UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudo genético da resistência aos antibióticos beta-lactâmicos, quinolonas e
aminoglicosídeos em bactérias isoladas de pacientes com suspeita de
meningite no Estado de São Paulo

Anelise Stella Ballaben

Ribeirão Preto

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Estudo genético da resistência aos antibióticos beta-lactâmicos, quinolonas e aminoglicosídeos em bactérias isoladas de pacientes com suspeita de meningite no Estado de São Paulo

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Bioagentes e Biotecnologia Aplicados à Farmácia.

Orientada: Anelise Stella Ballaben

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia da Costa Darini

Ribeirão Preto

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

Ballaben, Anelise Stella

Estudo genético da resistência aos antibióticos beta-lactâmicos, quinolonas e aminoglicosídeos em bactérias isoladas de pacientes com suspeita de meningite no Estado de São Paulo

93p.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Bioagentes e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Darini, Ana Lúcia da Costa

1. β-lactamases. 2. AMEs. 3. Bacilos gram-negativos. 4. LCR

FOLHA DE APROVAÇÃO

Anelise Stella Ballaben

Estudo genético da resistência aos antibióticos beta-lactâmicos, quinolonas e aminoglicosídeos em bactérias isoladas de pacientes com suspeita de meningite no Estado de São Paulo

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Bioagentes e Biotecnologia Aplicados à Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia da Costa Darini

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr		
Instituição:	Assinatura:	
Prof. Dr.		
Instituição:	Assinatura:	
Prof. Dr.		
Instituição:	Assinatura:	
Prof. Dr.		
Instituição:	Assinatura:	
Prof. Dr		
Instituição:	Assinatura:	

Dedico este trabalho à minha família, minha mãe Denise, meus avós Rodarte (in memoriam) e Maria Alice e minha bisavó Mercedes (in memoriam). Gratidão imensa por todo amor, incentivo, força e compreensão em todos os momentos. Sem dúvidas nenhuma, sem você, mãe, essa conquista não seria possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus e todos os espíritos de luz por me iluminarem, guardarem e guiarem pelos melhores caminhos, sempre me dando forças para vencer cada obstáculo em minha vida.

À minha mãe, Denise Helena Ballaben, por jamais me deixar cair, por sempre me apoiar e comemorar minhas conquistas comigo. Por seu amor incondicional, por seu espírito iluminado, por sua garra imensurável. Minha eterna gratidão, meu amor.

Ao meu inesquecível avô, Rodarte Ballaben (*in memoriam*), por ter me proporcionado a melhor vida que eu poderia ter. Por ter me ensinado a ser um espírito melhor, e por ter a certeza que, independentemente de onde estiver, sempre estaria caminhando ao meu lado. Saudades eternas, meu querido pai/avô.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a Ana Lúcia da Costa Darini, pela oportunidade, pelos ensinamentos diários, pela confiança, pela paciência, pelos incentivos, por sempre buscar mais de mim pois sabia que eu era capaz. Minha eterna gratidão, admiração e respeito. Obrigada por tudo!

Ao meu co-orientador, Prof^o. Dr^o. Leonardo Neves de Andrade, pelos ensinamentos e pela confiança em mim depositados. Serei sempre muito grata!

Aos amigos de pós-graduação e do LEBEM, Renata Galetti, Joseane Cristina Ferreira, Mariana Saffi, Amanda Seribelli, Marcelo Ferreira, Ludmilla Tonani, Natalia Columbaro e Rubens Eduardo da Silva pela amizade sincera, momentos prazerosos de descontração e, por terem feito essa jornada ainda mais especial. As amizades verdadeiras fazem diferença em nossa vida.

À Dr^a. Doroti de Oliveira Garcia, Diretora e Pesquisadora do Instituto Adolfo Lutz, por todo carinho, paciência e confiança. Por sempre me ajudar e orientar em toda a minha trajetória na pós-graduação. Eterna gratidão e admiração por tudo.

Ao Dr. Paulo da Silva, Pesquisador do Instituto Adolfo Lutz, por toda ajuda, atenção e amizade durante todo o trabalho. Aos demais amigos do IAL, Ana Maria, Marta Inês, Ana Paula e Silvia por toda competência, amizade e colaboração que foram essenciais para a realização deste trabalho.

Ao Dr^o Yohei Doi pela oportunidade, supervisão e grande colaboração ao meu amadurecimento tanto pessoal quanto profissional durante estágio em seu laboratório. Levarei para sempre essa experiencia maravilhosa que pude vivenciar. Agradeço também aos colegas e pesquisadores da *University of Pittsburgh, School of Medicine*, Christi Lee, Roberta Mettus, Sarah Bowler, Alina Ivleva e Bennie Zhu, por todo companheirismo e por terem feito da minha experiência ainda melhor.

Agradeço todos os pesquisadores que, gentilmente, cederam as linhagens bacterianas utilizadas como controle neste trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia da FCFRP-USP, pelos esforços para oferecer sempre as melhores oportunidades científicas e acadêmicas. Agradeço também aos funcionários Henrique Theodoro, Rosana Florência e Ana Lúcia Turatti pela competência e gentileza durante toda a minha jornada na pósgraduação.

À FAPESP pelas bolsas de doutorado direto (Processo nº 2015/23484-9), BEPE (Processo nº 2017/11707-9) e Projeto Temático (Processo nº 2014/14494-8) concedidas.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

A lei da mente é implacável.

O que você pensa, você cria;

O que você sente, você atrai;

O que você acredita

Torna-se realidade.

(Buda)

i

RESUMO

BALLABEN, A.S. Estudo genético da resistência aos antibióticos beta-lactâmicos, quinolonas e aminoglicosídeos em bactérias isoladas de pacientes com suspeita de meningite no Estado de São Paulo. 2019. 93f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto — Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

No Brasil, existem poucos relatos de membros da Ordem Enterobacterales isoladas de líquido céfalo raquidiano causando meningite. Nos últimos 20 anos, bacilos gramnegativos (BGN) produtores de beta-lactamases se tornaram um dos principais desafios para o tratamento das infecções, principalmente pela pandemia das enzimas CTX-M e KPC. Este trabalho teve como objetivo investigar a genética e epidemiologia molecular da resistência aos antibióticos de importância clínica no tratamento de infecções causadas por membros da Ordem Enterobacterales e bacilos gram-negativos não fermentadores (BGN-NF) isolados de pacientes com suspeita de meningite no Estado de São Paulo. Foram estudados 66 isolados de membros da Ordem Enterobacterales e BGN-NF resistentes aos antibióticos beta-lactâmicos de amplo espectro cujas investigações microbiológicas foram previamente realizadas nos Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto e São Paulo. Essas bactérias foram isoladas de sangue e LCR de pacientes com suspeita de meningite, no período de 2007 a 2014. Os genes codificadores de beta-lactamases, determinantes de resistência às quinolonas mediada por plasmídeos (PMQR) e 16S RNA metiltransferase ribossômica (16S-RMTase) assim como a tipagem dos plasmídeos foram pesquisados por PCR e confirmados por sequenciamento. Além disso, a tipagem molecular dos isolados foi realizada por sequenciamento de multilocus (MLST). A determinação cromossômica ou plasmideal dos genes de resistência de interesse foi avaliada por I-Ceu-I-PFGE ou S1-PFGE, respectivamente. Experimentos de clonagem, transformação, conjugação e inibição de bombas de efluxo assim como pesquisa molecular de determinantes de virulência e sequenciamento do genoma completo também foram realizados. Entre os 66 isolados, 39 foram identificados como BGN-NF sendo 21 Acinetobacter baumannii, 11 Pseudomonas aeruginosa, 1 Pseudomonas putida, 3 Stenotrophomonas maltophilia e 3 Ochrobactrum antrophi, além de 27 membros da Ordem Enterobacterales, sendo 17 Klebsiella pneumoniae, 5 Klebsiella aerogenes, 2 Klebsiella oxytoca, 2 Enterobacter cloacae e 1 Serratia marcescens. Entre os 21 isolados de A. baumannii, 17 possuíam upstream ao gene bla_{OXA-23-like} o elemento de inserção ISAba1. Plasmídeos AB-GR2,

AB-GR4, AB-GR6 e AB-GR8 foram detectados em 9 isolados e 4 isolados apresentaram IncF_{repB}. No entanto, em todos isolados foi confirmada localização cromossômica de bla_{OXA-23-like}. Por MLST foram detectados 9 ST diferentes, em dois singletons e três complexos clonais (CC). Entre os 11 isolados de Pseudomonas aeruginosa, P. aeruginosa 1206/13 (ST1602) e P. aeruginosa 463/12 (ST235) apresentaram bla_{CTX-M-2} e no isolado 1206/13 bla_{GES-1} também foi detectado. Após análise dos dados obtidos por sequenciamento completo do genoma foi possível avaliar que bla_{GES-1} está organizado como gene cassete associado ao novo integron de classe I, In1600 no qual bla_{CTX-M-2}-ISCR1 também estava associada, resultando em uma estrutura de ~11.680pb. Experimentos de S1-PFGE determinaram que ambos os genes bla estavam inseridos em plasmídeo IncP2 de ~340kb. Em P. aeruginosa 463/12, bla_{CTX-M-2} foi encontrado downstream à ISCR1 inserido no cromossomo do isolado. O gene bla_{IMP-16} foi detectado no isolado de P. putida. Os genes bla_{TEM}, bla_{CTX-M-2}, bla_{CTX} M-8, blactx-M-15 e blakpc foram os mais detectados entre os isolados de Klebsiella sp. Entre os PMOR, apenas *qnrB-1* foi encontrado. Ainda, estes isolados apresentaram grande diversidade de replicons, sendo colE e IncL/M os mais detectados. Foram encontrados diversos determinantes de virulência entre os isolados de K. pneumoniae, destes entB, iroD, fecIRA, ugE, wabG, fimH e ureA foram detectados em todos os isolados. Entre os 5 isolados de K. aerogenes, blactx-M-15, qnrB-1 e aac(6')-Ib foram encontrados em apenas 1 isolado. Além disso, outro isolado de E. cloacae apresentou hiperexpressão de AmpC. Diferentes plasmídeos Inc foram detectados entre os isolados de K. aerogenes e E. cloacae. Isolados que apresentaram fenótipo de alto nível de resistência aos aminoglicosídeos (HLAR) tiveram seus genomas sequenciados e os mecanismos de resistência foram investigados mais detalhadamente. Em alguns isolados, a combinação da produção de diferentes enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AMEs) ocasionou no fenótipo HLAR apresentado, enquanto em outros, produção de 16S-RMTase foi detectada. Além disso, presença de hiperexpressão de bombas de efluxo também foi encontrada entre os isolados.

Palavras chave: beta-lactamases, meningite, LCR, 16S-RMTase, AMEs, PMQR

ABSTRACT

BALLABEN, A.S. Genetic study of resistance to beta-lactam, quinolones and aminoglycosides in bacteria isolated from patients with suspected meningitis in the State of São Paulo. 2019. 93p. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

In Brazil, there are few reports of members of the order Enterobacterales-causing meningitis. Over the last 20 years, beta-lactamase-producing gram-negative bacilli (BGN) have become a major challenge in the treatment of infections caused by CTX-M-and KPC-producing isolates. This work aimed to investigate the genetic and molecular epidemiology of resistance to antibiotics in members of the order Enterobacterales and non-fermentative gram-negative bacilli (BGN-NF) isolated from patients with meningitis in São Paulo State. Sixty-six members of the order Enterobacterales and BGN-NF resistant to broad-spectrum beta-lactam antibiotics were studied. The microbiological investigations were previously performed at the Adolfo Lutz Institute in Ribeirão Preto and São Paulo. These bacteria were isolated from blood and CSF from patients with suspected meningitis from 2007 to 2014. The genes coding for beta-lactamases, plasmid mediated quinolone resistance (PMQR) and 16S ribosomal RNA methyltransferase (16S-RMTase) as well as plasmids typing were screened by PCR and confirmed by sequencing. In addition, molecular typing was performed by multilocus sequencing (MLST). The chromosomal or plasmid localization of the resistance genes was evaluated by I-Ceu-I-PFGE or S1-PFGE, respectively. Cloning experiments, transformation, conjugation and inhibition of efflux pumps as well as molecular investigation of virulence determinants and whole genome sequencing were also performed. Among the 66 isolates, 39 were identified as BGN-NF being 21 Acinetobacter baumannii, 11 Pseudomonas aeruginosa, 1 Pseudomonas putida, 3 Stenotrophomonas maltophilia and 3 Ochrobactrum antrophi; besides 27 members of the order Enterobacterales, being 17 Klebsiella pneumoniae, 5 Klebsiella aerogenes, 2 Klebsiella oxytoca, 2 Enterobacter cloacae and 1 Serratia marcescens. Among 21 A. baumannii isolates, bla_{OXA-23-like} upstream to ISAba1 was detected in 17 isolates. Plasmids AB-GR2, AB-GR4, AB-GR6 and AB-GR8 were detected in 9 isolates while 4 isolates showed IncF_{repB}. However, in all isolates, chromosomal location of bla_{OXA-23-like} was confirmed. Four different sequence typing (ST) were detected: two ST407 and ST690 singletons, three clonal complexes (CC), ST225 and ST438 (CC103), ST231 and ST442 (CC109), ST227, ST233 and ST783 (CC113). Among the 11 P. aeruginosa, P. aeruginosa 1206/13 (ST1602) and P. aeruginosa 463/12 (ST235) presented bla genes, bla_{CTX-M-2} was detected in both isolates and bla_{GES-1} only in isolate 1206/13. Sequencing data revealed bla_{GES-1} organized as a cassette gene associated with the new class I integron, In1600 in which blacTX-M-2 downstream to ISCR1 which was also associated with the same In1600, resulting in a ~ 11,680 bp structure. S1-PFGE experiments determined that both bla genes were inserted into ~340kb IncP2 plasmid. Regarding P. aeruginosa 463/12, bla_{CTX-M-2} was also found downstream to ISCR1 inserted into the chromosome of the isolate. IMP-16-producing P. putida was detected among the isolates. The bla_{TEM}, bla_{CTX-M-2}, bla_{CTX-M-8}, bla_{CTX-M-15} and bla_{KPC} genes were the most detected among Klebsiella sp. Among the PMQRs, only qnrB-1 was found. Still, these isolates presented a great diversity of replicons, being *colE* and IncL/M the most detected ones. Several virulence determinants were found among K. pneumoniae isolates. Among the 5 K. aerogenes isolates, only 1 was CTX-M-15-producing isolate as well as qnrB-1 and aac(6')-Ib. In addition, one E. cloacae isolate showed AmpC overexpression. Different Inc plasmids were detected among K. aerogenes and E. cloacae isolates. Those isolates that presented a phenotype of high-level aminoglycoside resistance (HLAR) had their genomes sequenced and resistance mechanisms were investigated in detail. In some isolates, the combination of the production of different aminoglycoside-modifying enzymes (AMEs) resulted in the HLAR phenotype presented, whereas in others, 16S-RMTase production was detected. In addition, presence of hyperexpression of efflux pumps was also found among the isolates.

Keywords: beta-lactamases, meningitis, CSF, 16S-RMTase, AMEs, PMQR

LISTAS DE FIGURAS, QUADROS E TABELAS

Figura 1	Aminoglicosídeos e sítios de modificação representativos pelas enzimas AAC, ANT e APH		
Figura 2	Aminoglicosídeos cujas atividades são comprometidas pela metilação do nucleotídeo G1405 ou A1408 de 16S rRNA		
Figura 3	Ambiente genético dos genes <i>bla</i> _{GES-1} e <i>bla</i> _{CTX-M-2} plasmideais encontrados no isolado <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1206/13		
Figura 4	Filogenia das metalo-ß-lactamases do tipo IMP	52	
Quadro 1	Gêneros e espécies bacterianas selecionados para o estudo provenientes dos Institutos Adolfo Lutz de Ribeirão Preto e São Paulo.	17	
Quadro 2	Linhagens controle utilizadas no estudo.	19	
Quadro 3	<i>Primers</i> utilizados na detecção de genes codificadores de β-lactamases, temperatura de <i>annealing</i> e tamanho dos fragmentos	22	
Quadro 4	Primers utilizados na detecção de genes de resistência a quinolonas, temperatura de annealing e tamanho dos fragmentos	23	
Quadro 5	Primers de 16S-RMTase utilizados no estudo, genes amplificados, temperatura de annealing e tamanho dos fragmentos.	27	
Tabela 1	Características fenotípicas e moleculares de isolados de <i>A. baumannii</i> produtores de <i>bla</i> genes que apresentaram plasmídeos tipados pelas técnicas de PBRT e/ou AB-PBRT	32	
Tabela 2	Características fenotípicas e genotípicas de genes codificadores de resistência e fatores de virulência em isolados de <i>K. pneumoniae</i> deste estudo	40	
Tabela 3	Características fenotípicas e genotípicas da resistência de alto nível a aminoglicosídeos entre bactérias gram-negativas deste estudo	44	

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg Micrograma(s)μL Microlitro(s)μM Micromolar(s)

16S- 16S RNA metiltransferase ribossômica

RMTase

A Adenina

AACs Acetiltransferases **ABC** ATP-binding cassete

AB-PBRT Acinetobacter baumannii-Tipagem de Replicon baseado em PCR

AMEs Aminoglycoside-modifying enzymes
AMC Ampicilina com ácido clavulânico

AMG Aminoglicosídeo(s)

AMK Amicacina

ANTs Nucleotidiltransferases

ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APHs Fosfotransferases

ARB Arbecacina ATB Antibiótico

ATCC *American Type Culture Collection*

ATM Aztreonam

BGN Bacilo(s) gram-negativo(s)

BGN-NF Bacilo(s) gram-negativo(s) não fermentador(es)

BHI Brain Heart Infusion

bla Codificador de β-lactamase

BLAST Basic local alignment search tool

C Citosina
CAZ Ceftazidima
CC Complexo clonal
CG1 Clone global 1
CHL Cloranfenicol

CIM Concentração Inibitória Mínima

CIP Ciprofloxacina

CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute

CPM Cefepime
CRO Ceftriaxona
CTX Cefotaxima

crDNA DNA cromossômico

DACTB Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas

DC Combination disk method
DDST Double disc synergism test
DNA Deoxyribonucleic acid

dNTP Desoxinucleotídeos trifosfatados

DOS Deoxistreptamina

EDTA Ethylenediamine tetraacetic acid
EGM Elemento(s) Genético(s) Móvel(eis)
EIC Elementos conjugativos integrativos

ESBL Extended Spectrum β-Lactamase **EPI** Inibidor da bomba de efluxo

ETP Ertapenem

EUA Estados Unidos da América

FCFRP Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

FOX Cefoxitina
G Guanina
G Grama
GEN Gentamicina
GR Grupo

HCl Ácido clorídrico HiRC High-risk Clone

HLAR *High-level aminoglycoside resistance*

HV Hipermucoviscosidade IAL Instituto Adolfo Lutz

IAL-RP Instituto Adolfo Lutz de Ribeirão Preto IAL-SP Instituto Adolfo Lutz de São Paulo

