução.
8. Colocou-se 10 mL de Substrate Solution recém-preparada, em temperatura ambiente no escuro e deixou-se overnight.
9. Para parar a reação lavou-se a membrana com água Milli-Q

Kit Roche

1. Preparou-se 100 mL do tampão² e reservou-se 10 mL. Incubou-se a membrana em 90 mL do tampão 2 por 30 min a 25 °C.
2. Desprezou-se a solução e incubou-se a membrana por 30 min em 10 mL do tampão 2 acrescido de 2 µL do conjugado anti-DIG-AP

3. Desprezou-se essa solução e lavou-se 2 vezes a membrana com 50 mL de tampão de lavagem por 15 min
4. Retirou-se a membrana do tubo e colocou-se em recipiente de vidro limpo
5. Equilibrou-se a membrana com 20 mL de tampão 3 + MgCl₂ por 4-5 min
6. Adicionou-se a solução reveladora preparada anteriormente e manteve-se a membrana em local escuro. Checou-se a cada 30-60 min.
7. Interrompeu-se a reação lavando-se a membrana com TE pH 8,0

Soluções e tampões utilizados

Transferência

<i>Solução de desnaturação</i>	NaCl 1,5 M	87,66 g
	NaOH 0,5 M	20,00 g
	H ₂ O ultrapura estéril	1.000 mL

Autoclavar a 121°/15 minutos

<i>Solução de neutralização</i>	NaCl 1,5 M	87,66 g
	Tris-base 1 M	121,1 g
	H ₂ O ultrapura estéril	1.000 mL

Ajustar pH para 8,0 com aprox. 32 mL de HCl fumegante. Autoclavar a 121°C/15 minutos. Estável por 6 meses em temperatura ambiente.

<i>20 X SSC</i>	NaCl 3 M	175,32 g
	Na ₃ citrate 2H ₂ O 0,3 M	88,2 g
	H ₂ O ultrapura estéril	1.000 mL

Ajustar o pH para 7,0 com ácido cítrico (1 gota). Autoclavar a 121°/15 min.

<i>HCl 0,25 M</i>	HCl	21,55 mL
	H ₂ O ultrapura estéril	1.000 mL

Obs: colocar primeiro a água

<i>Tampão 1</i>	NaCl 150 mM	8,76 g
	Ácido Maléico 100 mM	11,6 g
	H ₂ O Milli Q	1000 mL

Ajustar o pH para 7,5 com lentilhas de NaOH. Autoclavar a 121°/15 minutos.

<i>Solução bloqueadora</i>	Tampão 1	200 mL
	Bloqueador (kit)	20 g

Estável por 6 meses a -20 °C e 2 semanas a 4 °C

<i>Tampão 2</i>	Tampão 1	90 mL
	Solução Bloqueadora	10 mL

Estável por 6 meses a -20 °C e 2 semanas a 4 °C

<i>Tampão 3</i>	NaCl 100 mM	5,84 g
	Tris-Base 100 mM	12,12 g
	H ₂ O Milli Q	950 mL

Ajustar o pH para 9,5 com gotas de HCl 5 N

Aliquotar 190 mL em 5 frascos. Autoclavar a 121°/15 minutos.

Na hora do uso: adicionar 10 mL de solução de MgCl₂ 1M. Estável por 6 meses em temperatura ambiente