Inc Grupo de incompatibilidade

Int I1 Integrase
In Integron
IPM Imipenem

IRAS Infecções Relacionadas à Saúde

IS Sequência de inserção

KPc Klebsiella pneumoniae clássicaKPhv Klebsiella pneumoniae hipervirulentaKPC Klebsiella pneumoniae carbapenemase

L Litro

LB Luria Bertani

LCR Líquido Céfalo Raquidiano

LEBEM Laboratório Especial de Bacteriologia e Epidemiologia Molecular

LVX Levofloxacina

M Molar

MATE *Multidrug and toxin extrusion*

MER Meropenem

MBL Metalo-β-lactamase
 MDR Multidroga resistente(s)
 MFS Major facilitator family

mg Miligrama(s)

MgCl₂ Cloreto de Magnésio

MH Muller Hinton
mL Mililitro

MLST Multilocus Sequence Typing

mM Milimolar mm Milímetro n Número NaCl Cloreto de sódio
NaOH Hidróxido de Sódio
ND Não determinado
ng Nanograma

OMS Organização Mundial da Saúde

pb Pares de base

PAβN Fenilalanina-arginina-β-naftilamida

PACE Proteobacterial antimicrobial compound efflux

PBRT Tipagem de Replicon baseado em PCR

PCR Polymerase Chain Reaction

pDNA DNA plasmidealPDR Pan-drug resistant

PFGE Pulsed-field gel electrophoresis

pH Potencial de hidrogênio

pmol Picomol

PMQR Plasmid-mediated quinolone resistance QRDR Quinolone resistance determining region

q.s.p. Quantidade suficiente para

rep Replicons

rRNA RNA ribossômico

RND Resistance nodulation-cell division

rpm Rotações por minuto
SAM Ampicilina/sulbactam
SDS Sodium dodecyl sulfate
SMR Small multidrug-resistance

SP Estado de São Paulo **ST** Sequence Typing

STX Sulfametoxazol-trimetoprim

T Timina

Taq Thermus aquaticus

TBE Tris, Ácido Bórico, EDTA

TE Tris EDTA
TET Tetraciclina

TIM Ticarcilina/ácido clavulânico

TOB Tobramicina

TZP Ticarcilina/Piperacilina

U Unidade

USP Universidade de São Paulo

UV Ultravioleta

WGS Whole Genome Sequencing

W-PCR Água para PCR

XDR Extreme Drug Resistant

LISTA DE SÍMBOLOS

- % Porcento
- Marca registrada
- TM Trademark
- °C Graus Centígrados
- X Vezes
- ± Mais ou menos
- > Maior
- ≥ Maior ou igual
- < Menor
- ≤ Menor ou igual
- ~ Aproximadamente
- + Mais
- = Igual
- **α** Alfa
- **β** Beta
- Y Citosina e Timina
- **R** Adenina e Guanina
- **B** Citosina, Timina e Guanina
- **K** Timina e Guanina

SUMÁRIO

	D	i
	e figuras, quadros e tabelas	iii
	e abreviaturas e siglas	v vi
	e símbolos	ix
		171
1.	Introdução	
1.1	Meningite	1
1.2	Ordem Enterobacterales	2
1.3	Bacilos gram-negativos não fermentadores	2
1.4	Resistência bacteriana aos antibióticos	3
1.4.1	Beta-lactâmicos	4
1.4.1.1	Beta-lactamase de espectro estendido	4
1.4.1.2	Beta-lactamases do tipo AmpC	5
1.4.1.3	Beta-lactamases carbapenemases	6
1.4.2	Quinolonas	7
1.4.3	Aminoglicosídeos	8
1.5	Multilocus sequence typing	12
1.6	Elementos genéticos móveis	12
1.7	Virulência em Klebsiella pneumoniae	13
2. 2.1	Objetivos Objetivo Geral	
2.2	Objetivos Específicos	15
3.0. 3.1.	Material e Métodos Triagem e armazenamento dos isolados bacterianos	
3.2.	Detecção fenotípica de beta-lactamases	18
3.3.	Linhagens controle	18
3.4.	Extração do DNA genômico bacteriano	19
3.5.	Detecção molecular de genes de resistência	20

6.0. 7.0.	ConclusõesReferências Bibliográficas	
4.3.	Isolados com alto nível de resistência aos aminoglicosídeos	42
4.2.	Enterobacterales	38
4.1.3.	Pseudomonas putida	37
4.1.2.	Pseudomonas aeruginosa	34
4.1.1.	Acinetobacter baumannii	30
4.0. 4.1.	Resultados Bacilos gram-negativos não fermentadores	
3.12.4.	Ensaio de inibição de bombas de efluxo	29
3.12.3.	Ensaios de clonagem e transformação	28
3.12.2.	Testes de sensibilidade à arbecacina	28
3.12.	Seleção dos isolados com alto nível de resistência aos aminoglicosídeos	27
3.11.	Detecção molecular de determinantes de virulência em Klebsiella pneumonia	
3.10.	Conjugação	26
3.9.1.	Localização dos genes de resistência	25
3.9.	Perfil plasmidial	24
3.8.2.	Grupos de Acinetobacter baumannii	24
3.8.1.	Grupos de Incompatibilidade (Inc)	24
3.8.	Tipagem dos grupos de plasmídeos	24
3.7.	Tipagem molecular dos isolados	24
3.6.	Determinação do ambiente genético	23

1. Introdução

1.1 Meningite

Meningite é caracterizada pela inflamação das três membranas protetoras (duramáter, aracnoide e pia-máter) que revestem o encéfalo e a medula espinhal. Diversos agentes infecciosos, como bactérias, vírus, fungos e protozoários e agentes não infecciosos (ex: traumatismo) podem ser a causa dessa doença. Segundo a Organização Mundial de Saúde, ainda é grande ameaça global associada a inúmeras complicações e altas taxas de mortalidade, sendo essencial a notificação imediata e investigação epidemiológica (WHO, 2018).

Entre as bactérias causadoras desta doença, três se destacam por sua incrível capacidade de provocar meningite, conhecida como "meningite clássica": *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* sorotipo b e *Streptococcus pneumoniae*. Assim como meningites virais, as bacterianas são as mais preocupantes tratando-se de saúde pública uma vez que a capacidade de causar surtos e a magnitude destes, são fatores determinantes nas altas taxas de mortalidade (WHO, 2018)

No Brasil, existem poucos relatos de membros da Ordem Enterobacterales isoladas de líquido céfalo raquidiano (LCR) causando meningite. Em 2003, houve primeiro relato de Enterobacter sakazakii no Estado de São Paulo causando meningite de evolução fulminante em criança recém-nascida (BARREIRA, 2003). No Rio Grande do Sul em 2008, casos foram relatados de pacientes hospitalizados com suspeita de meningite infecciosa; Escherichia coli, Serratia sp e Pseudomonas sp foram as mais prevalentes entre as membros da Ordem Enterobacterales e bacilos gram-negativos não fermentadores (BGN-NF), respectivamente (HÖRNER et al., 2008). Houve relato de caso em 2014 no Paraná de uma paciente com meningite da comunidade causada por Klebsiella pneumoniae produtora de K. pneumoniae carbapenemase (KPC) (DE ALMEIDA et al., 2014). Durante o ano de 2010, foi realizado estudo em um Hospital Pediátrico e Unidade de Tratamento Intensivo (UTI) Neonatal localizado no Sul do Brasil. Neste, foram pesquisados os sítios de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS), e foi observado que meningite ficou em terceiro lugar, sendo responsável por quase 6% das infecções. Entre os microrganismos isolados do sangue dos pacientes, Enterobacter sp., Acinetobacter sp. e K. pneumoniae estiveram entre os mais detectados (DAL-BÓ; SIVA; SAKAE, 2012). Outro estudo mais amplo, realizado na UTI de um hospital localizado na cidade de Salvador, investigou isolados de E. coli, durante os anos de 1996 e 2011. Trinta e seis isolados de *E. coli* foram estudados, sendo que 19% destes eram resistentes às cefalosporinas de terceira geração (BERMAN et al., 2014). Na região Nordeste do país foi relatado recentemente caso de meningite causada por *Salmonella enterica* sorotipo Panama em uma criança de 4 anos (CARNEIRO et al., 2018). No entanto, na região de Ribeirão Preto, apenas um estudo detalhado relatou membros da Ordem Enterobacterales produtores de ESBL isoladas de pacientes com suspeita de meningite, identificadas no Instituto Adolfo Lutz- regional de Ribeirão Preto, antes de 2006, permanecendo escasso dados sobre os patógenos envolvidos nessas infecções (ANDRADE et al., 2010).

1.2 Ordem Enterobacterales

Membros da Ordem Enterobacterales são bacilos gram-negativos (BGN) pertencentes a 7 famílias, a saber, Enterobacteriaceae, Erwiniaceae, Pectobacteriaceae, Yersiniaceae, Hahniaceae, Morganellaceae e Budciaceae (ADEOLU et al., 2016) as quais são compostas por bactérias da microbiota intestinal normal e também por bactérias patogênicas. Além disso, podem ser responsáveis por infecções no trato urinário, respiratório, gastrointestinais, meningites, bacteremias, e estão amplamente distribuídas no meio ambiente. Ganham destaque na microbiologia por estarem envolvidas em infecções na comunidade como também em ambientes hospitalares. São ainda mais preocupantes quando apresentam fenótipo de multidroga resistente (MDR), extremamente droga resistente (XDR) ou até mesmo, pan-droga resistente (PDR) geralmente devido à presença de diferentes determinantes de resistência, que podem estar presentes em elementos genéticos móveis (EGM). Os gêneros Escherichia, e Klebsiella-Enterobacter, Shigella Salmonella, pertencentes família Enterobacteriaceae, Serratia, pertencente à família Yersiniaceae, Proteus, Morganella e Providencia, pertencentes à família Morganellaceae, destacam-se entre os de maior importância clínica, justamente por estarem envolvidos tanto em Infecção Relacionada à Saúde (IRAS) como infecções da comunidade (ADEOLU et al., 2016; FORSYTHE et al., 2019).

1.3 Bacilos gram-negativos não fermentadores

Bacilos gram-negativos não fermentadores (BGN-NF) são microrganismos aeróbios, não esporulados, os quais se diferenciam dos membros da Ordem

Enterobacterales por não possuírem a capacidade de fermentar carboidratos e quando não os utilizam seguindo a via oxidativa. A identificação destes microrganismos sempre foi desafiadora em laboratórios de rotina em microbiologia devido à complexidade de alguns testes ou grande número de testes requeridos. Entretanto, é de extrema importância que a identificação seja completa e adequada uma vez que esses bacilos são causadores de IRAS, entre outras, principalmente em pacientes imunocomprometidos e/ou que sofreram procedimentos invasivos (BRASIL - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA), 2013).

Acinetobacter baumannii é patógeno oportunista que pode causar grande variedade de infecções, tais como, bacteremia, meningite e infecção do trato urinário. É mais prevalente em pneumonias associadas à ventilação mecânica em indivíduos internados na UTI. É microrganismo que possui grande facilidade em adquirir genes de resistência a antibióticos, tornando-se recentemente a principal ameaça em ambientes hospitalares, especialmente isolados resistentes à diferentes antimicrobianos (COOLS et al., 2019; WHO, 2017).

As bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas* podem ser encontradas em diversos ambientes, inclusive e principalmente no ambiente hospitalar. Esse patógeno é considerado muito importante associado às IRAS e todas as consequências que estas trazem. As infecções por *P. aeruginosa* podem ser de difícil tratamento uma vez que esse microrganismo possui mecanismos intrínsecos de resistência aos antimicrobianos e podem apresentar resistência múltipla a antibióticos e desinfetantes. Além disso, pode causar meningite, geralmente seguida de trauma ou processo cirúrgico (AZAM; KHAN, 2018).

Stenotrophomonas maltophilia vem sendo reconhecida como causa de sérias complicações tais como bacteremia, infecções do trato urinário, trato respiratório, na pele, em tecidos moles, nas secreções oculares, endocardites e até meningites (LIPUMA et al., 2015). Apesar de existirem raros casos de meningites causadas por este patógeno, a probabilidade aumenta quando estão associadas a procedimentos neurocirúrgicos (SOOD; KUMAR VAID; BHARTIYA, 2013).

1.4 Resistência bacteriana aos antibióticos

Os principais mecanismos de resistência aos antibióticos em bactérias gramnegativas são: (i) alteração na permeabilidade da membrana externa que dificulta ou impede a entrada do antibiótico na célula, (ii) hiperexpressão de sistemas de efluxo que excretam o antibiótico da célula, (iii) alteração do sítio alvo que dificulta ou impede a ligação do antibiótico e (iv) produção de enzimas que degradam ou inativam o antibiótico, como por exemplo as β -lactamases, que degradam antibióticos β -lactâmicos (LIVERMORE; WOODFORD, 2006).

1.4.1 Beta-lactâmicos

O principal mecanismo de resistência aos antibióticos beta-lactâmicos é a inativação/degradação enzimática através das conhecidas β -lactamases. São enzimas que catalisam a hidrólise do anel β -lactâmico e são produzidas por diferentes espécies bacterianas (BUSH; JACOBY, 2010). As propostas de Ambler e de Bush, Jacoby e Medeiros têm sido utilizadas na classificação das β -lactamases. De acordo com a classificação de Ambler, essas enzimas foram divididas em classes moleculares (A-D) conforme a estrutura molecular da enzima. Bush, Jacoby e Medeiros dividiram as β -lactamases em 4 diferentes grupos (com algumas subdivisões) de acordo com a afinidade da enzima pelo substrato e por sua sensibilidade aos inibidores de β -lactamases (ANDRADE; DARINI, 2017; BUSH; JACOBY, 2010).

1.4.1.1 Beta-lactamase de espectro estendido

As β-lactamase de espectro estendido (ESBL) são enzimas que possuem a capacidade de hidrolisar oximino-cefalosporinas, as quais são comumente usadas na terapia antimicrobiana contra membros da Ordem Enterobacterales. Além disso, são inibidas pelo ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam. Dentre estes três inibidores, o ácido clavulânico é o mais potente. Este é o principal mecanismo de resistência entre *Enterobacteriaceae* e foi descoberto na década de 80 (BUSH; JACOBY, 2010).

Atualmente, a produção de ESBL ocorre amplamente distribuída entre gêneros da ordem Enterobacterales e BGN-NF e são citadas como enzimas do tipo TEM, SHV, CTX-M, VEB, BES e GES (BUSH; JACOBY, 2010). A frequente produção de diversos tipos de ESBL entre membros da ordem Enterobacterales é alarmante e, consequentemente, a resistência bacteriana se espalha continuamente por todo o mundo, limitando as opções terapêuticas (SHARMA; PATHAK; SRIVASTAVA, 2013).

Nos últimos 20 anos, BGN produtores de ESBL se tornaram um dos principais desafios para o tratamento das infecções causadas por estes, principalmente pela pandemia das enzimas CTX-M. As primeiras bactérias produtoras de ESBL foram reportadas no começo dos anos 80, logo após o início do uso das cefalosporinas de amplo espectro na clínica. Bactérias do gênero *Klebsiella* sp e *Enterobacter* sp foram descritas na época como as mais prevalentes possuindo estes genes, os quais foram derivados de mutações de genes como *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV} inseridos em plasmídeos ubíquos (WOERTHER et al., 2013). De acordo com estudos epidemiológicos, a família CTX-M é endêmica na maioria dos países da Europa, Ásia e América do Sul, estando presentes tanto em amostras clínicas como ambientais. Algumas variantes destas enzimas são específicas para alguns países, como por exemplo, CTX-M-9 e CTX-M-14 na Espanha, CTX-M-1 na Itália ou CTX-M-2 na América do Sul e no Japão, enquanto CTX-M-15 está distribuída mundialmente (WOERTHER et al., 2013).

ESBLs do tipo GES são cada vez mais relatadas em *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *E. coli* e *K. pneumoniae*. Mais de 30 variantes desta enzima foram identificadas em todo o mundo. Uma característica dessas enzimas é que podem ter seu espectro de hidrólise modificado por mutações pontuais (Gly170-Ser ou Gly170-Asn). GES-2 foi o primeiro exemplo descrito de uma ESBL que ampliou seu espectro de atividade contra os carbapenêmicos por uma única mutação pontual. Até o momento, pelo menos 12 variantes (GES-2, -4, -5, -6, -13, -14, -15, -16,-18, -20, -21 e -24) possuem a substituição na posição 170 e teoricamente são capazes de hidrolisar carbapenêmicos. Algumas variantes também têm a capacidade de hidrolisar cefoxitina (GES-4, GES-5, GES-6, e GES-11) e/ou aztreonam (GES-9 e GES-14). Os genes *bla*GES foram essencialmente descritos como cassetes genéticos associados com integrons classe I ou classe III em diferentes grupos Inc de plasmídeos (CUZON et al., 2016).

1.4.1.2 Beta-lactamases do tipo AmpC

As β -lactamases do tipo AmpC são codificadas por genes plasmideais ou cromossômicos, capazes de hidrolisar β -lactâmicos de amplo espectro, com atividade contra cefamicinas, cefalotinas, a maioria das penicilinas, e inibidores de β -lactamases (GUPTA; TAK; MATHUR, 2014). Pertencem ao grupo 1 de Bush ou classe C de Ambler (BUSH; JACOBY, 2010).

Em 1988 foram relatados os primeiros casos de bactérias produtoras de ßlactamases AmpC. Foram encontradas em cromossomos, principalmente em bactérias do grupo informalmente denominado "CESP" (Citrobacter freundii, Enterobacter spp, Serratia marcescens, Providencia stuartii, Pseudomonas aeruginosa e Morganella morganii) que produz essas enzimas em concentrações basais, mas que apresentam potencial intrínseco induzível (ou desrreprimido) de hiperprodução desta enzima. Essa condição pode levar à falha terapêutica mesmo apresentando sensibilidade in vitro, fenômeno que pode ocorrer também durante o tratamento de membros da Ordem Enterobacterales causando bacteremia e meningite (HARRIS; FERGUSON, 2012). A rápida e precoce detecção dessas enzimas é crucial, uma vez que sua disseminação ocorre mundialmente (GUPTA; TAK; MATHUR, 2014). Além disso, essas enzimas possuem função fisiológica na reciclagem da parede celular. Desde então, várias enzimas AmpC mediadas por plasmídeos passaram a ser relatadas em Klebsiella sp, E. coli, Salmonella sp, Citrobacter freundii, Enterobacter sp, Proteus mirabilis e Acinetobacter baumannii. (PHILIPPON; ARLET; JACOBY, 2002; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ; POIREL; NORDMANN, 2010).

1.4.1.3 Beta-lactamases carbapenemases

As carbapenemases podem ser divididas em metalo- β -lactamases (MBL) ou serina- β -lactamases. As MBLs são enzimas de amplo espectro que hidrolisam penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos, mas não hidrolisam o aztreonam (MALTEZOU, 2009).

De acordo com Bush, Jacoby e Medeiros (1995), as MBLs são classificadas no grupo 3 e, divididas em subgrupos 3a, 3b e 3c de acordo com a sua capacidade catalítica. Já Ambler, as determinou como classe B. Pertencem às famílias IMP, VIM, SPM, NDM, GIM, SIM, entre outras. Primeiramente foram relatadas em *P. aeruginosa*, porém, relatos no mundo todo apontam aumento em gêneros da família *Enterobacteriaceae* (NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011; QUEENAN; BUSH, 2007)

Dentre as serinas-β-lactamases, as *K. pneumoniae* carbapenemase (KPCs) são enzimas produzidas por BGN que conferem resistência aos antimicrobianos carbapenêmicos, além de inativar penicilinas, cefalosporinas e monobactâmico (PEREZ

et al., 2007). O primeiro relato de KPC ocorreu na Carolina do Norte, nos Estados Unidos, em 1996, tornando-se endêmica neste país (YIGIT et al., 2001).

Resistência aos carbapenêmicos entre membros da Ordem Enterobacterales é um grave problema de saúde pública e isolados de bacilos gram-negativos produtores desta carbapenemase continuam sendo relatados em diferentes Estados do Brasil (ANDRADE et al., 2011; BUSH, 2013; PAVEZ; MAMIZUKA; LINCOPAN, 2009; PEIRANO et al., 2009; PEREIRA et al., 2013).

1.4.2 Quinolonas

As quinolonas são uma das classes de antimicrobianos mais comumente prescritas no mundo, representadas, por exemplo, pela ciprofloxacina e moxifloxacina, antimicrobianos de espectro estendido usado no tratamento de infecções causadas por bactérias gram-negativas e gram-positivas. Como resultado da prescrição inadequada ou uso excessivo destes antimicrobianos, desde 1990, bactérias resistentes às quinolonas têm sido constantemente relatadas (DROLET, 2018).

O mecanismo mais frequente encontrado em bactérias resistentes a esses antimicrobianos é a presença de mutações cromossômicas em regiões conhecidas como determinantes de resistência às quinolonas (QRDR, do inglês *quinolone resistance-determining region*) representadas pelas enzimas DNA girase e topoisomerase IV e são compostas por duas unidades promotoras, *gyrA* e *gyrB* e *parC* e *parE*, respectivamente (ALDRED et al., 2013; DROLET, 2018).

Diminuição da sensibilidade às quinolonas mediada por plasmídeos (PMQR, do inglês *plasmid-mediated quinolone resistance*) envolve: i) genes *qnr* que competem com as quinolonas na ligação aos seus alvos de ação; ii) modificação mediada por uma acetiltransferase, aac(6)'-*Ib-cr*, a qual tem ação sobre ciprofloxacina mas não para levofloxacina; iii) bombas de efluxo QepAB e OqxAB as quais expulsam quinolonas de dentro da célula bacteriana (JACOBY; STRAHILEVITZ; HOOPER, 2014).

Os homólogos de Qnr foram derivados de diferentes microrganismos, por exemplo, bactérias aeróbias e anaeróbicas, bem como de fungos (JACOBY; STRAHILEVITZ; HOOPER, 2014). PMQR foi descoberta tardiamente, após a introdução do ácido nalidíxico na terapêutica, em 1967. O primeiro PMQR foi relatado em 1998, em um isolado de *K. pneumoniae*, proveniente da urina do paciente. Este gene foi então denominado *qnr*, sendo alterado para *qnrA* e então, alelos adicionais foram

sendo descobertos (JACOBY; STRAHILEVITZ; HOOPER, 2014). Atualmente, de acordo com NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/isolates#/refgene/) o gene *qnrB* possui 95 alelos descritos, seguido por 15 de *qnr*S, 9 de *qnr*A, 10 de *qnr*VC, 3 de *qnr*D, 2 de *qnrE* e 1 de *qnrC*.

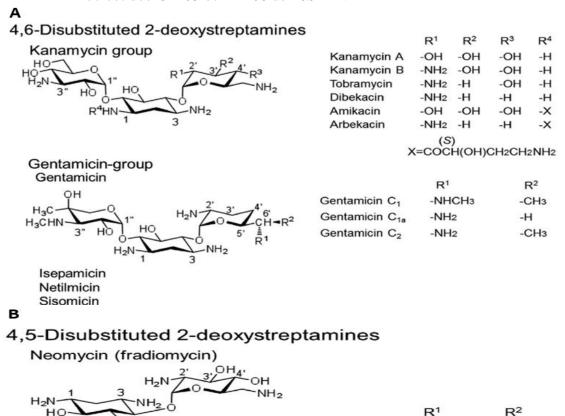
PMQR têm sido relatados em membros da ordem Enterobacterales, e apesar de serem raros em BGN-NF, são de suma importância em *P. aeruginosa*, *A. baumannii* e *S. maltophilia*. Semelhante às enzimas CTX-M ou outros genes de resistência, os genes *qnr* já foram descritos associados à EGM que facilitam a disseminação intra e intergêneros bacterianos (JACOBY; STRAHILEVITZ; HOOPER, 2014).

1.4.3 Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos (AMG) foram identificados na década de 1940 e são uma das três principais classes de agentes antimicrobianos com atividade contra BGN sendo a estreptomicina a primeira da classe descoberta a partir de *Streptomyces griseus* Desde então, têm sido utilizados para o tratamento de infecções causadas por patógenos gramnegativos, incluindo aqueles que são MDR e sensíveis à esta classe. Apesar dos AMG apresentarem diferenças em seu espectro de ação, apresentam características comuns em termos de toxicidade, tais como nefrotoxicidade e ototoxicidade. Os AMG se ligam ao sítio de reconhecimento, conhecido como sítio A do 16S rRNA que compõe a subunidade ribossômica do 30S, levando à inibição da síntese de polipeptídios com posterior morte celular bacteriana (DOI; WACHINO; ARAKAWA, 2016).

Os AMG são agrupados em 4,6-dissubstituídos 2-deoxistreptamina (DOS), 4,5-dissubstituídos DOS e 4-monosubstituído DOS baseado em suas estruturas químicas (FIGURA 1). Os principais AMG utilizados na clínica são gentamicina, amicacina e tobramicina (representantes dos 4,6-dissubstituídos DOS). No entanto, a resistência bacteriana influenciou fortemente a necessidade de desenvolvimento de novos fármacos, tais como arbecacina e plazomicina (recentemente aprovada para uso clínico nos EUA) (COX et al., 2018).

Figura 1- Aminoglicosídeos cujas atividades são comprometidas pela metilação do nucleotídeo G1405 ou A1408 de 16S rRNA



Paromomycin Lividomycin A Ribostamycin

Fonte: Doi e Arakawa, Infect Dis Clin N Am, 2016.

(A) Aminoglicosídeos representativos do grupo 4,6-deoxistreptamina DOS; (B) Aminoglicosídeos representativos do grupo 4,5-deoxistreptamina DOS.

Neomycin B

Neomycin C

-CH2NH2

-CH2NH2

-H

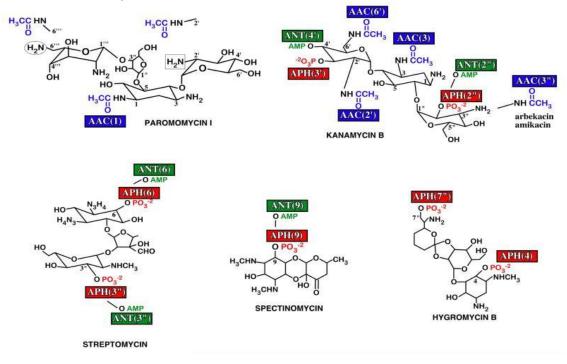
A arbecacina é um aminoglicosídeo semissintético derivado da canamicina em 1972, e foi incluída para tratamento tanto de infecções causadas por bactérias grampositivas, como *S. aureus* meticilina resistente como por bactérias gram-negativas com fenótipo de *high-level aminoglycoside resistance* (HLAR), entre elas *E. coli*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*. É aprovada para uso clínico-sistêmico apenas no Japão (desde 1990) e está em fase clínica para o desenvolvimento de solução inalatória nos EUA. Não é degradada ou inativada pelas *aminoglycoside modifying enzymes* (AMEs),

mas bactérias produtoras de 16S-RMTase apresentam também alto nível de resistência à arbecacina (LEE; LEE, 2016).

No entanto, como esperado, diferentes bactérias apresentam resistência a essa classe. Existem quatro mecanismos principais de resistência aos AMG conhecidos até agora: i) enzimas modificadoras (AMEs) que podem modificar ou inativar os aminoglicosídeos; ii) hiperexpressão de bombas de efluxo; iii) diminuição da permeabilidade; e iv) modificações da subunidade 30S ribossômica que afetam a ligação dos aminoglicosídeos.

O principal mecanismo de resistência aos AMG é a produção das AMEs que catalisam a modificação nos grupos -OH ou -NH₂ do núcleo 2-deoxistreptamina (2-DOS) ou das frações dos açúcares presentes nas moléculas dos AMG. Estas enzimas são classificadas como acetiltransferases (AACs), nucleotidiltransferases (ANTs) ou fosfotransferases (APHs) (FIGURA 2). Atualmente já foram descritas centenas de AMEs e geralmente são encontradas associadas a diferentes EGM, tais como integrons (In) – muitas vezes organizadas como genes cassetes - transposons (Tn) ou elementos integrativos conjugativos (EIC) (RAMIREZ; TOLMASKY, 2010).

Figura 2 – Aminoglicosídeos e sítios de modificação representativos pelas enzimas AAC, ANT e APH



Fonte: Ramirez e Tolmasky, Drug Resist Updat., 2010.

Bombas de efluxo são proteínas transmembrânicas presentes em membranas plasmáticas e atuam na eliminação tanto de resíduos metabólicos prejudiciais para a célula como de antimicrobianos. Atualmente foram divididas em seis famílias, a primeira delas, a família ATP-binding cassete utiliza diretamente o ATP como fonte de energia para impulsionar o transporte. As outras cinco famílias são transportadores ativos secundários que utilizam da energia eletroquímica capturada em gradientes de íons de transmembrana, tais como: major facilitator family (MFS), multidrug and toxin extrusion (MATE), small multidrug resistance (SMR), resistance-nodulation-cell division (RND) e proteobacterial antimicrobial compound efflux (PACE). Bombas de efluxo relacionadas à resistência aos AMG fazem parte da família RND, como por exemplo, em A. baumannii são frequentes AdeABC e AdeDE, em P. aeruginosa MexXY-OprM e em S. maltophilia SmeIJK e SmeYZ (DU et al., 2018).

A modificação pós-transcricional do 16S rRNA que pode acontecer tanto na posição N-7 do nucleotídeo G1405 quanto na posição N-1 do nucleotídeo A1408, é catalisada pela enzima 16S RNA metiltransferase ribossômica (16S-RMTases) (Figura 2) (DOI; ARAKAWA, 2007; DOI; WACHINO; ARAKAWA, 2016). Até o momento, foram descritas 10 16S-RMTases: ArmA, RmtA, RmtB, RmtC, RmtD, RmtE, RmtF, RmtG, RmtH (metilação do nucleotídeo G1405) e NpmA (metilação do nucleotídeo A1408) (DOI; WACHINO; ARAKAWA, 2016). As primeiras 16S-RMTases G1405 descritas foram ArmA em K. pneumoniae (GALIMAND; COURVALIN; LAMBERT, 2003) e RmtA em P. aeruginosa (YOKOYAMA et al., 2003). A única 16S-RMTase A1408 adquirida, NpmA, foi encontrada em E. coli no Japão (WACHINO et al., 2007). Desde então, a alta resistência aos aminoglicosídeos mediada pela produção de 16S-RMTases tem sido descrita em membros da ordem Enterobactelares e em BGN-NF em muitos países, reforçando o papel emergente no cenário de resistência antimicrobiana destes isolados que adquiriram 16S-RMTases, especialmente porque estas enzimas estão localizadas em plasmídeos carreadores de diversos outros determinantes de resistência e podem ser transferidas horizontalmente (DOI; WACHINO; ARAKAWA, 2016; WACHINO; ARAKAWA, 2012).

HLAR apresentado por diferentes bactérias está fortemente atribuído à presença de um ou mais mecanismos de resistência em uma mesma célula bacteriana. A associação de diferentes AMEs somado à hiperexpressão de bombas de efluxo ou à produção de 16S-RMTase são mecanismos conhecidos que conferem fenótipo de HLAR (BALLABEN et al., 2018). Normalmente é caracterizado pela resistência à

gentamicina, tobramicina e amicacina, apresentando halo de inibição de 6mm (considerando o diâmetro do disco) e CIM >128µg/mL.

1.5 Multilocus sequence typing

É um dos métodos de tipagem epidemiológica bacteriana mais comumente utilizado o qual consiste no sequenciamento de 7 genes *housekeeping* com o intuito de definir um clone bacteriano. O termo clone deve ser utilizado para referir-se as bactérias que, embora tenham sido isoladas a partir de diferentes fontes e cultivadas em diferentes momentos, ainda assim preservaram características fenotípicas e genotípicas de mesmo ancestral comum. Esse método é excelente para estudos evolucionários assim como na comparação de isolados distribuídos mundialmente (WOODFORD; TURTON; LIVERMORE, 2011).

1.6 Elementos genéticos móveis

A captura, acúmulo e disseminação de genes de resistência são devidos, em grande parte, às ações de EGM, termo usado para se referir aos elementos que promovem a mobilidade do DNA intracelular (por exemplo, do cromossomo para um plasmídeo ou entre plasmídeos) assim como aqueles que permitem a mobilidade do DNA intercelular (PARTRIDGE et al., 2018).

As sequências de inserção (IS) e transposons (Tn) são segmentos de DNA capazes de se mover quase aleatoriamente para novas localizações na mesma ou diferentes moléculas de DNA (por exemplo, cromossomo, plasmídeo) dentro de uma única célula. Outros elementos, tais como integrons, utilizam recombinação sítio específica para mover genes de resistência entre locais distintos. Como esses tipos de EGM estão frequentemente presentes em várias cópias em diferentes locais no genoma, também podem facilitar a recombinação homóloga (troca de sequências entre segmentos idênticos ou relacionados). Mecanismos intercelulares de troca genética incluem conjugação/mobilização (mediada por plasmídeos e Elementos Integrativos Conjugativos [EIC]), transdução (mediada por bacteriófagos) e transformação (captação de DNA extracelular) (PARTRIDGE et al., 2018). Os plasmídeos representam um dos mais difíceis desafios no controle da disseminação dos genes de resistência aos antibióticos. São fragmentos circulares de DNAs extra cromossômico capazes de se replicarem sozinhos e que podem ser transferidos horizontalmente para diversas bactérias. Como podem carrear diferentes tipos de genes de resistência, acabam

facilitando fenótipos de multidroga resistência presentes em diversas bactérias (CARATTOLI, 2013; CARATTOLI et al., 2005). As interações entre os vários tipos de EGM sustentam a rápida evolução de diversos patógenos multirresistentes diante da terapia antimicrobiana (PARTRIDGE et al., 2018).

1.7 Virulência em Klebsiella pneumoniae

Geralmente, *K. pneumoniae*, é patógeno oportunista encontrado na natureza, incluindo plantas, animais e humanos; há relatos também de contaminação em ambientes hospitalares (MARTIN; BACHMAN, 2018). Há duas décadas, uma nova variante hipervirulenta de *K. pneumoniae* (KPhv) surgia como patógeno importante responsável por diversas infecções, tanto na comunidade quanto em ambientes hospitalares, principalmente abcessos de fígado, meningites metastáticas e endoftalmite. Naquela época, isolados KPhv eram hipermucoviscosos e sensíveis aos antimicrobianos. No entanto, a preocupação atual é com infecções causadas por isolados KPhv apresentando fenótipos de MDR, XDR ou PDR (SHI et al., 2018).

Os isolados de KPhv diferem de *K. pneumoniae* "clássica" (KPc) em sua extraordinária capacidade de invadir e provocar infecções invasivas, mesmo em pacientes saudáveis, capacidade relacionada com a presença dos fatores de virulência já citados em seu genoma (CATALÁN-NÁJERA; GARZA-RAMOS; BARRIOS-CAMACHO, 2017). Em relação aos fatores de virulência, sorotipos capsulares, lipopolissacarídeos, fímbrias, determinantes para aquisição de ferro, proteínas da membrana externa e utilização da fonte de nitrogênio estão frequentemente presentes em isolados de KPhv o qual é comumente hipermucoviscoso.

Entre os determinantes de virulência, destacam-se: o gene plasmidial *rmpA/rmpA2*, regulador da síntese do polissacarídeo extracelular e associado ao fenótipo hipermucoviscoso, assim como o gene *magA* o qual é conhecido por estar presente em isolados de *K. pneumoniae* classificados no sorotipo capsular K1. *wcaG*, codifica a síntese de fucose capsular, que pode aumentar a capacidade das bactérias em escapar da fagocitose. Geralmente, *K. pneumoniae* expressa, em sua superfície, tanto o antígeno "O" quanto o antígeno capsular "K", ambos pertencentes ao lipopolissacarídeo "LPS", importante componente de sua capacidade patogênica. Os determinantes de virulência *wabG* e *ugE* estão envolvidos na síntese do LPS. O gene *allS*, associado ao metabolismo da alantoína, presente em isolados de *K. pneumoniae* causando diferentes infecções invasivas. Adesinas fimbriais, representadas pelos genes *fimH* e *mrkD*

(fimbrias do tipo 3), também já foram descritas atuando no processo de formação do biofilme, mediando a ligação à matriz extracelular. Genes associados à sideróforos (entB, ybtS, iutA, kfuBC, iroD, iuc, shiF, fecIRA), principalmente o transporte de ferro mediado nas bactérias gram-negativas também já foram descritos como importantes determinantes de virulência (REGUÉ et al., 2004; YE et al., 2016). Recentemente, a colibactina, representada pelo gene clb, foi incluída como determinante de virulência importante na caracterização de isolados KPhv (CERDEIRA et al., 2018).

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Investigar a genética e epidemiologia molecular da resistência aos antibióticos de importância clínica em membros da ordem Enterobacterales e BGN-NF isolados de pacientes com suspeita de meningite no Estado de São Paulo.