<i>Tampão de lavagem</i>	Tampão 1	1000 mL
	Tween 20	3 mL

Não autoclavar

<i>Solução reveladora</i>	Tampão 3	10 mL
	NBT	45 µL
	X fosfatase	35 µL

Anexo 5 – Análise do clustal Omega comparando as sequências do gene *gyrA* e *parC* das cepas do estudo com a *K. pneumoniae* MGH78578.

```

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

gyrA148      MSDLAREITPVNIEEELKNSYLDYAMSIVVGRALPDVRDGLKPVHRRVLYAMNVLGNDWN 60
gyrA196      MSDLAREITPVNIEEELKNSYLDYAMSIVVGRALPDVRDGLKPVHRRVLYAMNVLGNDWN 60
gyrA314      MSDLAREITPVNIEEELKNSYLDYAMSIVVGRALPDVRDGLKPVHRRVLYAMNVLGNDWN 60
gyrAMGH78578 MSDLAREITPVNIEEELKNSYLDYAMSIVVGRALPDVRDGLKPVHRRVLYAMNVLGNDWN 60
*****

gyrA148      KAYKKSARVVGDVIGKYHPHGDIIVYDTIVRMAQPFSLRYMLVDGQGNFGSIDGDSAAAM 120
gyrA196      KAYKKSARVVGDVIGKYHPHGDIIVYDTIVRMAQPFSLRYMLVDGQGNFGSIDGDSAAAM 120
gyrA314      KAYKKSARVVGDVIGKYHPHGDIIVYDTIVRMAQPFSLRYMLVDGQGNFGSIDGDSAAAM 120
gyrAMGH78578 KAYKKSARVVGDVIGKYHPHGDIIVYDTIVRMAQPFSLRYMLVDGQGNFGSIDGDSAAAM 120
*****

gyrA148      RYTEIRLAKIAHELMADLEKETVDFVDNYDGTERTIPDVMPTKIPNLLVNGASGIAVGMAT 180
gyrA196      RYTEIRLAKIAHELMADLEKETVDFVDNYDGTERTIPDVMPTKIPNLLVNGASGIAVGMAT 180
gyrA314      RYTEIRLAKIAHELMADLEKETVDFVDNYDGTERTIPDVMPTKIPNLLVNGASGIAVGMAT 180
gyrAMGH78578 RYTEIRLAKIAHELMADLEKETVDFVDNYDGTERTIPDVMPTKIPNLLVNGASGIAVGMAT 180
*****

gyrA148      NIPPHNLTVEINGCLAYVDEDEISIEGLMAHIPGPDFPTAAIINGRRGIEEAYRTGRGKV 240
gyrA196      NIPPHNLTVEINGCLAYVDEDEISIEGLMAHIPGPDFPTAAIINGRRGIEEAYRTGRGKV 240
gyrA314      NIPPHNLTVEINGCLAYVDEDEISIEGLMAHIPGPDFPTAAIINGRRGIEEAYRTGRGKV 240
gyrAMGH78578 NIPPHNLTVEINGCLAYVDEDEISIEGLMAHIPGPDFPTAAIINGRRGIEEAYRTGRGKV 240
*****

gyrA148      YIRARAEEVDAKSGRETIIVHEIPYQVNKARLIEKIAELVKEKRVEGISALRDESDKDG 300
gyrA196      YIRARAEEVDAKSGRETIIVHEIPYQVNKARLIEKIAELVKEKRVEGISALRDESDKDG 300
gyrA314      YIRARAEEVDAKSGRETIIVHEIPYQVNKARLIEKIAELVKEKRVEGISALRDESDKDG 300
gyrAMGH78578 YIRARAEEVDAKSGRETIIVHEIPYQVNKARLIEKIAELVKEKRVEGISALRDESDKDG 300
*****

gyrA148      MRIVIEVKRDAVGEVVLNLYSQTQLQVDFGINMVALHHGQPKIMNLKDIIAAFVRHRRE 360
gyrA196      MRIVIEVKRDAVGEVVLNLYSQTQLQVDFGINMVALHHGQPKIMNLKDIIAAFVRHRRE 360
gyrA314      MRIVIEVKRDAVGEVVLNLYSQTQLQVDFGINMVALHHGQPKIMNLKDIIAAFVRHRRE 360
gyrAMGH78578 MRIVIEVKRDAVGEVVLNLYSQTQLQVDFGINMVALHHGQPKIMNLKDIIAAFVRHRRE 360
*****