2.2 Objetivos Específicos

- Investigar os genes de resistência codificadores de β-lactamases
- Estudar molecularmente a presença de determinantes de resistência às quinolonas mediada por plasmídeos (PMQR)
- Elucidar os mecanismos de resistência envolvidos nos bacilos gramnegativos que apresentaram fenótipo de HLAR
- Investigar a presença, número e tamanho de plasmídeos relacionados aos genes de interesse encontrados
- Estudar a clonalidade dos isolados de mesma espécie pela tipagem por sequenciamento de multilocus (MLST) dos isolados que apresentaram genes de interesse
- Classificar os plasmídeos de interesse em grupos de incompatibilidade (Inc) (em enterobactérias) ou grupos AB-GR (em *Acinetobacter baumannii*)
- Investigar os determinantes de virulência em isolados de *Klebsiella* pneumoniae

3.0. Material e Métodos

3.1. Triagem e armazenamento dos isolados bacterianos

Foram estudadas 66 (QUADRO 1) membros da Ordem Enterobacterales e BGN-NF resistentes aos antibióticos beta-lactâmicos de amplo espectro cujas investigações microbiológicas foram previamente realizadas no Instituto Adolfo Lutz (IAL) de Ribeirão Preto e no IAL de São Paulo. Essas bactérias foram isoladas de sangue e LCR de pacientes com suspeita de meningite, do período de 2007 a 2014, os quais foram atendidos em diferentes hospitais e postos de serviços de saúde de diversas cidades do Estado de São Paulo¹.

O critério de seleção dos isolados foi baseado na resistência aos antibióticos beta-lactâmicos de amplo espectro (cefalosporinas de 3ª e 4ª geração, monobactâmicos e/ou carbapenêmicos). O perfil de sensibilidade de cada isolado foi assim determinado de acordo com interpretações prévias realizadas nos IAL-RP e IAL-SP seguindo as recomendações de interpretação de sensibilidade vigente durante o ano de isolamento de cada bactéria. Os documentos utilizados para este propósito foram o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) de 2007 a 2014 e EUCAST para os antimicrobianos aztreonam, cefepima, ceftazidima, ertapenem, polimixina B e tigeciclina, de acordo com as orientações da Nota Técnica 01/2013 da ANVISA (BRASIL - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA), 2013). Para uniformizar interpretação de sensibilidade aos antimicrobianos de todos os isolados do presente estudo, o documento CLSI de 2016 foi adotado para tal finalidade (CLSI, 2016).

¹ O projeto foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa da FCFRP-USP (nº 890.294) e do Instituto Adolfo Lutz (nº CTC-IAL 46G/2014)

Quadro 1 - Gêneros e espécies bacterianas selecionados para o estudo, provenientes dos Institutos Adolfo Lutz de Ribeirão Preto e São Paulo

Bactéria	Nº de isolados nos Institutos Adolfo Lutz	
Dacteria	IAL-RP	IAL-SP
Enterobacterales (nº= 27)	9	18
Klebsiella pneumoniae	2	15
Klebsiella oxytoca	0	2
Klebsiella aerogenes	4	1
Enterobacter cloacae	2	0
Serratia marcescens	1	0
Não-fermentadores (nº= 39)	17	22
Acinetobacter baumannii	4	17
Pseudomonas aeruginosa	8	3
Pseudomonas putida	0	1
Stenotrophomonas maltophilia	3	0
Ochrobactrum antrophi	2	1
TOTAL (n°= 66)	26	40

Fonte: Autora

Membros da Ordem Enterobacterales e BGN-NF foram cultivados para verificação da pureza e viabilidade das colônias. Após esse procedimento, quando necessário, a identificação dos isolados foi confirmada pelo API 20E para enterobactérias e API 20NE para BGN-NF (bioMerieux®). Em relação aos isolados de *Acinetobacter* sp, a identificação das espécies foi realizada avaliando a sequência de fragmentos específicos do gene *rpoB* e das regiões que flanqueiam este gene (LA SCOLA et al., 2006) e a presença do gene *bla*OXA-51, intrínseco à espécie *A. baumannii*. Para os isolados pertencentes ao complexo *E. cloacae*, a identificação das espécies foi realizada estudando os genes *groEL*, *rpoB*, *hemB* e *ampC* (cromossômica) (HOFFMANN; ROGGENKAMP, 2003).

Após a confirmação, as bactérias foram semeadas em caldo BHI (do inglês, *Brain Heart Infusion* - Oxoid) acrescido de 15% de glicerol e foram armazenadas em freezer a -80°C.

3.2. Detecção fenotípica de beta-lactamases

Para detecção de ESBL foi realizado Teste de Aproximação de Discos (DDST, do inglês, *Double Disk Screening Test*) utilizando discos de antibióticos (Oxoid) amoxicilina com ácido clavulânico (combinação penicilina + inibidor de β-lactamase), ceftazidima, cefotaxima (cefalosporinas de 3ª geração), cefepime (cefalosporina de 4ª geração), aztreonam (monobactam). O teste foi considerado positivo quando observado sinergismo e/ou zona fantasma entre o inibidor e os antibióticos testados.

Para detecção da hiperprodução de AmpC foi realizado o teste do Disco Combinado (DC) (CARTER et al., 2000) utilizando discos de antibióticos (Oxoid) cefoxitina com e sem cloxacilina. O teste foi considerado positivo quando foi observada diferença ≥ 5mm entre o disco contendo cloxacilina e o disco sem cloxacilina para o antibiótico testado.

Para detecção de carbapenemases foi realizado teste utilizando carbapenêmicos (imipenem e meropenem) com e sem o uso dos seguintes inibidores: ácido fenilborônico (para detecção de carbapenemase KPC), EDTA (para MBL) e, adicionalmente, cloxacilina (para avaliação da hiperprodução de AmpC contribuindo para a resistência aos carbapenêmicos). Os testes foram considerados positivos quando foi observada diferença ≥ 5mm entre os discos de carbapenêmicos e os respectivos inibidores (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

3.3. Linhagens controle

As linhagens controle utilizadas neste estudo, com as respectivas características e experimentos nas quais foram utilizadas, estão descritas no Quadro 2.

Quadro 2 – Linhagens controle utilizadas no estudo

Linhagens-controle	Característica	Experimento
E. coli ATCC 25922	Padrão de sensibilidade	Determinação da CIM
P. aeruginosa ATCC 27853	Padrão de sensibilidade	Determinação da CIM
E. coli RJ-15317	Produtora de CTX-M-2	PCR
K. aerogenes RJ-159835	Produtora de CTX-M-8	PCR
E. coli RJ 24694	Produtora de CTX-M-9	PCR
E. coli pyo Col 1 VIM-2a	Produz enzima da família	PCR
E. coli pyo 12870 IMP-a	Produz enzima da família	PCR
E. coli p 2381 SPM-1 ^a	Produz enzima da família	PCR
Acinetobacter spp. SIM ^b	Produz enzima da família	PCR
P. aeruginosa GIM ^b	Produz enzima da família	PCR
E. coli J53 (TEM-3) ^c	Produtora de TEM-3	PCR
E. coli J53 (SHV-2) ^c	Produtora de SHV-2	PCR
E. coli DH5α (transconjugantes)	Carreadoras de plasmídeos (grupos Inc)	PBRT, S1-PFGE, I-Ceu-I – PFGE, extração de plasmídeos

^a Linhagem gentilmente cedida pelo Professor Dr. Laurent Poirel, Hospital de Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, Paris, França.

3.4. Extração do DNA genômico bacteriano

A extração do DNA genômico foi realizada seguindo o método de Bolano et al (2001) que se baseia na extração por lise mecânica utilizando pérolas de vidro tratadas. As bactérias foram cultivadas em caldo BHI a 37°C, por 24/48 horas (BOLANO et al., 2001).

Após a incubação, a cultura bacteriana foi centrifugada por 5 minutos a 5.000 rpm a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi lavado com 10 mL de solução fisiológica (NaCl 0,85%). A centrifugação foi repetida nas mesmas condições e o sobrenadante foi desprezado novamente. Foi adicionada, ao sedimento bacteriano, a mesma quantidade de pérolas de vidro (1:1), as quais foram previamente tratadas com ácido nítrico com o intuito de remover metais pesados que atuem como cofatores para nucleases. Após isso, foi adicionada solução tamponante TED (Tris HCl pH 8,5-0,5M; NaCl; EDTA pH 8-0,5M; SDS e água deionizada) (3:1), ou seja, para 200μL de sedimento bacteriano foram adicionados 600μL de solução tamponante com posterior agitação vigorosa por 10 minutos.

b Linhagem gentilmente cedida pela Professora Dr. Ana Cristina Gales, Laboratório ALERTA, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brasil.

^c Linhagens gentilmente cedidas pelo Professor Dr^o David Livermore, *Antibiotic Resistance Monitoring and Reference Laboratory*, Londres, Inglaterra.

^d Linhagem gentilmente cedida pela Dr^a. Alessandra Carattoli

Foram transferidos $500\mu L$ de cada amostra para tubos tipo "eppendorf" de 1,5 mL e foram adicionados a cada tubo, $500\mu L$ de fenol-clorofórmio (1:1), homogeneizando cuidadosamente por 15 segundos com posterior centrifugação por 20 minutos a 12.000 rpm a 4°C.

Após a centrifugação, cerca de 400μL do sobrenadante foram transferidos para novo tubo, ao qual foi adicionado isopropanol absoluto (armazenado a -20°C) na proporção 1:1 e o tubo foi mantido a -20°C por 18 horas. Após incubação, cada tubo contendo o DNA foi centrifugado a 12.000 rpm por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi desprezado e 1 mL de etanol 70% (armazenado a -20°C) foi adicionado, com posterior homogeneização por inversão. Em seguida, os tubos foram centrifugados sob as mesmas condições. Após desprezar o sobrenadante, o tubo contendo o DNA foi mantido em câmara de fluxo laminar até que o sedimento ficasse totalmente seco.

Após a secagem, o sedimento bacteriano foi suspenso em 50μL de água ultrapura W-3500 (Sigma) e mantido a 4°C, por 16 a 20 horas a -20°C. Cerca de 1μL de solução de RNase (10μg/mL) foi adicionado e incubado por 1 hora a 37°C. O DNA foi quantificado utilizando o aparelho *Nanodrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific*) e foi mantido a -20°C, até o momento do uso.

3.5. Detecção molecular de genes de resistência

Os genes codificadores de ESBLs (*bla*_{CTX-M} dos grupos 1, 2, 8, 9, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{BES}, *bla*_{GES}, *bla*_{PER}, *bla*_{VEB}, *bla*_{BEL}), carbapenemases (*bla*_{OXA}, *bla*_{GES} *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{GIM}, *bla*_{SIM}, *bla*_{SPM}, *bla*_{BKC}) e determinantes de resistência às quinolonas mediadas por plasmídeos (*qnr*A, *qnr*B, *qnr*S, *qnr*D, *qnr*VC, *aac*(6)'-*Ib-cr*, *qep*A) foram pesquisados por PCR nos membros da Ordem Enterobacterales e nos BGN-NF.

A PCR foi realizada para um volume final de 25μL sendo adicionados: 60ng de DNA genômico, 0,2 mM de cada um dos quatro nucleotídeos (Thermo-Scientific, EUA), 2,5 μL de tampão PCR 10X concentrado (Thermo-Scientific, USA), 2,0 mM de solução de MgCl2 (Thermo-Scientific, EUA), 0,625U de Taq DNA polimerase (Thermo-Scientific, EUA), 21pmol de cada um dos primers (Invitrogen Life Technologies) e água ultra-pura (q.s.p. 25 μL, Sigma). Para amplificação dos genes em estudo foi usado, inicialmente, um ciclo de desnaturação de 94°C por 5 minutos, posteriormente 30 ciclos com as seguintes temperaturas de 94°C por 1 minuto (desnaturação), temperatura de anelamento por 1 minuto e 72°C por 1 minuto (extensão). Posteriormente, uma única etapa de extensão final a 72°C por 10 minutos. O

termociclador utilizado para os experimentos foi *Mastercycler Gradiente* (Eppendorf, Hamburg, Alemanha). Os genes amplificados nas PCR, *primers* utilizados, temperaturas de *annealing* e tamanhos dos fragmentos obtidos estão descritos nos Quadro 3 e Quadro 4.

Quadro 3 – Primers utilizados na detecção de genes codificadores de β -lactamases, temperatura de annealing e tamanho dos fragmentos

Gene	Primers	Sequência (5° – 3°)	Temperatura de annealing (°C)	Tamanho (pb)	Referência	
blactx-m-1	CTX-M1 f CTX-M1 r	AAAAATCACTGCGCCAGTTC AGCTTATTCATCGCC ACGTT	52	415		
blactx-m-2	CTX-M2 f CTX-M2 r	CGACGCTACCCCTGCTAT CCAGCGTCAGATTTTTCAGG	52	552	(WOODFORD;	
blactx-m-8	CTX-M8 f CTX-M8 r	TCGCGTTAAGCGGATGATGC AACCCACGATGTGGGTAGC	52	666	FAGAN; ELLINGTON, 2006)	
blactx-m-9	CTX-M9 f	CTX-M9 f CAAAGAGAGTGCAACGGATG ATTGGAAAGCGTTCATCACC 5		205	· ,	
bla _{CTX-M-25}	CTX-M25 f CTX-M25 r	GCACGATGACATTCGGG AACCCACGATGTGGGTAGC	52	327		
blатем	TEM f TEM r	ATGAGTATTCAACATTTCCG CTGACAGTTACCAATGCTTA	58	867	(ANDRADE et al.,	
bla _{SHV}	SHV f SHV r	GGGTTATTCTTATTTGTCGC TTAGCGTTGCCAGTGCTC	56	930	2010)	
blaper	PER f PER r	AGTGTGGGGGCCTGACGAT GCAACCTGCGCAATRATAGCTT	57	725		
blages	GES f GES r	CTGGCAGGGATCGCTCACTC TTCCGATCAGCCACCTCTCA	57	600	-	
blaveb	VEB f VEB r	CGACTTCCATTTCCCGATGC TGTTGGGGTTGCCCAATTTT	57	376	-	
bla _{BEL}	BEL f BEL r	CGACAATGCCGCAGCTAACC CAGAAGCAATTAATAACGCCC	57	448	-	
$bla_{ m NDM}$	IsoCarba_NDM f	ACTTGGCCTTGCTGTCCTT	66	603	(BOGAERTS et al.,	
blavim	IsoCarba_NDM r IsoCarba_VIM f	CATTAGCCGCTGCATTGAT TGTCCGTGATGGTGATGAGT	66	437	2013)	
bla _{IMP}	IsoCarba_VIM r IsoCarba_IMP f	ATTCAGCCAGATCGGCATC ACAYGGYTTRGTDGTKCTTG	66	387	-	
bla _{KPC}	IsoCarba_IMP r IsoCarba_KPC f	GGTTTAAYAAARCAACCACC TCGCCGTCTAGTTCTGCTGTCTTG	66	353	-	
bla _{OXA-48}	IsoCarba_KPC r IsoCarba_OXA-48 f IsoCarba_OXA-48 r	ACAGCTCCGCCACCGTCAT ATGCGTGTATTAGCCTTATCG CATCCTTAACCACGCCCAAATC	66	265		
<i>bla</i> _{IMP}	IMP f IMP r	GGAATAGAG TGCTTAAYTCT CCAAACYACTASGTTATCT	52	188		
blavim	VIM f VIM r	GATGGTGTTTGGTCGCATA CGAATGCGCAGCACCAG	52	390	-	
blа _{GIM}	GIM f GIM r	TCGACACACCTTGGTCTGAA AACTTCCAACTTTGCCATGC	52	477	(ELLINGTON et al., 2007)	
blasim	SIM f SIM r	TACAAGGGATTCGGCATC TAATGGCCTGTTCCCATGTG	52	570	<u>,</u>	
blaspm	SPM f SPM r	AAAATCTGGGTACGCAAACG ACATTATCCGCTGGAACAGG	52	271	-	
<i>bla</i> OXA-51-like	OXA-51 f OXA-51 r	TAATGCTTTGATCGGCCTTG TGGATTGCACTTCATCTTGG	52	353		
<i>bla</i> OXA-23-like	OXA-23 f OXA-23 r	GATCGGATTGGAGAACCAGA ATTTCTGACCGCATTTCCAT	52	501	(WOODFORD et al	
blaoxa-40-like OXA-40 f OXA-40 r		GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA AGTTGAGCGAAAAGGGGATT	52	246	2006)	
<i>bla</i> OXA-58-like	OXA-58 f OXA-58 r	AAGTATTGGGGCTTGTGCTG CCCCTCTGCGCTCTACATAC	52	599	-	
<i>bla</i> OXA-143-like	OXA-143 f OXA-143 r	TGGCACTTTCAGCAGTTCCT TAATCTTGAGGGGGCCAACC	52	149	(HIGGINS; LEHMANN; SEIFERT, 2010)	

Quadro 4 - *Primers* utilizados na detecção de genes de resistência às quinolonas, temperatura de *annealing* e tamanho dos fragmentos

Gene	Primers	Sequência (5' – 3')	Temperatura de annealing (°C)	Tamanho (pb)	Referência	
qnrA1 a	QnrAm-f	AGAGGATTTCTCACGCCAGG	54	580		
qnrA6	QnrAm-r	TGCCAGGCACAGATCTTGAC	34	380		
qnrB1 a	QnrBm-f	GGMATHGAAATTCGCCACTG	54	264	(CATTOIR et	
qnrB6	QnrBm-r	TTTGCYGYYCGCCAGTCGAA	34	204	al., 2007)	
qnrS1 a	QnrSm-f	GCAAGTTCATTGAACAGGGT	54	428		
qnrS2	QnrSm-r	TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG	34	428		
qnrC	QnrC-f	GGGTTGTACATTTATTGAATC	50	447	(WANG et al.,	
qnrC	QnrC-r	TCCACTTTACGAGGTTCT	30	447	2009)	
gnrD	QnrD f	CGAGATCAATTTACGGGGAATA	62	581	(CAVACO et	
qnrD	QnrD r	AACAAGCTGAAGCGCCTG	02	361	al., 2009)	
****	QnrVC f	CCCTCGAGCATGGATAAAACAGACCAGTTATA			(XIA et al.,	
qnrVC	QnrVC r	CGGGATCCTTAGTCAGGAACTACTATTAAACCT	63	657	2010)	
(C') II.	AAC6'-A	TTGCGATGCTCTATGAGTGGCT	(0)	400		
aac(6')-Ib	AAC6'-B	ACTCGAATGCCTGGCGTGTTT	60	482	(MINARINI et	
gan A	QepA f	GCAGGTCCAGCAGCGGGTAG	61	403	al., 2008)	
qepA	QepA r	CTTCCTGCCCGAGTATCG	01	403		

Os produtos de amplificação obtidos para os genes de interesse foram purificados utilizando o "kit" Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, seguindo orientações do fabricante (Promega, EUA). Os produtos de PCR foram sequenciados no sequenciador automático *ABI 3730 DNA Analyser* (Life Technologies – Applied Biosystems), seguindo as recomendações disponíveis no *website*: (http://www.genoma.ib.usp.br/servicos/sequenciamento-de-dna-sanger).

As sequências obtidas foram analisadas no software ChromasPro versão 1.33 (technelysium Pty Ltd) e comparadas às sequências disponíveis no banco de dados *GenBank* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/).

3.6. Determinação do ambiente genético

O ambiente genético das regiões *upstream* e *downstream* dos genes produtores de ESBL foi caracterizado por PCR de acordo com a literatura (DHANJI et al., 2010). Adicionalmente, quando o elemento de inserção IS*CR1* foi encontrado na região *upstream* ou *downstream* dos genes de interesse, dois PCRs adicionais foram realizados usando *Long PCR Enzyme Mix* (Thermo-Scientific, EUA) com *primers forward* Sul1-F (5'GCC CTG TCC GAT CAG ATG CA 3') ou Int1-F (5'-TCC AGAACC TTG ACC GAA CG-3') combinado com um *primer reverse* para o gene produtor de β-lactamase com a finalidade de pesquisar o integron de classe I. Para o gene *bla*_{OXA-23-like}, o ambiente genético foi determinado de acordo com a literatura (TURTON et al., 2006).

3.7. Tipagem molecular dos isolados

Para isolados produtores de genes *bla* de interesse, foi realizada a tipagem molecular por sequenciamento de *multilocus* (MLST, do inglês *multilocus sequencing typing*), segundo recomendação para cada microrganismo. Este método é baseado na amplificação e sequenciamento de fragmentos internos de 7 genes *housekeeping*, específicos para cada gênero e/ou espécie.

A metodologia foi realizada segundo as condições descritas no *website* (http://pubmlst.org/). Um dendrograma de similaridade genética foi construído utilizando o programa eBURSTv3, disponível *online*. Os alelos e STs (do inglês, *sequence typing*) obtidos em cada amostra estudada foram comparados com os alelos e STs de todas as linhagens disponibilizadas no banco de dados de MLST para respectivos microrganismos. A análise do dendrograma permitiu demonstrar a relação genética entre as amostras estudadas que poderão, ou não, formar grupos representativos de complexos clonais (CC). O programa eBURSTv3 também permitiu a análise das amostras estudadas em relação às amostras contidas no banco de dados de diversas localidades geográficas, sendo então realizada a análise global.

3.8. Tipagem dos grupos de plasmídeos

3.8.1. Grupos de Incompatibilidade (Inc)

A PCR baseada na tipagem de *replicons* (PBRT, do inglês *PCR Based Replicon Typing*) foi realizada como descrito na literatura. Dezoito pares de *primers* foram utilizados para realizar 5 PCRs multiplex e 3 PCRs simples para determinar os *replicons* FIA, FIB, FIC, HI1, HI2, I1-I_Y, L/M, N, P, W, T, A/C, K, B/O, X, Y, F_{repB}, F_{II2}, R e U (CARATTOLI et al., 2005; GARCÍA-FERNÁNDEZ et al., 2009)

3.8.2. Grupos de Acinetobacter baumannii

Análise de plasmídeos presentes em *A. baumannii* e sua epidemiologia foi realizada segundo esquema baseado na tipagem dos *replicons* (AB-PBRT), sendo composto por 6 PCRs multiplex utilizando dezenove pares de *primers*. Os plasmídeos foram distribuídos entre Grupos (GR) de 1 a 19 (BERTINI et al., 2010).

3.9. Perfil plasmidial

A investigação do perfil plasmidial foi realizada segundo a análise do DNA plasmideal (pDNA) por PFGE após utilização da enzima *S1 nuclease* (Fermentas), *S1*-

PFGE (BARTON; HARDING; ZUCCARELLI, 1995). A avaliação baseia-se na ação seletiva da *S1 nuclease* que cliva totalmente o DNA cromossômico (crDNA) e converte o pDNA circular em pDNA linear, proporcionalmente ao seu tamanho. A reação foi realizada segundo recomendações do fabricante da enzima.

Os blocos contendo os DNAs genômicos foram aplicados no gel de agarose 1%. A eletroforese foi realizada a 14°C e 6 V, com pulsos de 5-50 por 3 horas e 30-45 por 12 horas, totalizando 15 horas no aparelho Chef DRIII (BioRad). Após a corrida eletroforética o gel foi corado com brometo de etídio (1 µg/mL) durante 20 minutos, observado e fotografado utilizando o sistema de fotodocumentação AlphaImager (Alpha Innotech®, EUA).

3.9.1. Localização dos genes de resistência

A localização genômica dos genes de resistência detectados por PCR foi realizada em membrana de náilon após transferência do DNA contidos no gel de *S1*-PFGE e/ou *I-Ceu-I-*PFGE. A enzima *I-Ceu-I* (New England Biolabs, Inc, Beverly, Mass), cliva o DNA cromossômico em fragmentos grandes mantendo o 16S rDNA intacto.

Foi realizada a transferência do pDNA, a partir do gel de *SI*-PFGE, para membrana de náilon Hybond N+ (GE Healthcare). Após o gel de *SI*-PFGE e/ou *I-Ceu-I-*PFGE ser fotodocumentado, foi imerso em solução de HCl 0,25M para a fragmentação do DNA plasmideal. Em seguida, o gel foi mantido, durante 90 minutos, em solução de NaOH 0,4 N, para desnaturar o DNA plasmideal. Uma vez fragmentado e desnaturado, o DNA foi transferido do gel para a membrana de náilon Hybond N+ (Amershan Bioscience) pelo método *Southern blot* (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989) durante 48 horas, utilizando NaOH 0,4 N como solução tamponante de transferência. Após a transferência para a membrana, a mesma foi mantida em solução de SSC 2X (citrato de sódio 30 mM, NaCl 0,3 M) durante 5 minutos, posteriormente, mantida em TrisHCl 0,5 M, pH=7,0 durante 2 minutos e, seca à temperatura ambiente. Finalizando, o DNA foi fixado na membrana durante 2 horas no forno de hibridação (Amersham Pharmacia Biotech) a 80°C. A membrana foi armazenada, ao abrigo da luz e à temperatura de 4 a 8°C.

Para os genes de interesse, foram sintetizadas sondas genéticas utilizando o *kit Amersham*TM *AlkPhos Direct Labelling Reagents* (GE Healthcare), segundo recomendações do fabricante. A síntese consiste em utilizar o produto de PCR

purificado e quantificado da linhagem controle do respectivo gene de interesse. Esse produto foi diluído na concentração de 10 ng/μL, desnaturado à temperatura de 99 °C por 5 minutos, mantido em gelo durante outros 5 minutos. Posteriormente, foi adicionada uma solução de marcação de DNA, que contém fosfatase alcalina, incubada a 37 °C por 30 minutos. A sonda, assim sintetizada, foi utilizada imediatamente ou mantida à temperatura de 4-8°C por até 2 horas.

3.10. Conjugação

O ensaio de conjugação foi realizado apenas para isolados que apresentaram genes de resistência de interesse. As linhagens *Escherichia coli* J53 (resistente à azida sódica) e *Escherichia coli* K-12 C600 (resistente à rifampicina) foram utilizadas como bactérias receptoras. Os transconjugantes foram selecionados em ágar MacConkey contendo antimicrobianos referentes ao gene de resistência detectado e azida sódica (100 mg/mL).

3.11. Detecção molecular de determinantes de virulência em *Klebsiella* pneumoniae

O potencial de virulência foi determinado, por PCR, para todos os isolados de *K. pneumoniae* do estudo. Foram avaliados 20 genes que codificam fatores de virulência: *rmpA* e *rmpA2* (regulador do fenótipo mucóide A), *magA* (sorotipo capsular K1), *wcaG* (síntese capsular), *wabG* e *ugE* (lipopolissacarídeos), *allS* (metabolismo da alantoína), *clb* (colibactina), *mrkD* (fímbrias do tipo 3), *fimH* (subunidade adesina das fímbrias do tipo 1), *cf29a* (adesina), *kfuBC/iutA/iroD/entB/iuc/ybtS/shiF/fecIRA* (sistemas de aquisição de ferro), e *ureA* (metabolismo da ureia) (BRISSE et al., 2009; CHOU et al., 2004; COMPAIN et al., 2014; FANG; SANDLER; LIBBY, 2005; LEE et al., 2016; MA et al., 2005; REGUÉ et al., 2004; TURTON et al., 2010, 2018b, 2018a; YE et al., 2016) Além disso, o "*string*" *test* foi realizado para analisar o fenótipo hipermucoso (HV) (YU et al., 2007). O "*string test*" foi considerado positivo quando houve a formação de uma "corda" viscosa (≥5mm) quando colônias bacterianas cultivadas em ágar sangue foram esticadas por uma alça microbiológica de inoculação.

3.12. Seleção dos isolados com alto nível de resistência aos aminoglicosídeos²

Foram considerados enterobactérias e BGN-NF apresentando fenótipo HLAR aqueles que não apresentaram zona de inibição (6mm = considerando o diâmetro do disco), pelo método de disco difusão em ágar para os antimicrobianos gentamicina, tobramicina e amicacina e aqueles que apresentaram CIM ≥128 µg/mL para todos os três antimicrobianos testados.

3.12.1. Pesquisa molecular dos genes 16S-RMTase

Foram pesquisados por PCR genes de 16S-RTMase (*rmtA-rmtH*, *armA*) nos isolados selecionados seguindo as especificações descritas no Quadro 5.

Quadro 5 - *Primers* de 16S-RMTase utilizados no estudo, genes amplificados, temperatura de *annealing* e tamanho dos fragmentos.

Gene	Primers	Sequência (5' - 3')	Temperatura de annealing (°C)	Tamanho (pb)	Referência
armA	armA-FW	ATTCTGCCTATCCTAATTGG	55	315	
	armA-R	ACCTATACTTTATCGTCGTC			
rmtA	RmtA-FW	CTAGCGTCCATCCTTTCCTC	55	635	
	RmtA-R	TTGCTTCCATGCCCTTGCC			
rmtB	RmtB-FW	GCTTTCTGCGGGCGATGTAA	55	173	(DOI; ARAKAWA, 2007)
	RmtB-R	ATGCAATGCCGCGCTCGTAT			
rmtC	RmtC-FW	CGAAGAAGTAACAGCCAAAG	55	711	
	RmtC-R	ATCCCAACATCTCTCCCACT			
rmtD	RmtD-FW	CGGCACGCGATTGGGAAGC	55	401	
	RmtD-R	CGGAAACGATGCGACGAT			
rmtE	RmtE-FW	ATGAATATTGATGAAATGGTTGC	55	819	(DAVIS et al., 2010)
	RmtE-R	TGATTGATTTCCTCCGTTTTTG			(5/11/3 ct al., 2010)
rmtG	RmtG-FW	AAATACCGCGATGTGTCC	55	250	(BUENO et al., 2013)
	RmtG-R	ACACGGCATCTGTTTCTTCC			
rmtH	RmtH-FW	ATGACCATTGAACAGGCAGC	64	464	
	RmtH-R	AGGGCAAAGGTAAAATCCCA			(CORRÊA et al., 2014)
rmtF	RmtF-FW	CGATCCTACTGGGCTCCAT	63	314	
	RmtF-R	GGCATAGTGCTTTTCCATGC			

² Os itens a seguir foram realizados na *University of Pittsburgh, School of Medicine*.

3.12.2. Testes de sensibilidade à arbecacina

Foram realizados o teste de sensibilidade em disco e a determinação da CIM de arbecacina³ para todos os isolados que apresentaram CIM >128 µg/mL para gentamicina, amicacina e tobramicina, seguindo as recomendações do CLSI (CLSI, 2016). A interpretação do teste de sensibilidade e da CIM foram realizados seguindo recomendações já descritas na literatura (ZAPOR et al., 2010).

Isolados produtores de 16S-RMTase deste estudo foram incluídos como controles positivos. *E. coli* ATCC 25922 e *P. aeruginosa* ATCC 27853 foram usadas como controles negativos nos testes de sensibilidade aos antimicrobianos.

3.12.3. Ensaios de clonagem e transformação

Experimentos de clonagem e transformação foram realizados para todos os isolados selecionados com intuito de determinar a localização (cromossômica ou plasmidial) de possíveis genes de resistência aos aminoglicosídeos. Para isso, o DNA dos isolados foi extraído usando o *kit* DNeasy® Blood & Tissue (Qiagen, Venlo, Holanda) seguindo as instruções do fabricante.

O cromossomo de cada isolado selecionado foi digerido com a enzima de restrição *Sau*3AI (New England Biolabs, Inc, Beverly, Mass) e ligado ao vetor de clonagem pBCSK⁺ (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) que foi digerido com a enzima de restrição *Bam*HI (New England Biolabs, Inc. Beverly, Mass). *E. coli* TOP10 (Thermo Scientific) foram transformadas com este produto ligado e os transformantes foram selecionados por crescimento em placas de ágar Luria Bertani (LB) contendo: 30 μg/ml de cloranfenicol com 10μg/ml de gentamicina e 30 μg/ml de cloranfenicol com 50μg/mL de amicacina. Placas de ágar LB contendo 30 μg/mL de cloranfenicol com 20μL/mL de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil β-D-galactopiranósido) foram usadas como placas controle.

Para as colônias cultivadas, a PCR foi realizada usando os *primers* M13 (M13-20FW: 5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3 'e M13-RV: 5'-CAT GGT CAT AGC TGT TTC C-3') que permitem a análise da região de clonagem múltipla (MCS, do inglês *multiple cloning site*) para verificar se havia algum fragmento inserido nessa região.

Para o experimento de transformação, os plasmídeos foram extraídos após lise alcalina. *E. coli* TOP10 eletrocompetentes e *P. aeruginosa* PAO1 foram utilizadas como

³ A arbecacina em pó foi fornecida pela *Meiji Seika Kaisha* Ltd. (Tóquio, Japão) e os discos de arbecacina foram fornecidos pela *Eiken Chemical* (Tóquio, Japão).

bactérias receptoras dos plasmídeos extraídos. Os transformantes de *E. coli* TOP10 foram selecionados em placas de ágar LB contendo 25 μg/mL de amicacina, 2 μg/mL de cefotaxima, em combinação e separadamente para selecionar os transformantes com genes 16S-RMTase e ESBL. Os transformantes de *P. aeruginosa* PAO1 foram selecionados em placas de ágar LB contendo 25 μg/L de amicacina para selecionar apenas genes de 16S-RMTase.

3.12.4. Ensaio de inibição de bombas de efluxo

O ensaio de inibição do efluxo foi realizado utilizando o inibidor da bomba de efluxo (EPI) fenilalanina-arginina- β -naftilamida (PA β N) (Sigma, St. Louis, MO) para os isolados selecionados. A determinação da CIM em microdiluição em caldo de amicacina e gentamicina foi realizada na presença e ausência de 50 μ g/mL de PA β N (LAMERS; CAVALLARI; BURROWS, 2013). Foi considerado resultado significativo aquele que apresentou redução de 4 vezes ou mais nos valores da CIM na presença de PA β N.

3.12.5. Sequenciamento do genoma completo

Os isolados que não foram produtores de genes conhecidos de 16S-RTMase após PCR, foram submetidos ao sequenciamento do genoma completo (WGS). Resumidamente, o DNA genômico foi extraído pelo *kit* DNeasy® Blood & Tissue (Qiagen, Venlo, Holanda) seguindo as instruções do fabricante e sequenciado usando o sequenciador Illumina NextSeq (250-bp *paired-end*). *De novo* contigs foram gerados usando o *software* CLC Genomics Workbench 10.1.1. Genes de resistência aos antimicrobianos foram identificados usando a plataforma *online* ResFinder (https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/).

Além disso, para excluir homólogos dos genes de 16S-RMTases, a ferramenta online BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) foi otimizada para sequências de baixa similaridade usando "blastn". Todos os 10 genes de 16S-RMTase descritos até agora foram pesquisados utilizando os seguintes números de Acesso de Nucleotídeos no GenBank: rmtA (AB120321), rmtB (AB117036), rmtC (AB194779.2), rmtD (DQ914960), rmtE (GU201947), rmtF (JQ808129), rmtG (JX486113), rmtH (KC544262), armA (JQ669395.1) e npmA (NG_048018.1).

4.0. Resultados

4.1. Bacilos gram-negativos não fermentadores

Foram selecionados 39 BGN-NF, de acordo com os critérios estabelecidos, oriundos de amostras de LCR e sangue. Destes, 21 (54%) isolados pertenceram ao complexo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus*, 11 (26%) isolados foram identificados como *P. aeruginosa* e 1 isolado como *P. putida*, 3 isolados como *S. maltophilia* e 3 *O. antrophi*. Para os isolados de *S. maltophilia* e *O. antrophi*, nenhum gene de interesse pesquisado foi detectado.

4.1.1. Acinetobacter baumannii

Todos 21 isolados do complexo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* foram identificados como *A. baumannii* os quais apresentaram 100% de identidade à zona 1 do gene *rpo*B para essa espécie e o gene *bla*_{OXA-51-like}, intrínseco a esse microrganismo, também foi detectado.

Entre os 21 *A. baumannii*, 17 (81%) isolados foram classificados como *Extreme Drug Resistant* (XDR) e 4 (19%) isolados foram classificados como *Multidrug Resistant* (MDR) de acordo com critérios descritos na literatura (MAGIORAKOS et al., 2011). Todos os isolados foram não sensíveis à cefotaxima, ceftazidima, cefepime, ciprofloxacina, levofloxacina, ticarcilina-clavulanato e piperacilina-tazobactam, 18 (86%) ao imipenem, meropenem e amicacina, 17 (81%) ao trimetoprim-sulfametoxazol, 15 (71%) à tetraciclina, 14 (66%) à gentamicina, 12 (57%) ao sulbactam-ampicilina e tobramicina. Todos os isolados foram sensíveis apenas à minociclina.

Dezessete dos 21 (81%) *A. baumannii* apresentaram o gene *bla*OXA-23-like. Além disso, em todos os isolados de *A. baumannii* o gene *aac*(6')-*Ib* foi detectado. Em 3 isolados com HLAR (*A. baumannii* 360/10, *A. baumannii* 874/13 e *A. baumannii* 143/14) que fazem parte do item 3.12, o gene *aacA4* foi detectado (BALLABEN et al., 2018). IS*Aba1* foi pesquisada em todos os isolados produtores de OXA-23-like e em 100% deles, esse EGM foi encontrado *upstream* ao gene responsável pela produção de carbapenemase (TABELA 1). Não houve amplificação de nenhum outro gene de resistência pesquisado em nenhum dos 21 isolados de *A. baumannii*.

Foram pesquisados os grupos de plasmídeos (GR) para os 21 isolados de *A. baumannii* por AB-PBRT, e grupos Inc por PBRT, como já descrito anteriormente. Todos apresentaram plasmídeos *colE*, 9 apresentaram diferentes AB-GR: GR2, GR4, GR6 e GR8 e 4 isolados apresentaram IncF_{repB}. *A. baumannii* 1147/12 apresentou tanto

plasmídeos pertencentes ao GR8 quanto IncF_{repB}. Nos isolados *A. baumannii* 873 e *A. baumannii* 1099 foram detectados 3 AB-GR diferentes (GR-2, GR-4 e GR-6) em cada um desses isolados (TABELA 1). Todos isolados exceto *A. baumannii* 17/11, *A. baumannii* 611/13, *A. baumannii* 874/13 e *A. baumannii* 1136/13, apresentaram o gene *bla*_{OXA-23-like} e foram sintetizadas sondas específicas para este gene (*bla*_{OXA-23-like}), para cada grupo de plasmídeo como também para o gene 16S rRNA de *Acinetobacter* sp. Após análises dos resultados de *Southern blot* seguido de hibridações com sondas específicas para região dos genes 16S rRNA, *bla*_{OXA-23-like} e de cada plasmídeo, foi determinado que este gene *bla* estava inserido no cromossomo destes microrganismos.