```

```

gyrA148      VVTRRTIFELRKARDRAHILEALAVLANIDPIIELIRRAPTPAEAKTALVAQAIDLGNV 420
gyrA196      VVTRRTIFELRKARDRAHILEALAVLANIDPIIELIRRAPTPAEAKTALVAQAIDLGNV 420
gyrA314      VVTRRTIFELRKARDRAHILEALAVLANIDPIIELIRRAPTPAEAKTALVAQAIDLGNV 420
gyrAMGH78578 VVTRRTIFELRKARDRAHILEALAVLANIDPIIELIRRAPTPAEAKTALVAQAIDLGNV 420
*****

gyrA148      AAMLERAGDDAARPEWLEPEFGVRDGGKYYL TEQQAQAILDLRLQKLTGLEHEKLLDEYKE 480
gyrA196      AAMLERAGDDAARPEWLEPEFGVRDGGKYYL TEQQAQAILDLRLQKLTGLEHEKLLDEYKE 480
gyrA314      AAMLERAGDDAARPEWLEPEFGVRDGGKYYL TEQQAQAILDLRLQKLTGLEHEKLLDEYKE 480
gyrAMGH78578 AAMLERAGDDAARPEWLEPEFGVRDGGKYYL TEQQAQAILDLRLQKLTGLEHEKLLDEYKE 480
*****

gyrA148      LLEQIAELLHLIGSADRLMEVIREEELIRDQFGDERRTEITANSADINIEDLINQEDV 540
gyrA196      LLEQIAELLHLIGSADRLMEVIREEELIRDQFGDERRTEITANSADINIEDLINQEDV 540
gyrA314      LLEQIAELLHLIGSADRLMEVIREEELIRDQFGDERRTEITANSADINIEDLINQEDV 540
gyrAMGH78578 LLEQIAELLHLIGSADRLMEVIREEELIRDQFGDERRTEITANSADINIEDLINQEDV 540
*****

gyrA148      VTLSHQGVVYQPLTDYEAQRGGGKSAARIKEEDFIDRLLVANTHDTILCFSSRGR 600
gyrA196      VTLSHQGVVYQPLTDYEAQRGGGKSAARIKEEDFIDRLLVANTHDTILCFSSRGR 600
gyrA314      VTLSHQGVVYQPLTDYEAQRGGGKSAARIKEEDFIDRLLVANTHDTILCFSSRGR 600
gyrAMGH78578 VTLSHQGVVYQPLTDYEAQRGGGKSAARIKEEDFIDRLLVANTHDTILCFSSRGR 600
*****

gyrA148      WMKVYQLPEASRGARGRPVNLPLEADERITAILPVREYEEGVNFMATASGTVKKTAL 660
gyrA196      WMKVYQLPEASRGARGRPVNLPLEADERITAILPVREYEEGVNFMATASGTVKKTAL 660
gyrA314      WMKVYQLPEASRGARGRPVNLPLEADERITAILPVREYEEGVNFMATASGTVKKTAL 660
gyrAMGH78578 WMKVYQLPEASRGARGRPVNLPLEADERITAILPVREYEEGVNFMATASGTVKKTAL 660
*****

gyrA148      TEFSRPRSAGIIAVNLNEGDELIGVDLTSGQDEVMLFSAAGKVVRFKEDAVRAMGR 720
gyrA196      TEFSRPRSAGIIAVNLNEGDELIGVDLTSGQDEVMLFSAAGKVVRFKEDAVRAMGR 720
gyrA314      TEFSRPRSAGIIAVNLNEGDELIGVDLTSGQDEVMLFSAAGKVVRFKEDAVRAMGR 720
gyrAMGH78578 TEFSRPRSAGIIAVNLNEGDELIGVDLTSGQDEVMLFSAAGKVVRFKEDAVRAMGR 720
*****

gyrA148      VRGIKLAENDSVVSLIIPRGEAILTVTQNGYGKRTAAAEYPTKSRATQGVISIKV 780
gyrA196      VRGIKLAENDSVVSLIIPRGEAILTVTQNGYGKRTAAAEYPTKSRATQGVISIKV 780
gyrA314      VRGIKLAENDSVVSLIIPRGEAILTVTQNGYGKRTAAAEYPTKSRATQGVISIKV 780
gyrAMGH78578 VRGIKLAENDSVVSLIIPRGEAILTVTQNGYGKRTAAAEYPTKSRATQGVISIKV 780
*****

gyrA148      GSVVGAVQVDDCDQIMMITDAGTLVRTRVSESVIVGRNTQGVILIRTAEDENVV 840
gyrA196      GSVVGAVQVDDCDQIMMITDAGTLVRTRVSESVIVGRNTQGVILIRTAEDENVV 840
gyrA314      GSVVGAVQVDDCDQIMMITDAGTLVRTRVSESVIVGRNTQGVILIRTAEDENVV 840
gyrAMGH78578 GSVVGAVQVDDCDQIMMITDAGTLVRTRVSESVIVGRNTQGVILIRTAEDENVV 840
*****

gyrA148      EPVDDEELDAIDGSAAGDDDDIAPEADTDDDDIAEDEE 877
gyrA196      EPVDDEELDAIDGSAAGDDDDIAPEADTDDDDIAEDEE 877
gyrA314      EPVDDEELDAIDGSAAGDDDDIAPEADTDDDDIAEDEE 877
gyrAMGH78578 EPVDDEELDAIDGSAAGDDDDIAPEADTDDDDIAEDEE 877
*****