Foi realizado MLST para 13 isolados de *A. baumannii* que apresentaram perfis diferentes de plasmídeos detectados pelos métodos descritos no item 3.8. Foram detectados 9 *sequence typing* (ST) diferentes: dois singletons ST407 e ST690, três complexos clonais (CC), ST225 e ST438 (CC103), ST231 e ST442 (CC109), ST227, ST233 e ST783 (CC113) (TABELA 1).

Quatro isolados foram relacionados ao CC109 e determinados como clone global 1 (CG1), dois deles foram classificados como XDR e um como MDR. Em alguns casos, por exemplo, isolados *A. baumannii* 873/11 e *A. baumannii* 1099/11, verificou-se que perfis de genes *rep* de plasmídeos idênticos possuíram diferentes ST's (ST438 e ST407, respectivamente). Por outro lado (por exemplo, *A. baumannii* 611/13, *A. baumannii* 874/13 e *A. baumannii* 143/14), todos relacionados ao CC109 (CG1) apresentaram diferentes perfis de genes *rep* de plasmídeos. A maioria dos isolados AB-GR foram distribuídos entre CC103 e CC109, enquanto CC113 não apresentou nenhum isolado abrigando AB-GR. Três isolados (*A. baumannii* 52/14, *A. baumannii* 171/14 e *A. baumannii* 577/14) apresentaram o mesmo ST609 abrigaram os mesmos genes de resistência (*bla*_{OXA-23-like} e *aac*(6')-*Ib*), plasmídeo *colE* e foram classificados como XDR. Além disso, os plasmídeos IncF_{repB} e GR6 também foram encontrados nos isolados *A. baumannii* 577/14 e *A. baumannii* 171/14, respectivamente (TABELA 1).

Tabela 1 – Características fenotípicas e moleculares de A. baumannii referente à tipagem molecular, genes de resistência e plasmídeos

Isolado/Ano/IAL	Cidade		Resistência aos Antibióticos ^a	Tipagem molecular Cromossômica	Genes de resistência		Plasmídeos ^d	
				ST (CC)		Outros	Grupo (GR) / Inc	
A. baumannii 982/09 RP	Barretos	XDR	CTX, CRO, CAZ, CPM, IPM, MER, SAM, TZP, TIM, GEN, TOB, AMK, TET, CIP, LVX	NR	OXA-23	aac(6')-Ib	FrepB	
A. baumannii 360/10 SP	São Paulo	XDR	CTX, CRO, CAZ, CPM, IPM, MER, TZP, TIM, GEN, TOB, AMK, CIP, LVX, SXT	NR	OXA-23	aacA4	ND	
A. baumannii 369/10 SP	Presidente Prudente	XDR	CTX, CRO, CAZ, CPM, IPM, MER, SAM, TZP, TIM, GEN, TOB, AMK, CIP, LVX, SXT	231 (CC109)	OXA-23	aac(6')-Ib	GR 8	
A. baumannii 465/10 SP	Assis	XDR	CTX, CRO, CAZ, CPM, IPM, MER, SAM, TZP, TIM, GEN, AMK, CIP, LVX, SXT	227 (CC113)	OXA-23	aac(6')-Ib	ND	
A. baumannii 17/11 SP	Guarulhos	XDR	CTX, CRO, CAZ, CPM, SAM, TZP, TIM, GEN, TOB, AMK, CIP, LVX, SXT	223 (CC113)	-	aac(6')-Ib	ND	
A. baumannii 1072/11 RP	Ribeirão Preto	XDR	CTX, CRO, CAZ, CPM, IPM, MER, SAM, TZP, TIM, GEN, TOB, AMK, CIP, LVX, SXT	NR	OXA-23	aac(6')-Ib	ND	
A. baumannii 282/11 SP	Barretos	XDR	CTX, CRO, CAZ, CPM, IPM, MER, SAM, TZP, TIM, GEN, TOB, AMK, TET, CIP, LVX, SXT	NR	OXA-23	aac(6')-Ib	ND	
A. baumannii 873/11 SP	Lorena	XDR	CTX, CRO, CAZ, CPM, IPM, MER, SAM, TZP, TIM, GEN, TOB, CIP, LVX, SXT	438 (CC103)	OXA-23	aac(6')-Ib	GR 2, GR 4 e GR 6	
A. baumannii 1099/11 SP	Sorocaba	MDR	CTX, CRO, CAZ, CPM, IPM, MER, SAM, TZP, TIM, CIP, LVX	407 (singleton)	OXA-23	aac(6')-Ib	GR 2, GR 4 e GR 6	
A. baumannii 1147/12 RP	Araraquara	XDR	CTX, CRO, CAZ, CPM, IPM, MER, SAM, TZP, TIM, AMK, TET, CIP, LVX	NR	OXA-23	aac(6')-Ib	GR 8 / FrepB	
A. baumannii 162/12 SP	Sorocaba	XDR	CTX, CRO, CAZ, CPM, IPM, MER, SAM, TZP, TIM, GEN, TOB, AMK, TET, CIP, LVX, SXT	783 (CC113)	OXA-23	aac(6')-Ib	ND	
A. baumannii 973/12 SP	Sorocaba	XDR	CTX, CRO, CAZ, CPM, IPM, MER, SAM, TZP, TIM, AMK, TET, CIP, LVX, SXT	NR	OXA-23	aac(6')-Ib	FrepB	

Continua

	Cidade	Resistência aos Antibióticos ^a		Tipagem molecular Cromossômica	Genes de resistência		Plasmídeos ^d
Isolado/Ano/IAL	Isolado/Ano/IAL Cidade Resistencia aos Antibioticos		ST (CC)	bla ^c	Outros	Grupo (GR) / Inc	
A. baumannii 1212/12 RP	Ribeirão Preto	XDR	CTX, CRO, CAZ, CPM, IPM, MER, TZP, TIM, GEN, TOB, AMK, TET, CIP, LVX, SXT	NR	OXA-23	aac(6')-Ib	ND
A. baumannii 865/12 SP	São Paulo	MDR	CTX, CRO, CAZ, CPM, IPM, MER, SAM, TZP, TIM, TET, CIP, LVX	225 (CC109)	OXA-23	aac(6')-Ib	GR 4 e GR 6
A. baumannii 874/13 SP	Araçatuba	XDR	CTX, CRO, CAZ, CPM, IPM, MER, TZP, TIM, GEN, TOB, AMK, TET, CIP, LVX, SXT	442 (CC109)	-	aacA4	ND
A. baumannii 611/13 SP	Sorocaba	MDR	CTX, CRO, CAZ, CPM, TZP, TIM, GEN, TOB, AMK, TET, CIP, LVX, SXT	231 (CC109)	-	aac(6')-Ib	GR 2
A. baumannii 1136/13 SP	Rio Claro	MDR	CTX, CRO, CAZ, CPM, TZP, TIM, GEN, AMK, TET, CIP, LVX, SXT	NR	-	aac(6')-Ib	ND
A. baumannii 52/14 SP	Sorocaba	XDR	CTX, CRO, CAZ, CPM, IPM, MER, SAM, TZP, TIM, AMK, TET, CIP, LVX, SXT	690 (singleton)	OXA-23	aac(6')-Ib	ND
A. baumannii 143/14 SP	Santos	XDR	CTX, CRO, CAZ, CPM, IPM, MER, TZP, TIM, GEN, TOB, AMK, TET, CIP, LVX, SXT	231 (CC109)	OXA-23	aacA4	GR 6
A. baumannii 171/14 SP	Sorocaba	XDR	CTX, CRO, CAZ, CPM, IPM, MER, SAM, TZP, TIM, AMK, TET, CIP, LVX, SXT	690 (singleton)	OXA-23	aac(6')-Ib	GR 6
A. baumannii 577/14 SP	Sorocaba	XDR	CTX, CRO, CAZ, CPM, IPM, MER, SAM, TZP, TIM, AMK, TET, CIP, LVX, SXT	690 (singleton)	OXA-23	aac(6')-Ib	FrepB
							Conclusão

Fonte: Autora.

a: MDR: multidrug-resistant, XDR: extensively drug-resistant, CTX: cefotaxima, CRO: ceftriaxona, CAZ: ceftazidima, CPM: cefepime, IPM: imipenem, MER: meropenem, SAM: ampicilina/sulbactam, TZP: piperacilina/tazobactam, TIM: ticarcilina/clavulanato, GEN: gentamicina, TOB: tobramicina, AMK: amicacina, TET: tetraciclina, CIP: ciprofloxacina, LVX: levofloxacina, SXT: sulfametoxazol/trimetoprim. Isolados de A. baumannii são intrinsicamente resistentes à: ampicilina, amoxacilina/ácido clavulânico, aztreonam, ertapenem e cloranfenicol seguindo informações do CLSI, 2016.

b: CC: complexo clonal. NR: não realizado.

c: Em todos os isolados. *bla*_{OXA-51-like} foi detectada. Traços (-) indicam que nenhum gene *bla* foi detectado. IS*Aba1* foi encontrada *upstream* a *bla*_{OXA-21-like} em todos os isolados. O gene *bla*_{OXA-23-like} estava inserido no cromossomo dos isolados *A. baumannii* 982 RP, 369 SP, 873 SP, 1147 RP, 143 SP, 171 SP e 577 SP.

d: ND: não determinado por PBRT, AB-PBRT, IncU ou IncR. O plasmídeo *colE* foi detectado em todos os isolados.

4.1.2. Pseudomonas aeruginosa

Entre os 11 isolados de *P. aeruginosa*, 7 (64%) foram classificados como XDR, entre eles o isolado *P. aeruginosa* 1206/13 enquanto os outros 4 (36%) foram considerados MDR, entre eles o isolado *P. aeruginosa* 463/12.

Entre os 11 isolados de *P. aeruginosa*, 10 (91%) foram não sensíveis à ticarcilina-clavulanato, 9 (82%) à cefepime, imipenem, meropenem, gentamicina, tobramicina, amicacina, 8 (73%) à ceftazidima, ciprofloxacina e levofloxacina.

Apenas os isolados *P. aeruginosa* 1206/13 e *P. aeruginosa* 463/12 apresentaram o gene blactx-m-2 e o isolado 1206/13 também possuía o gene blages-1. O sequenciamento do genoma completo do isolado 1206/13 foi realizado utilizando o sequenciador Illumina NextSeq 250-bp paired-end. A montagem foi realizada usando o programa CLC Genomics Workbench 8.0 (CLC bio, Aarhus, Dinamarca), gerando 565 contigs, com N50 de 125.375 pb, cobertura média de 84X, e o tamanho do genoma de aproximadamente 7.1Mb. A anotação dos genes foi realizada utilizando o servidor RAST (http://rast.nmpdr.org/). Os dados de sequenciamento revelaram bla_{GES-1} organizado como gene cassete associado ao novo integron de classe I, In1600 (http://integrall.bio.ua.pt/) (FIGURA 3). Além disso, blactx-M-2 foi encontrado downstream à ISCR1 a qual também estava associada ao mesmo In1600, resultando em uma estrutura de ~11.680pb. Outros genes de resistência antimicrobiana foram pesquisados usando ResFinder 3.1 (https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/), que mostrou um resistoma composto por 15 genes de resistência (aadA2, aphA-6, aph (3')-IIb, aacA4, blaoxa-395, blactx-m-2, blapao, blaoxa-2, blages-1, crpP, fosA, cmlA4, catB7, sul1, dfrB5). De acordo com PFGE-S1, este isolado apresentou um único plasmídeo de ~340kb (p1206/13), o qual não foi tipável por PBRT, IncU, IncR ou por AB-PBRT. Após análises dos resultados de Southern blot seguido de hibridações com sondas específicas para região dos genes 16S rRNA, blactx-M-2 e blages-1, foi possível determinar que ambos os genes *bla* estavam presentes no plasmídeo p1206/13. Para esse isolado, o ensaio de conjugação foi realizado utilizando E. coli K-12 C600 (resistente à rifampicina) e P. aeruginosa PAO1 como bactérias receptoras. Além disso, após experimentos de clonagem, foram realizados experimentos de eletro-transformação utilizando tanto E. coli TOP 10 como P. aeruginosa PAO1. Diferentes métodos para extração deste p1206/13 foram realizadas. No entanto, nenhum destes experimentos foi promissor e, consequentemente, nenhum transconjugante foi selecionado. O PlasmidFinder também foi usado para determinar o tipo de plasmídeo, que novamente

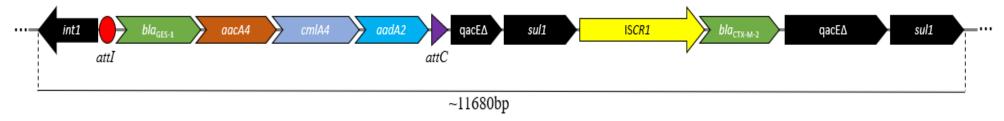
confirmou como não tipável. Análise *in silico* do sequenciamento mostrou que o plasmídeo estava intimamente relacionado com os plasmídeos IncP2 (Número de Acesso KC543497.1 e KY494864.1). p1206/13 possuí genes de conjugação (família *tra*; TraV, TraB, TraG) e de partição (família *par*; ParA e ParB) mostrando que a conjugação *in vivo* pode ocorrer. Além disso, p1206/13 também possuí diversos determinantes de virulência, incluindo proteínas *pil* (PilT e PilG) e operon *che*.

Em relação ao isolado *P. aeruginosa* 463/12, *bla*_{CTX-M-2} também foi encontrado *downstream* a IS*CR1*, porém não estava associado a integron de classe 1. Após análises dos resultados de *Southern blot* seguido de hibridações com sondas específicas para região dos genes 16S rRNA e *bla*_{CTX-M-2}, foi determinado que o gene *bla*_{CTX-M-2} estava inserido no cromossomo deste isolado.

De acordo com análise dos resultados de MLST, *P. aeruginosa* 463/12 e *P. aeruginosa* 1206/13 pertenceram aos ST235 e ST1602, respectivamente.

Não foram encontrados outros genes de interesse pesquisados nos isolados de *P. aeruginosa*. Não foram encontrados plasmídeos tipáveis por PBRT, IncU, IncR ou AB-PBRT em nenhum outro isolado geste gênero bacteriano.

Figura 3 - Ambiente genético dos genes bla_{GES-1} e bla_{CTX-M-2} plasmideais encontrados no isolado Pseudomonas aeruginosa 1206/13



Fonte: Autora.

As setas indicam as orientações dos genes. Abreviações: *intI*: gene codificador da integrase; *attI*, local de recombinação associado ao integron; genes cassete: *bla*_{GES-1}: β-lactamase, *aacA4*: enzima modificadora de aminoglicosídeos, *cmlA4*: confere resistência ao cloranfenicol, *aadA2*: enzima modificador de aminoglicosídeos; *attC*: local de recombinação associado à região cassete gênica; *qacEΔ/sul1* confere resistência à desinfetantes e sulfonamida, respectivamente. *Downstream* a *sul1*, IS*CR1* associado a *bla*_{CTX-M-2} (β-lactamase) e os genes *qacEΔ/sul1* duplicados.

4.1.3. Pseudomonas putida

O único isolado de P. putida 597/14 foi classificado como XDR, sendo sensível apenas à amicacina e tetraciclina. Além disso, este isolado apresentou gene bla de interesse, bla_{IMP-16}. O sequenciamento do genoma completo do isolado 597/14 foi realizado utilizando o sequenciador Illumina NextSeq 250-bp paired-end. A montagem foi realizada usando o programa CLC Genomics Workbench 8.0 (CLC bio, Aarhus, Dinamarca), gerando 2.053 contigs, com N50 de 12.558 pb. A anotação dos genes foi realizada utilizando o servidor RAST (http://rast.nmpdr.org/). Outros genes de resistência antimicrobiana foram pesquisados usando ResFinder 3.1 (https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/), que mostrou um resistoma composto por 10 genes de resistência (aadA1b, aph(3')-VIa, aacA4, strA, strB, bla_{OXA-2}, bla_{OXA-82}, bla_{ADC-25}, bla_{IMP-16}, sul1). Recentemente foi introduzida ao site do MLST a base de dados referente aos genes housekeeping para tipagem por MLST de isolados de P. putida (https://pubmlst.org/pputida/). De acordo com análises in silico do genoma completo do isolado P. putida 597/14 é possível sugerir que este isolado será caracterizado com novo ST. Além disso, análises utilizando a ferramenta online BLAST, foi possível determinar que alguns genes de resistência estavam organizados como genes cassete, por exemplo, bla_{IMP-16}, aacA4, aadA1b. Ainda, análises in silico estão sendo realizadas utilizando plasmídeos depositados no GenBank tanto de P. aeruginosa (Número de acesso MF344571.1) quanto de P. putida (Número de acesso KY883660.1) para comparação com o isolado do presente estudo. Utilizando a ferramenta online CARD (Comprehensive Antibiotic Resistance Database) foi possível determinar diferentes mecanismos de resistência (bombas de efluxo, alteração de alvo, inativação por enzimas) envolvidos no perfil fenotípico XDR apresentado pelo isolado P. putida 597/14 (dados não mostrados).

Não foram encontrados outros genes de interesse pesquisados no isolado de *P. putida*. Não foram encontrados plasmídeos tipáveis por PBRT, IncU, IncR ou AB-PBRT neste isolado.

4.2. Enterobacterales

Foram selecionadas 27 membros da Ordem Enterobacterales de amostras de LCR e sangue. Destes, 24/27 (88%) isolados pertenceram ao gênero *Klebsiella* sp. *K. pneumoniae* foi a mais prevalente (17/24), seguida por *K. aerogenes*⁴ com 5 isolados e *K. oxytoca* com 2 isolados. Além disso, 2 isolados foram identificados *Enterobacter cloacae* e apenas 1 isolado de *S. marcescens*.

O isolado único de *S. marcescens* foi classificado como MDR sendo não sensível à cefotaxima, ceftriaxona, cefepime, aztreonam, cefoxitina, tetraciclina, cloranfenicol, piperacilina-tazobactam e ticarcilina-clavulanato. Apresentou o gene *bla*_{TEM} e plasmídeo *colE*. Nenhum outro gene de resistência de interesse pesquisado foi encontrado nesse isolado. Não foi detectado nenhum plasmídeo tipável.