```

Análise do clustal Omega comparando as sequências do gene *gyrA* das cepas do estudo com a *K. pneumoniae* MGH78578. Em destaque a mutação 83(Tyr→Ile).

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

ParC_MGH78578   MSDMAERLALHEFTENAYLNYSMYVIMDRALPFIGDGLKPVQRRIVYAMSELGLNASAKF 60
ParC_148        MSDMAERLALHEFTENAYLNYSMYVIMDRALPFIGDGLKPVQRRIVYAMSELGLNASAKF 60
ParC_196        MSDMAERLALHEFTENAYLNYSMYVIMDRALPFIGDGLKPVQRRIVYAMSELGLNASAKF 60
ParC_314        MSDMAERLALHEFTENAYLNYSMYVIMDRALPFIGDGLKPVQRRIVYAMSELGLNASAKF 60
*****

ParC_MGH78578   KKSARTVGDVLGKYHPHGDIACYEAMVLMQPF SYRYPLVDGQGNWGAPDDPKSFAAMRY 120
ParC_148        KKSARTVGDVLGKYHPHGDIACYEAMVLMQPF SYRYPLVDGQGNWGAPDDPKSFAAMRY 120
ParC_196        KKSARTVGDVLGKYHPHGDIACYEAMVLMQPF SYRYPLVDGQGNWGAPDDPKSFAAMRY 120
ParC_314        KKSARTVGDVLGKYHPHGDIACYEAMVLMQPF SYRYPLVDGQGNWGAPDDPKSFAAMRY 120
*****

ParC_MGH78578   TESRLSKYAELLSELGQGTVDWVPNFDGTLQEPKMLPARLPNILLNGTTGIAVGMATDI 180
ParC_148        TESRLSKYAELLSELGQGTVDWVPNFDGTLQEPKMLPARLPNILLNGTTGIAVGMATDI 180
ParC_196        TESRLSKYAELLSELGQGTVDWVPNFDGTLQEPKMLPARLPNILLNGTTGIAVGMATDI 180
ParC_314        TESRLSKYAELLSELGQGTVDWVPNFDGTLQEPKMLPARLPNILLNGTTGIAVGMATDI 180
*****

ParC_MGH78578   PPHNLREVAKAAITLIEQPKTTLDEL LDIVQGPDPFTEAEIITSRAEIRKIYQNGRGSVR 240
ParC_148        PPHNLREVAKAAITLIEQPKTTLDEL LDIVQGPDPFTEAEIITSRAEIRKIYQNGRGSVR 240
ParC_196        PPHNLREVAKAAITLIEQPKTTLDEL LDIVQGPDPFTEAEIITSRAEIRKIYQNGRGSVR 240
ParC_314        PPHNLREVAKAAITLIEQPKTTLDEL LDIVQGPDPFTEAEIITSRAEIRKIYQNGRGSVR 240
*****

ParC_MGH78578   MRVWSKEDGAVVISALPHQVSGAKVLEQIAAQMRNKKLPMVDDL RDESDHENPTRLVIV 300
ParC_148        MRVWSKEDGAVVISALPHQVSGAKVLEQIAAQMRNKKLPMVDDL RDESDHENPTRLVIV 300
ParC_196        MRVWSKEDGAVVISALPHQVSGAKVLEQIAAQMRNKKLPMVDDL RDESDHENPTRLVIV 300
ParC_314        MRVWSKEDGAVVISALPHQVSGAKVLEQIAAQMRNKKLPMVDDL RDESDHENPTRLVIV 300
*****

ParC_MGH78578   PRSNRVMEQVMNHLFATTDLEKSYRINLNMIIGLDGRPAVKNLLEILSEWLVFRRDVTVR 360
ParC_148        PRSNRVMEQVMNHLFATTDLEKSYRINLNMIIGLDGRPAVKNLLEILSEWLVFRRDVTVR 360
ParC_196        PRSNRVMEQVMNHLFATTDLEKSYRINLNMIIGLDGRPAVKNLLEILSEWLVFRRDVTVR 360
ParC_314        PRSNRVMEQVMNHLFATTDLEKSYRINLNMIIGLDGRPAVKNLLEILSEWLVFRRDVTVR 360
*****

```

```

ParC_MGH78578  RLNRHLEKVLKRLHILEGLLVAFNLNIDEVIEIIRTEDEPKPALMSRFGISETQAEAIL 420
ParC_148       RLNRHLEKVLKRLHILEGLLVAFNLNIDEVIEIIRTEDEPKPALMSRFGISETQAEAIL 420
ParC_196       RLNRHLEKVLKRLHILEGLLVAFNLNIDEVIEIIRTEDEPKPALMSRFGISETQAEAIL 420
ParC_314       RLNRHLEKVLKRLHILEGLLVAFNLNIDEVIEIIRTEDEPKPALMSRFGISETQAEAIL 420
*****

ParC_MGH78578  KLRHLAKLEEMKIRGEQSELEKERDQLQAILASERKMNNLLKKEQLQADADAFGDDRRSPL 480
ParC_148       KLRHLAKLEEMKIRGEQSELEKERDQLQAILASERKMNNLLKKEQLQADADAFGDDRRSPL 480
ParC_196       KLRHLAKLEEMKIRGEQSELEKERDQLQAILASERKMNNLLKKEQLQADADAFGDDRRSPL 480
ParC_314       KLRHLAKLEEMKIRGEQSELEKERDQLQAILASERKMNNLLKKEQLQADADAFGDDRRSPL 480
*****

ParC_MGH78578  HEREEAKAMSEHDMLPSEPVTIVLSQMGWVRSAGKHDIDAQGLSYKAGDSWKASAKGKSN 540
ParC_148       HEREEAKAMSEHDMLPSEPVTIVLSQMGWVRSAGKHDIDAQGLSYKAGDSWKASAKGKSN 540
ParC_196       HEREEAKAMSEHDMLPSEPVTIVLSQMGWVRSAGKHDIDAQGLSYKAGDSWKASAKGKSN 540
ParC_314       HEREEAKAMSEHDMLPSEPVTIVLSQMGWVRSAGKHDIDAQGLSYKAGDSWKASAKGKSN 540
*****

ParC_MGH78578  QPVVFDITGRSYAIDPITLPSARGQGEPLTGKLTLPFGATVEHMLMESDDQKLLMASDA 600
ParC_148       QPVVFDITGRSYAIDPITLPSARGQGEPLTGKLTLPFGATVEHMLMESDDQKLLMASDA 600
ParC_196       QPVVFDITGRSYAIDPITLPSARGQGEPLTGKLTLPFGATVEHMLMESDDQKLLMASDA 600
ParC_314       QPVVFDITGRSYAIDPITLPSARGQGEPLTGKLTLPFGATVEHMLMESDDQKLLMASDA 600
*****