4.2.1. Klebsiella sp

Todos os 17 isolados de *K. pneumoniae* foram classificados como MDR sendo resistentes ao sulbactam-ampicilina, cefotaxima, cefepime, tobramicina e ticarcilina-clavulanato; 16 (94%) à ceftazidima, aztreonam e amoxicilina-clavulanato, 15 (88%) à ciprofloxacina e trimetoprim-sulfametoxazol, 14 (82%) à gentamicina, 13 (76%) à cloranfenicol, 12 (70%) à levofloxacina e piperacilina-tazobactam, 11 (65%) à amicacina e nove (53%) à cefoxitina e ertapenem (TABELA 2). Menos de 30% dos isolados estudados foram não sensíveis à tetraciclina, meropenem e imipenem.

Os 5 isolados de *K. aerogenes* foram classificados como MDR sendo resistentes ao trimetoprim-sulfametoxazol, ticarcilina-clavulanato, cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima e aztreonam, 4 (80%) à piperacilina-tazobactam, cefepime, gentamicina, tobramicina, tetraciclina e ciprofloxacina, 3 (60%) à levofloxacina e cloranfenicol e 2 (40%) ao ertapenem e amicacina. Todos os isolados foram sensíveis aos carbapenêmicos: imipenem e meropenem.

Dos 24 isolados de *Klebsiella* sp, 22 (91%) possuíam o gene *bla*_{TEM}. Seguido deste gene, *bla*_{CTX-M-2} foi o mais prevalente, detectado em 9 isolados (7 *K. pneumoniae* e 2 *K. oxytoca*), *bla*_{CTX-M-8} detectado em 8 isolados de *K. pneumoniae*, *bla*_{CTX-M-15} detectado em 2 isolados de *K. pneumoniae* e em 1 isolado de *K. aerogenes*. O gene *bla*_{KPC-2} foi detectado em 3 isolados de *K. pneumoniae*. Apenas PMQR *qnrB-1* foi

⁴ Gênero recentemente reclassificado, sendo previamente conhecido como *Enterobacter aerogenes* (TINDALL; SUTTON; GARRITY, 2017).

detectado em 3 isolados de *K. pneumoniae* os quais também foram produtores de $bla_{\text{CTX-M-15}}$, $bla_{\text{CTX-M-2}}$ e $bla_{\text{KPC-2}}$ (TABELA 2). Somente o isolado *K. aerogenes* 1193/12 foi produtor de $bla_{\text{CTX-M-15}}$, qnrB-1 e aac(6')-lb. Os outros quatro *K. aerogenes* apresentaram teste de detecção de ESBL negativo e foram produtores do gene $bla_{\text{TEM-1}}$ (não ESBL). Genes PMQR (qnrA1, qnrB1 e qnrS1) e aac(6')-lb foram detectados em 4/5 isolados de *K. aerogenes*. Apenas o isolado *K. aerogenes* 1135/12 apresentou hiperexpressão de AmpC. Nenhum outro gene de resistência aos beta-lactâmicos de interesse pesquisado foi encontrado nesses isolados.

A pesquisa de plasmídeos foi realizada por PBRT, IncU, IncR e *colE* em todos os isolados de *Klebsiella* sp, e relevou a presença de grande diversidade de replicons. Entre os 24 isolados, os plasmídeos *colE* e IncL/M foram os mais detectados (100% e 29%, respectivamente), enquanto outros plasmídeos foram: IncF_{repB} (n=3), IncR (n=3), IncN (n=2), IncA/C (n=1), IncY (n=1), IncHI1 (n=1), IncFIB (n=1) e IncFIA (n=1) (TABELA 2). Todos os isolados que apresentaram diferentes grupos Inc de plasmídeos, também apresentaram diferentes *bla* genes.

Em relação aos isolados *K. oxytoca* 912/13 e *K. oxytoca* 892/12, ambos foram produtores de *bla*_{CTX-M-2}. Além disso, plasmídeo *colE* foi detectado em ambos os isolados e *K. oxytoca* 912/13 que também apresentou o plasmídeo IncA/C.

Os determinantes de virulência foram pesquisados em todos os 17 isolados de *K. pneumoniae*. Os genes *mrkD* (exceto no isolado *K. pneumoniae* 949/11), *entB*, *iroD*, *fecIRA*, *ugE*, *wabG*, *fimH* e *ureA* foram detectados em todos os isolados enquanto apenas *K. pneumoniae* 655/14 apresentou o gene *kfuBC* (Tabela 2). Além disso, o gene *ybtS* foi encontrado em 7/17 isolados e dentre esses 7 isolados, 4 apresentaram também o gene *clb* (TABELA 2). Apenas o isolado *K. pneumoniae* 949/11 apresentou hipermucoviscosidade pelo teste fenotípico "*string*" *test*.

Tabela 2 - Características fenotípicas e genotípicas de genes codificadores de resistência e determinantes de virulência em isolados de *K. pneumoniae* deste estudo

			Genes de 1	Plasmídeos	
Isolado/Ano/IAL	Genes de virulência	Perfil de Resistências ^a	bla	outros genes	(Inc)/colE ^c
K. pneumoniae 802/07 RP	ugE, wabG, mrkD, fimH, ureA, entB, iroD, fecIRA	AMC, SAM, TZP, TIM, CTX, CAZ, CPM, ATM, FOX, ETP, MER, TOB, TET, SXT, CHL	CTX-M-2	aac(6')-Ib	ND
K. pneumoniae 931/08 RP	ugE, wabG, mrkD, fimH, ureA, entB, iroD, fecIRA	AMC, SAM, TZP, TIM, CTX, CAZ, CPM, ATM, FOX, ETP, GEN, TOB, AMK, TET, CIP, LVX, SXT, CHL	CTX-M-2	rmtG	ND
K. pneumoniae 469/10 SP	ugE, wabG, mrkD, fimH, ureA, entB, iroD, fecIRA	SAM, TZP, TIM, CTX, CAZ, CPM, ATM, GEN, TOB, TET, CIP, LVX, SXT, CHL	CTX-M-2	qnrB-1	L/M
K. pneumoniae 1012/11 SP	ugE, wabG, mrkD, fimH, ureA, entB, iroD, fecIRA, clb, ybtS	AMC, SAM, TZP, TIM, CTX, CAZ, CPM, ATM, FOX, ETP, IPM, MER, GEN, TOB, AMK, CIP, LVX, SXT, CHL	CTX-M-2	aac(6')-Ib	R
K. pneumoniae 1180/11 SP	ugE, wabG, mrkD, fimH, ureA, entB, iroD, fecIRA	AMC, SAM, TZP, TIM, CTX, CAZ, CPM, ATM, FOX, ETP, GEN, TOB, AMK, TET, CIP, LVX, SXT, CHL	CTX-M-2, SHV-110	rmtG,	L/M, FIB
K. pneumoniae 852/14 SP	ugE, wabG, mrkD, fimH, ureA, entB, iroD, fecIRA, clb, ybtS	AMC, SAM, TZP, TIM, CTX, CAZ, CPD, CPM, ATM, FOX, ETP, TOB, CIP, LVX, SXT, CHL	CTX-M-2, KPC-2	aac(6')-Ib	R
K. pneumoniae 949/11 SP*	ugE, wabG, fimH, ureA, entB, iroD, fecIRA	AMC, SAM, TIM, CTX, CAZ, CPD, CPM, ATM, GEN, TOB, AMK, CIP, LVX	CTX-M-8	aac(6')-Ib	ND
K. pneumoniae 533/11 SP	ugE, wabG, mrkD, fimH, ureA, entB, iroD, fecIRA, clb, ybtS	AMC, SAM, TZP, TIM, CTX, CAZ, CPM, ATM, FOX, ETP, GEN, TOB, CIP, LVX, SXT, CHL	CTX-M-2 SHV-110	aac(6')-Ib	L/M
K. pneumoniae 527/12 SP	ugE, wabG, mrkD, fimH, ureA, entB, iroD, fecIRA, ybtS	AMC, SAM, TIM, CTX, CAZ, CPD, CPM, ATM, GEN, TOB, AMK, CIP, LVX, SXT, CHL	CTX-M-8	aac(6')-Ib	L/M, F
K. pneumoniae 609/12 SP	ugE, wabG, mrkD, fimH, ureA, entB, iroD, fecIRA	AMC, SAM, TIM, CTX, CAZ, CPM, ATM, GEN, TOB, AMK, CIP, SXT, CHL	CTX-M-8	aac(6')-Ib	L/M
K. pneumoniae 1039/12 SP	ugE, wabG, mrkD, fimH, ureA, entB, iroD, fecIRA	AMC, SAM, TZP, TIM, CTX, CAZ, CPM, ATM, GEN, TOB, AMK, LVX, SXT, CHL	CTX-M-8	aac(6')-Ib	L/M
K. pneumoniae 93/13 SP	ugE, wabG, mrkD, fimH, ureA, entB, iroD, fecIRA	AMC, SAM, TZP, TIM, CTX, CAZ, CPM, ATM, FOX, ETP, IPM, MER, GEN, TOB, AMK, CIP, SXT, CHL	CTX-M-8	aac(6')-Ib	L/M

Continua

			Genes de re		
Isolado/Ano/IAL	Genes de virulência	Perfil de Resistências ^a	bla	outros genes	Plasmídeos (Inc) ^c
K. pneumoniae 1323/13 SP	ugE, wabG, mrkD, fimH, ureA, entB, iroD, fecIRA, ybtS	AMC, SAM, TIM, CTX, CAZ, CPM, ATM, GEN, TOB, AMK, CIP, SXT, CHL	CTX-M-8	aac(6')-Ib	N
K. pneumoniae 655/14 SP	ugE, wabG, kfuBC, mrkD, fimH, ureA, entB, iroD, fecIRA	AMC, SAM, TIM, CTX, CPM, GEN, TOB, AMK, CIP	CTX-M-8	aac(6')-Ib	N
K. pneumoniae 767/14 SP	ugE, wabG, mrkD, fimH, ureA, entB, iroD, fecIRA, ybtS	AMC, SAM, TZP, TIM, CTX, CAZ, CPM, ATM, GEN, TOB, AMK, CIP, LVX, SXT, CHL	CTX-M-8	aac(6')-Ib	F
K. pneumoniae 387/13 SP	ugE, wabG, mrkD, fimH, ureA, entB, iroD, fecIRA	AMC, SAM, TZP, TIM, CTX, CAZ, CPM, ATM, FOX, ETP, IPM, MER, TOB, TET, CIP, LVX, SXT	CTX-M-15 KPC-2	qnrB-1	FIA, F
K. pneumoniae 1222/13 SP	ugE, wabG, mrkD, fimH, ureA, entB, iroD, fecIRA, clb, ybtS	AMC, SAM, TZP, TIM, CTX, CAZ, CPM, ATM, FOX, ETP, IPM, MER, GEN, TOB, TET, CIP, LVX, SXT	CTX-M-15 KPC-2	qnrB-1	A/C
					Conclusão

Fonte: Autora

^a: AMC: amoxacilina-clavulanato, SAM: sulbactam-ampicilina, TZP: piperacilina-tazobactam, TIM: ticarcilina-clavulanato, CTX: cefotaxima, CAZ: ceftazidima, CPM: cefepime, ATM: aztreonam, FOX: cefoxitina, ETP: ertapenem, IPM: imipenem, MER: meropenem, GEN: gentamicina, TOB: tobramicina, AMK: amicacina, TET: tetraciclina, CIP: ciprofloxacina, LVX: levofloxacina, SXT: sulfametoxazol-trimetoprim, CHL: cloranfenicol.

b: Todos os isolados, com exceção de um (802/07), apresentaram *bla*_{TEM}. Traços (-) indicam que nenhum outro gene foi detectado.

c: ND: não determinado por PBRT, IncU ou IncR. O plasmídeo *colE* foi detectado em todos os isolados.

^{*} Fenótipo hipermucóide detectado.

4.2.2. Enterobacter sp

Apesar dos 2 isolados de *E. cloacae* terem sido classificados como MDR, nenhum apresentou produção de ESBL pelo teste fenotípico, e, corroborando com este fenótipo, nenhum gene *bla* foi detectado. No entanto, o isolado *E. cloacae* 1054/10 apresentou hiperexpressão de AmpC. Nenhum outro gene de resistência de interesse pesquisado foi encontrado nesses isolados.

Foram pesquisados plasmídeos de interesse por PBRT, IncU, IncR e *colE* nos 2 isolados de *E. cloacae*. O plasmídeo *colE* foi detectado em ambos enquanto IncL/M foi detectado apenas no isolado *E. cloacae* 1054/10.

4.3. Isolados com alto nível de resistência aos aminoglicosídeos

Onze isolados (6 *P. aeruginosa*, 3 *A. baumannii* e 2 *K. pneumoniae*) apresentaram CIM >128 µg/mL para os três aminoglicosídeos testados. Entre esses 11 isolados, em 5 foram detectados genes de 16S-RMTase, sendo *rmtD* em 3 isolados e *rmtG* em 2 isolados.

A sensibilidade à arbecacina foi verificada para os 11 isolados. Apenas os 5 isolados produtores de 16S-RMTase apresentaram zona de inibição de 6mm e CIM >256 μg/m. Em contrapartida, os 6 isolados restantes apresentaram zona de inibição variando de 7 a 14mm e CIM de 8 μg/mL a 256 μg/mL (TABELA 3).

Os transformantes de *E. coli* TOP10 com plasmídeos recombinantes portadores dos determinantes de resistência à gentamicina ou amicacina foram obtidos a partir do isolado *A. baumannii* 143/14 não produtor de 16S-RMTase em duas situações diferentes: meio de cultura LB com cloranfenicol e gentamicina e com cloranfenicol e amicacina. Ambos os transformantes (*E. coli* 143/14T GN e *E. coli* 143/14 AMK) foram sensíveis à arbecacina, no entanto, *E. coli* 143/14T GN foi resistente à gentamicina e tobramicina, enquanto *E. coli* 143/14T AMK foi resistente à amicacina e tobramicina. Pelo sequenciamento de Sanger utilizando os *primers* M13 descritos anteriormente, foi detectada a presença de dois genes codificadores de AMEs diferentes: *aadB* em *E. coli* 143/14T GN e *aacA4* em *E. coli* 143/14T AMK.

Transformantes não foram obtidos com nenhum dos outros isolados utilizando bactérias receptoras *E. coli* ou com uma bactéria receptora correspondente à mesma espécie (ex: *P. aeruginosa* PAO1).

O ensaio de inibição de bombas de efluxo foi realizado para os 6 isolados que não apresentaram nenhuma 16S-RMTase. Após análise dos resultados, apenas o isolado

de *A. baumannii* 874/13 apresentou redução de 4 vezes da CIM de amicacina em combinação com PAβN. Entre os outros 5 isolados, não foi observada redução significativa com amicacina ou gentamicina em combinação com PAβN.

Todos os 6 isolados que não apresentaram nenhuma 16S-RMTase (*A. baumannii* 360/10, 874/13, 143/14 e *P. aeruginosa* 463/12, 1206/13 e 9me/14) foram submetidos ao WGS. Após a análise utilizando a plataforma *online* ResFinder, 13 AMEs foram encontradas entre os 6 isolados, incluindo *aacA4*, *aacA1*, *aacC1*, *aphA6*, *aphA7*, *aph(3')-IIb*, *aadB*, *aadA1*, *addA2*, *aadA6*, *aadA7*, *strA*, *and strB*. Além disso, *P. aeruginosa* 9me/14 apresentou CIM >1024 μg/ml para os 3 aminoglicosídeos e foi encontrado o gene *rmtD1* que não havia sido detectado por PCR (TABELA 3) (BALLABEN et al., 2018).

Separadamente, entre os isolados de *A. baumannii*, os genes *aacA4* e *aphA7* foram as AMEs mais prevalentes, seguidas de *aacA1*, *aac(3)-Ic*, *aadB* e *aphA6*. Entre os isolados de *P. aeruginosa*, os genes *aacA4*, *aph(3')-IIb* foram as AMEs mais prevalentes, seguidas de *aadA2*, *aadA6*, *aadA7*, *aadB*, *strA* e *strB* (TABELA 3).

Tabela 3: Características fenotípicas e genotípicas da resistência de alto nível a aminoglicosídeos entre bactérias gram-negativas deste estudo

		Teste de sensibilidade aos antimicrobianos ^b							Genes de resistência aos	
Isolado/IAL ^a	Cidade/ano	Zo	na de ini	ibição (mm) CIM (μg/ml)		CIM (µg/ml)				aminoglicosídeos ^c
		AMK	GEN	TOB	ARB	AMK	GEN	TOB	ARB	
P. aeruginosa ATCC27853	Estados Unidos	22	20	24	27	4	1	0.25	0.5	-
E. coli ATCC25922	Estados Unidos	25	23	22	25	2	0.5	1	2	-
A. baumannii 360 SP	Sao Paulo/2010	11	6	6	8	256	512	1024	256	aacA4, aacA1, aphA7
A. baumannii 874 SP	Araçatuba/2013	8	6	6	9	256#	512	512	128	aacA4, aac(3)-I, aphA7
A. baumannii 143 SP	Santos, 2014	6	6	6	7	1024	>2048	>128	256	aacA4, aacC1, aphA7, aadB, aadA1, aphA6
P. aeruginosa 463 SP	Rio Claro, 2012	12	6	6	14	256	>2048	512	32	aacA4, aph(3')-IIb, aadB, aadA6, strA, strB
P. aeruginosa 1206 SP	Sorocaba, 2013	6	6	6	17	512	>2048	256	8	aacA4, aph(3')-IIb, aphA6, aadA2
P. aeruginosa 9me RP	Franca, 2014	6	6	6	6	>2048	>2048	>2048	>256	aacA4, aph(3')-IIb, aadA7, rmtD1
P. aeruginosa 862 RP	Araraquara, 2007	6	6	6	6	>256	>256	>256	>256	rmtD
P. aeruginosa 883 RP	Porto Ferreira, 2007	6	6	6	6	>256	>256	>256	>256	rmtD
P. aeruginosa 979 RP	Bebedouro, 2009	6	6	6	6	>256	>256	>256	>256	rmtD
K. pneumoniae 931 RP	Jaboticabal, 2008	6	6	6	6	>256	>256	>256	>256	rmtG*
K. pneumoniae 1180 SP	Barretos, 2011	6	6	6	6	>256	>256	>256	>256	rmtG*

Baseado em Ballaben et al., 2018.

^a E coli ATCC 25922 e P. aeruginosa ATCC 27853 foram usadas como controles negativos em todos os experimentos.

^b Valor de 6mm indica a ausência de zona de inibição. As concentrações de amicacina (AMK), gentamicina (GEN), tobramicina (TOB) e arbecacina (ARB) foram de 30, 10, 10 e 10 μg, respectivamente. #Isolado que teve uma redução de 4 vezes com amicacina em combinação com PAβN no ensaio de efluxo.

^c Genes de resistência aos aminoglicosídeos foram identificados pelo sequenciamento do genoma completo. Genes de 16S-RMTase foram detectados por PCR. Os traços indicam que nenhum gene foi detectado.

^{*} Isolados não incluídos para o WGS e o gene 16S-RMTase foi detectado por PCR.