ParC_MGH78578  GYGFVCTFNDLVARNRAGKALITLPDVAHVMPPLVIEDESMDLLAITAAGRMLMFPVSDL 660
ParC_148       GYGFVCTFNDLVARNRAGKALITLPDVAHVMPPLVIEDESMDLLAITAAGRMLMFPVSDL 660
ParC_196       GYGFVCTFNDLVARNRAGKALITLPDVAHVMPPLVIEDESMDLLAITAAGRMLMFPVSDL 660
ParC_314       GYGFVCTFNDLVARNRAGKALITLPDVAHVMPPLVIEDESMDLLAITAAGRMLMFPVSDL 660
*****

ParC_MGH78578  PQLSKGKGNKIISIPAAEAAAGQDGLAHLFVLPQSTLTIHVGRKIKLRPEELQKVTGE 720
ParC_148       PQLSKGKGNKIISIPAAEAAAGQDGLAHLFVLPQSTLTIHVGRKIKLRPEELQKVTGE 720
ParC_196       PQLSKGKGNKIISIPAAEAAAGQDGLAHLFVLPQSTLTIHVGRKIKLRPEELQKVTGE 720
ParC_314       PQLSKGKGNKIISIPAAEAAAGQDGLAHLFVLPQSTLTIHVGRKIKLRPEELQKVTGE 720
*****

ParC_MGH78578  RRRGSLMRGLQKIDRVEIDSPRAAAGDSEE 752
ParC_148       RRRGSLMRGLQKIDRVEIDSPRAAAGDSEE 752
ParC_196       RRRGSLMRGLQKIDRVEIDSPRAAAGDSEE 752
ParC_314       RRRGSLMRGLQKIDRVEIDSPRAAAGDSEE 752
*****

```

Análise do clustal Omega comparando as sequências do gene *parC* das cepas do estudo com a *K. pneumoniae* MGH78578. Em destaque a mutação 80(Ser→Ile).

Anexo 6 – Análise do clustal Omega comparando as sequências do gene *mrkD* dos isolados do estudo.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

mrkD_148	ATGTCGCTGAGGAAATTAACGCTTTTATCGTCTTAATGGCGCTGGGAACCACTCG	60	mrkD_148	TCCTACGACTGGGAGAGCGGCGTAACCCGATCCTCGAAACCTATCTGAGCGCAACGCC	540
mrkD_196	ATGTCGCTGAGGAAATTAACGCTTTTATCGTCTTAATGGCGCTGGGAACCACTCG	60	mrkD_196	TCCTACGACTGGGAGAGCGGCGTAACCCGATCCTCGAAACCTATCTGAGCGCAACGCC	540
mrkD_314	ATGTCGCTGAGGAAATTAACGCTTTTATCGTCTTAATGGCGCTGGGAACCACTCG	60	mrkD_314	TCCTACGACTGGGAGAGCGGCGTAACCCGATCCTCGAAACCTATCTGAGCGCAACGCC	540

mrkD_148	TCCTGGGCTCCTGTACGCGTCTCTCATCGCCAACGGTGATGCTGGACATGGTGGTGGC	120	mrkD_148	ATCACCGTGGTCTCGCCCTCCTGTTCCGGTGTGAGCGGGAAAAATGAATGTCGATGTG	600
mrkD_196	TCCTGGGCTCCTGTACGCGTCTCTCATCGCCAACGGTGATGCTGGACATGGTGGTGGC	120	mrkD_196	ATCACCGTGGTCTCGCCCTCCTGTTCCGGTGTGAGCGGGAAAAATGAATGTCGATGTG	600
mrkD_314	TCCTGGGCTCCTGTACGCGTCTCTCATCGCCAACGGTGATGCTGGACATGGTGGTGGC	120	mrkD_314	ATCACCGTGGTCTCGCCCTCCTGTTCCGGTGTGAGCGGGAAAAATGAATGTCGATGTG	600

mrkD_148	AGGGTGGTGGTGCCCGGATCTGCCGGTGGGCTCGGTGATCCTTACCCGCGACTGGACG	180	mrkD_148	GGTTCATCCGGCGCACCACCTGAAAGGGGTGCGCACACCGCCGGCGGGAAGGATTTT	660
mrkD_196	AGGGTGGTGGTGCCCGGATCTGCCGGTGGGCTCGGTGATCCTTACCCGCGACTGGACG	180	mrkD_196	GGTTCATCCGGCGCACCACCTGAAAGGGGTGCGCACACCGCCGGCGGGAAGGATTTT	660
mrkD_314	AGGGTGGTGGTGCCCGGATCTGCCGGTGGGCTCGGTGATCCTTACCCGCGACTGGACG	180	mrkD_314	GGTTCATCCGGCGCACCACCTGAAAGGGGTGCGCACACCGCCGGCGGGAAGGATTTT	660

mrkD_148	ATGAGCGCTCCCGCGGGCAAGCTATCGCTGACTTCCGGCACCACCGCTTTGCGGCG	240	mrkD_148	AATATCGACTGCAAGTGCAGCGCGGCCCTGAGTGAACGGGATATGCCAACATTAGCACC	720
mrkD_196	ATGAGCGCTCCCGCGGGCAAGCTATCGCTGACTTCCGGCACCACCGCTTTGCGGCG	240	mrkD_196	AATATCGACTGCAAGTGCAGCGCGGCCCTGAGTGAACGGGATATGCCAACATTAGCACC	720
mrkD_314	ATGAGCGCTCCCGCGGGCAAGCTATCGCTGACTTCCGGCACCACCGCTTTGCGGCG	240	mrkD_314	AATATCGACTGCAAGTGCAGCGCGGCCCTGAGTGAACGGGATATGCCAACATTAGCACC	720

mrkD_148	AAGATCGTGTGCCAGGGCCACGGACCTTGGAATAAAAATCTACTCCACCAACGTGCCG	300	mrkD_148	TCGTTCTCCGGTACCCTGGCCACCAGCACTACCCTACCATGGGCGCCTTGTGAATGAA	780
mrkD_196	AAGATCGTGTGCCAGGGCCACGGACCTTGGAATAAAAATCTACTCCACCAACGTGCCG	300	mrkD_196	TCGTTCTCCGGTACCCTGGCCACCAGCACTACCCTACCATGGGCGCCTTGTGAATGAA	780
mrkD_314	AAGATCGTGTGCCAGGGCCACGGACCTTGGAATAAAAATCTACTCCACCAACGTGCCG	300	mrkD_314	TCGTTCTCCGGTACCCTGGCCACCAGCACTACCCTACCATGGGCGCCTTGTGAATGAA	780

mrkD_148	GGAAATCGGCATGCGTTTCAGCGCGAATGGCGCAACGGTAAATATCGTCTATCCGACGTC	360	mrkD_148	CTGCAGTTTAATAAGAAATACACCGTCCGGCCGCTTGAATAATCAGGAGACCCGCTACATC	900
mrkD_196	GGAAATCGGCATGCGTTTCAGCGCGAATGGCGCAACGGTAAATATCGTCTATCCGACGTC	360	mrkD_196	CTGCAGTTTAATAAGAAATACACCGTCCGGCCGCTTGAATAATCAGGAGACCCGCTACATC	900
mrkD_314	GGAAATCGGCATGCGTTTCAGCGCGAATGGCGCAACGGTAAATATCGTCTATCCGACGTC	360	mrkD_314	CTGCAGTTTAATAAGAAATACACCGTCCGGCCGCTTGAATAATCAGGAGACCCGCTACATC	900

mrkD_148	TTTTCGTCCGGGTATATAACACCACCAACTATTCCTCGAAGGGTCCGCGCTTACGCTG	420	mrkD_148	ACCATACCGCTGCACGCGCGTTTTATCAGTATGGCCCAGCACCAGCACCGGCGAGGTG	960
mrkD_196	TTTTCGTCCGGGTATATAACACCACCAACTATTCCTCGAAGGGTCCGCGCTTACGCTG	420	mrkD_196	ACCATACCGCTGCACGCGCGTTTTATCAGTATGGCCCAGCACCAGCACCGGCGAGGTG	960
mrkD_314	TTTTCGTCCGGGTATATAACACCACCAACTATTCCTCGAAGGGTCCGCGCTTACGCTG	420	mrkD_314	ACCATACCGCTGCACGCGCGTTTTATCAGTATGGCCCAGCACCAGCACCGGCGAGGTG	960

mrkD_148	CAGATTATCAAACCGCGGCAACCACCGCAGCGGCACCTGGCGGCGGGTAAGTACACC	480	mrkD_148	GAGTCGCATATGATCTTTAACCTGACGTACGATTAA	996
mrkD_196	CAGATTATCAAACCGCGGCAACCACCGCAGCGGCACCTGGCGGCGGGTAAGTACACC	480	mrkD_196	GAGTCGCATATGATCTTTAACCTGACGTACGATTAA	996
mrkD_314	CAGATTATCAAACCGCGGCAACCACCGCAGCGGCACCTGGCGGCGGGTAAGTACACC	480	mrkD_314	GAGTCGCATATGATCTTTAACCTGACGTACGATTAA	996

Comparação da sequência de nucleotídeos do *mrkD* dos três isolados do estudo feita pelo Clustal Omega. Em destaque a troca de nucleotídeos na posição 326.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

mrkD_148      MSLRKLLTLFIVLMALGTTSSWASCTRLSSPTVMLDMVGRVVVPPDLPVGSVILTRDWT      60
mrkD_196      MSLRKLLTLFIVLMALGTTSSWASCTRLSSPTVMLDMVGRVVVPPDLPVGSVILTRDWT      60
mrkD_314      MSLRKLLTLFIVLMALGTTSSWASCTRLSSPTVMLDMVGRVVVPPDLPVGSVILTRDWT      60
*****

mrkD_148      MSAPGGASYRCTSGTNRFAAKIVSPGATDLGNKIYSTNVPGIGMRFSPDQATVNIIVYPDV      120
mrkD_196      MSAPGGASYRCTSGTNRFAAKIVSPGATDLGNKIYSTNVPGIGMRFSPDQATVNIIVYPDV      120
mrkD_314      MSAPGGASYRCTSGTNRFAAKIVSPGATDLGNKIYSTNVPGIGMRFSPDQATVNIIVYPDV      120
*****

mrkD_148      FSSRVYNTTNYSLGSRFTLQIIKTAATTGSGTLAAGKYTSYDNESGGNPILETYLSANA      180
mrkD_196      FSSRVYNTTNYSLGSRFTLQIIKTAATTGSGTLAAGKYTSYDNESGGNPILETYLSANA      180
mrkD_314      FSSRVYNTTNYSLGSRFTLQIIKTAATTGSGTLAAGKYTSYDNESGGNPILETYLSANA      180
*****

mrkD_148      ITVWSPSCSVLSGKNMNVVGVSIIRTDLKGVTGTTAGGKDFNIDLQCSGGLSETGYANIST      240
mrkD_196      ITVWSPSCSVLSGKNMNVVGVSIIRTDLKGVTGTTAGGKDFNIDLQCSGGLSETGYANIST      240
mrkD_314      ITVWSPSCSVLSGKNMNVVGVSIIRTDLKGVTGTTAGGKDFNIDLQCSGGLSETGYANIST      240
*****

mrkD_148      SFSGLATSTTATMGALLNEKAGSGMAKGIGIQVLKDGSPQLQFNKKYTVGRLNNQETRYI      300
mrkD_196      SFSGLATSTTATMGALLNEKAGSGMAKGIGIQVLKDGSPQLQFNKKYTVGRLNNQETRYI      300
mrkD_314      SFSGLATSTTATMGALLNEKAGSGMAKGIGIQVLKDGSPQLQFNKKYTVGRLNNQETRYI      300
*****

mrkD_148      TIPLHARFYQYGPTTSTGEVESHMIFNLTYD      331
mrkD_196      TIPLHARFYQYGPTTSTGEVESHMIFNLTYD      331
mrkD_314      TIPLHARFYQYGPTTSTGEVESHMIFNLTYD      331
*****

```

Comparação da sequência de aminoácidos do *mrkD* dos três isolados do estudo feita pelo Clustal Omega. Em destaque a troca de aminoácido na posição 109.