5.0. Discussão

O Instituto Adolfo Lutz (IAL) é referência para o Estado de São Paulo na investigação e diagnóstico confirmatório de meningite bacteriana. Distribuídos estrategicamente, seus doze Laboratórios Regionais lideram as ações de vigilância sanitária, epidemiológica e ambiental. O Laboratório Central de Saúde Pública encontra-se localizado na cidade de São Paulo, e um de seus laboratórios regionais localiza-se na cidade de Ribeirão Preto. O IAL Central atende várias instituições de saúde do Estado de São Paulo e atua como Laboratório de Referência da Sub-Rede Analítica de Resistência Microbiana em Serviços de Saúde, da ANVISA, atendendo mais 6 estados do Brasil. Ambas as sedes citadas (São Paulo e Ribeirão Preto) expandem seus serviços por diversos municípios localizados em suas respectivas regiões.

Por se tratar de doença como a meningite que apresenta diferentes agentes etiológicos com respectivos sinais e sintomas, a antibióticoterapia também é particular para cada faixa etária do paciente assim como para cada agente etiológico causador da doença. De forma geral, são de escolha os antimicrobianos pertencentes ao grupo dos beta-lactâmicos e à classe dos aminoglicosídeos, às vezes em associação ou separadamente. No caso de membros da Ordem Enterobacterales e BGN-NF como causadores da doença, geralmente cefalosporinas de 3ª geração são as de primeira escolha, e gentamicina e/ou amicacina como representantes da classe dos aminoglicosídeos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Tendo em vista esses dados citados, tornam-se ainda mais preocupantes relatos de membros da Ordem Enterobacterales e BGN-NF causando meningite e sendo produtores de diferentes ESBLs assim como de outros determinantes de resistência a outras classes de antimicrobianos, de acordo com os dados apresentados neste estudo.

As bactérias resistentes ao grupo dos beta-lactâmicos mais isoladas de pacientes com suspeita de meningite do Estado de São Paulo, no período de 2007 a 2014, foram A. baumannii (n=21), K. pneumoniae (n=17) e P. aeruginosa (n=11), no entanto, diferentemente do que foi apresentado por Andrade e colaboradores (ANDRADE et al., 2010) nenhuma E. coli foi isolada durante o período do presente estudo. É conhecido que para o isolamento de bactérias que causam meningite, alguns fatores críticos e importantes precisam ser considerados, dentre eles, a coleta de modo adequado com posterior transporte do material clínico, o qual deve essencialmente ser cultura de 18 a 24 horas para comprovar viabilidade bacteriana (SECRETARIA DO ESTADO DE

SÃO PAULO., 2017). No presente estudo, *A. baumannii* foi a espécie mais isolada e diferentemente do que se relatavam há alguns anos, esta bactéria se tornou patógeno importante durante os anos e em 2017 a Organização Mundial da Saúde (OMS) (TACCONELLI et al., 2018) liberou uma lista dos patógenos mais críticos e os classificou por ordem de prioridade, e dentre eles, *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos ocupam a primeira posição. É importante ressaltar que 85% dos isolados deste estudo foram resistentes aos carbapenêmicos. Em contrapartida, estudo antes de 2006 mostrou baixa prevalência de membros da Ordem Enterobacterales causadoras de meningite e produtoras de ESBL (ANDRADE et al., 2010), enquanto que estudo realizado em Salvador em 2014, relatou o isolamento de 36 *E. coli* de LCR e sangue as quais foram produtoras de ESBL (BERMAN et al., 2014). Também no presente estudo, mais de 90% dos isolados estudados foram produtores de alguma ESBL, evidenciando mais uma vez o grande problema de saúde pública que a resistência bacteriana aos antimicrobianos vem causando há décadas.

O melhor método para a diferenciação das espécies do complexo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* ainda não está bem estabelecida. Acredita-se que apenas uma metodologia seja incapaz de diferenciar sozinha todas as espécies, como foi demonstrado (KHOSRAVI et al., 2015; LEE et al., 2014; TOH et al., 2015; WANG et al., 2014). No presente estudo, as metodologias adotadas para a identificação das espécies do complexo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* foram satisfatórias quanto aos resultados obtidos. Todos os isolados do complexo foram identificados como *A. baumannii* pelas metodologias empregadas. Esta espécie já foi dada como a mais prevalente em outros estudos que demonstraram alta prevalência desta espécie entre os isolados de *Acinetobacter* sp (KHORSI et al., 2015; LEE et al., 2014).

Neste estudo, os isolados de *A. baumannii* foram classificados em MDR, XDR e PDR de acordo com a literatura (MAGIORAKOS et al., 2011). Outro estudo demonstrou que 81% dos isolados de *A. baumannii* eram MDR enquanto 13% eram XDR (KHORSI et al., 2015), apresentando números inferiores quando comparada aos resultados (80%) deste estudo. Estudo retrospectivo em pacientes hospitalizados no ano de 2009, no Chile, com total de 48 isolados de *A. baumannii*, correspondentes de 34 pacientes, sendo 6/48 (13%) e 10/48 (21%) foram considerados MDR e XDR, respectivamente (RIVERA et al., 2016). Em ambas as classificações, isolados deste presente estudo apresentaram porcentagens maiores, tanto para MDR como para XDR. Em 2013 no Canadá, foram apresentados dados menores do que este estudo em isolados

de *A. baumannii* XDR. Na ocasião, 32 pacientes estavam colonizados por esse microrganismo sendo que 7 (25%) foram classificados como XDR (GRAY et al., 2016). No Brasil, desde 2009 já existem relatos de *A. baumannii* MDR (CARVALHO et al., 2009). Ainda no Brasil em 2013, estudo de vigilância demonstrou 31 pacientes hospitalizados com meningite por *A. baumannii* os quais 13 isolados foram classificados como MDR e 14 como XDR (COELHO-SOUZA et al., 2013). Mais recentemente, foram estudados isolados de diversos Estados do Brasil, contabilizando 155 amostras clínicas, das quais todas foram classificadas como MDR (CHAGAS et al., 2014), demonstrando assim mais uma difícil barreira a ser superada na batalha contra esses patógenos multirresistentes, uma vez que constituem sério problema terapêutico.

O gene bla_{OXA-23} está disseminado mundialmente em isolados de A. baumannii, limitando ainda mais as escolhas nos tratamentos de pacientes colonizados por essa bactéria. Esse gene é derivado do cromossomo de A. radioresistens (NIGRO; HALL, 2016) e foi a primeira β-lactamase de classe D de a ser reportada, na Escócia em 1985, não muito distante da introdução dos carbapenêmicos na terapêutica. Foi incialmente nomeada como ARI-1 e após análises sequenciais foi renomeada para OXA-23 (PATON et al., 1993). No presente estudo, a maioria dos isolados de A. baumannii possuíam bla_{OXA-23}. Esses dados corroboram com outros encontrados na literatura, visto que este gene já foi relatado em todos os continentes (POTRON; POIREL; NORDMANN, 2015). Diversos estudos vêm relatando a genética de aquisição de bla_{OXA-23} e demonstram que elementos genéticos móveis, como por exemplo, transposons (Tn2006, Tn2007, Tn2008, Tn2008B e Tn2009) foram identificados associados a este gene. Além destes, ISAba1 e ISAba4 têm sido relacionadas com a mobilização deste gene, sendo que Tn2006, Tn2008, Tn2008B e Tn2009 estão associados a ISAba1 e Tn2007 a ISAba4 (MUGNIER et al., 2010; NIGRO; HALL, 2016). ISAba1 foi encontrado upstream a esta carbapenemase em todos os isolados e este pode ser responsável pela mobilização do mesmo assim como pode atuar como um forte promotor para este gene aumentando sua expressão, como já descrito na literatura (CHAGAS et al., 2014; MUGNIER; POIREL; NORDMANN, 2009). Outro elemento genético que vem ganhando destaque é o AbaR4 o qual foi originado da transposição do Tn2006 dentro do Tn6022. AbaR4 já foi relatado tanto no cromossomo quanto em plasmídeos pertencentes a família repAci6. A correlação entre todos esses EGM mostrase fortemente associada à rápida disseminação de isolados de A. baumannii resistentes aos antibióticos carbapenêmicos (NIGRO; HALL, 2016).

De acordo com MLST, 9 ST's foram detectados entre 13 isolados de A. baumannii. Entre eles, 3 CC, relacionados com a disseminação mundial de genes de resistência a antimicrobianos foram encontrados, tais como CC103, CC109 e CC113. Quatro isolados, três deles XDR e um MDR foram relacionados ao CC109 e foram classificados como clone global 1 (CG1), um dos principais clones amplamente disseminados na América do Sul. As linhagens CG1 estão bem estabelecidas devido à sua capacidade de adquirir EGM, como plasmídeos e transposons. Consequentemente, possuem diversos genes de resistência a vários antimicrobianos entre diferentes fontes (HOLT et al., 2016). Em estudo realizado durante os anos de 2008 a 2010 no Brasil, foram estudados 67 isolados clínicos de A. baumannii resistentes aos carbapenêmicos entre os quais, os complexos clonais CC109 e CC113 foram os mais prevalentes entre os isolados do estudo (CLÍMACO et al., 2013). Ainda no Brasil, outro estudo com 155 isolados MDR de A. baumannii demonstrou que a maioria dos isolados foram distribuídos entre os CC103 e CC113 (CHAGAS et al., 2014). Recentemente, estudo com 23 isolados clínicos e ambientais de A. baumannii determinou que mais de 75% dos isolados foram classificados como XDR e os CC109 e CC113 foram os mais encontrados entre os isolados do estudo em questão (ROYER et al., 2018). Outros estudos com isolados de países da América Latina e da Europa, também demonstraram a prevalência dos CC1109 e CC113 entre isolados de A. baumannii, assim como demonstrado no Brasil (GONZALEZ-VILLORIA et al., 2016; HRENOVIC et al., 2017; VILACOBA et al., 2017).

Plasmídeos representam um dos mais difíceis desafios para conter a disseminação da resistência antimicrobiana. Contribuem diretamente para propagação de determinantes de resistência. Possuem sistemas que garantem sua replicação autônoma, além de mecanismos que controlam o número de copias a serem produzidas e garantindo a herança estável por gerações seguintes (CARATTOLI, 2013; CARATTOLI et al., 2005). Isolados de *A. baumannii* MDR abrigando plasmídeos com genes de resistências aos carbapenêmicos, dentre estes *bla*OXA-23, têm sido relatados (POTRON; POIREL; NORDMANN, 2015). Baseando-se no método proposto (BERTINI et al., 2010), plasmídeos presentes em *A. baumannii* puderam ser estudados molecularmente e epidemiologicamente. Apesar de poucos isolados de *A. baumannii* terem apresentado plasmídeos AB-GR no presente estudo, ainda sim são relevantes e importantes. De acordo com a literatura, com algumas exceções, a maioria dos plasmídeos de *A. baumannii* não possuírem a capacidade de auto transferência *in vitro*.

Plasmídeos AB-GR6 fazem parte destas exceções e têm sido considerados os plasmídeos mais disseminados entre isolados de A. baumannii (BERTINI et al., 2010). Plasmídeos do AB-GR6 são os mais frequentes entre isolados de A. baumannii e já foram relatados em países da Europa, Austrália, Ásia e África do Norte carreando diferentes determinantes de resistência, como por exemplo, bla_{OXA-23}, bla_{GES-11}, aphA6. Além disso, esses isolados apresentaram diferentes ST's, sugerindo que a disseminação desses genes não é clonal (CHARFI-KESSIS et al., 2014; CHEN et al., 2017; GHEORGHE et al., 2014; HAMIDIAN et al., 2014; NIGRO et al., 2014; TOWNER et al., 2011) Diferentemente, AB-GR8, detectado neste estudo, foi relatado apenas na Ásia (FENG et al., 2015; HUANG et al., 2015). Dois outros detectados neste estudo foram AB-GR2 e AB-GR4. Ambos já foram relatados em isolados de A. baumannii resistentes aos carbapenêmicos na China e Lituânia, respectivamente (CHEN et al., 2017; POVILONIS et al., 2013). Em 2013, na Lituânia, estudo demonstrou que entre 444 isolados de A. baumannii, 52% destes foram classificados como CG1 (CC109) e 45% como CG2 (CC118). Entre os isolados do CG2, foram detectados apenas plasmídeos AB-G2 e conseguiram determinar que o mesmo carreava bla_{OXA-72}. Além disso, 46 isolados apresentaram a combinação dos plasmídeos AB-GR2 + AB-GR6 (POVILONIS et al., 2013).

No presente estudo foram encontrados 5 isolados contendo IncF e de acordo com nosso conhecimento, ainda não existem relatos deste plasmídeo circulante entre *Acinetobacter* spp. Sabe-se que esta família de plasmídeo é epidêmica com diferentes *replicons*, tais como Inc FIA, Inc FIB e Inc FII, sendo considerado o principal *multireplicon* (MATHERS; PEIRANO; PITOUT, 2015).

P. aeruginosa é causa comum de infecções adquiridas tanto na comunidade quanto no âmbito hospitalar. É patógeno oportunista diferenciado por sua habilidade de tornar-se resistente a diversos antibióticos, sendo assim grande ameaça ao tratamento dos pacientes (HONG et al., 2015). No presente estudo, a porcentagem de isolados XDR foi o dobro da porcentagem para isolados MDR. Não somente no Brasil, mas também em diversos países, P. aeruginosa MDR e/ou XDR estão sendo cada vez mais relatadas, ganhando espaços importantes nesse cenário (CORREA et al., 2015; PEREIRA et al., 2015; POBIEGA et al., 2015; TEBANO et al., 2015; WILLMANN et al., 2014; YAYAN; GHEBREMEDHIN; RASCHE, 2015).

Apesar de produção de β-lactamases estar fortemente relacionada aos membros da Ordem Enterobacterales, *P. aeruginosa* produtores de β-lactamases já foram relatados em diversos países. No presente estudo foram encontradas β-lactamases de classe A e B de Ambler as quais são importantes determinantes de resistência (OLIVER et al., 2015; POTRON; POIREL; NORDMANN, 2015). Por sua extraordinária capacidade de adquirir genes de resistência, somada às suas resistências intrínsecas, restaram opções terapêuticas limitadas que são efetivas para o tratamento de infecções causadas por *P. aeruginosa*.

No isolado *P. aeruginosa* 463/12, determinou-se que a estrutura IS*CR1*+bla_{CTX}-M-2 estava inserida no cromossomo deste isolado como já descrito na literatura em outros estudos, tanto com isolados de Enterobacteriaceae quanto de Pseudomonas spp (FERREIRA et al., 2016; GALETTI; ANDRADE; DA COSTA DARINI, 2015; HARADA et al., 2012; PICÃO et al., 2009). Por outro lado, no isolado P. aeruginosa 1206/13 determinou-se que tanto bla_{CTX-M-2} quanto bla_{GES-1} estavam organizados em novo integron de classe I, In1600 o qual estava inserido em plasmídeo IncP2. CTX-M-2 é uma das variantes mais prevalentes no Brasil e em outros países da América Latina, a qual já foi descrita em diversos estudos sendo carreada por diferentes plasmídeos circulantes entre bactérias gram-negativas, consequentemente aumentando e facilitando sua disseminação (CANTÓN; GONZÁLEZ-ALBA; GALÁN, 2012; FERREIRA et al., 2016; ROCHA; PINTO; BARBOSA, 2015). De acordo com a literatura, a variante GES-1 hidrolisa apenas cefalosporinas. Essa e outras variantes desta enzima já foram descritas organizadas como genes cassetes em integrons de classe I e classe III em isolados de P. aeruginosa (CUZON et al., 2016; NAAS; DORTET; IORGA, 2016; NAAS; POIREL; NORDMANN, 2008). Os plasmídeos IncP2 foram encontrados em bactérias ambientais carregando determinante de tolerância ao telúrio (XIONG et al., 2013). Além de apresentar genes de conjugação (TraV, TraB, TraG) e de partição (ParA e ParB), p1206/13 também apresentou diversos determinantes de virulência, incluindo proteínas pil (PilT e PilG) que controlam a motilidade bem como a formação de pili e biofilme tipo IV, e operon che, que é conhecido por ser essencial para a quimiotaxia de flagelos em P. aeruginosa (BURROWS, 2012). Estes determinantes de virulência também foram detectados em outros plasmídeos IncP2 de P. aeruginosa [pBJ37] (BOTELHO et al., 2017) e pOZ176 (XIONG et al., 2013)]. No entanto, o operon mer, presente nestes dois plasmídeos, não foi detectado em p1206/13.

De acordo com análise do resultado de MLST, os isolados *P. aeruginosa* 463/12 e *P. aeruginosa* 1206/13 pertenceram aos ST235 e ST1602, respectivamente (CACCI et al., 2016; WRIGHT et al., 2015). ST235 é considerado um clone de alto risco (do inglês, *high-risk clone* [HiRC]) disseminando não apenas os genes codificadores de metalo-β-lactamases, mas também *bla*_{CTX-M-2}, como foi determinado neste estudo. Por outro lado, ST1602 foi recentemente caracterizado em dois isolados clínicos de *P. aeruginosa* do Brasil (CACCI et al., 2016), sendo Pa1206/13 o primeiro relato de isolado pertencente ao ST1602 produtor de ESBL (BALLABEN et al., 2019).

No presente estudo, bla_{IMP-16} foi detectado no único isolado de P. putida, a qual foi primeiramente encontrado no Brasil em 2004 (MENDES et al., 2004) e desde então não houve outro relato similar no país (POTRON; POIREL; NORDMANN, 2015). A primeira IMP-1 em P. aeruginosa foi relatada em 1988 (WATANABE et al., 1991) no Japão, associada a integron de classe 1, localizado em um plasmídeo conjugativo. Após isso, foi relatada em diversas outras espécies, mas possuindo, na maioria das vezes, um clone específico contribuindo para essa disseminação (HONG et al., 2015). Existem poucos relatos na literatura de isolados de P. putida produtores de bla_{IMP-like}, e de acordo com o banco de dados do NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed), até o momento foram descritas 80 variantes desta metalo-beta-lactamase. Recentemente P. putida produtor de bla_{IMP-45} e armA foi relatado na China. Os genes de resistência estavam inseridos em mega plasmídeo o qual foi completamente sequenciado (Número de Acesso no GenBank KY883660.1) (YUAN et al., 2017). Isolados de P. putida são amplamente distribuídos na natureza, e comumente espalhados no solo e na água, onde contribuem para a decomposição de múltiplas toxinas orgânicas (XIANG et al., 2019). O grupo P. putida é composto por várias espécies intimamente relacionadas (P. putida, P. monteilii e P. mosselii) que vivem no solo e águas superficiais como saprófitos dentro de comunidades complexas (GOMILA et al., 2015). Embora pouco patogênicos para humanos, essas bactérias podem ocasionalmente causar infecções agudas ou crônicas em pacientes imunocomprometidos. Assim, espécies como P. putida, P. monteilii e P. mosselii são regularmente isoladas de amostras clínicas (LIAPIS et al., 2019). Devido à resistência intrínseca dessas bactérias a muitos antibióticos e à sua baixa virulência, isolados de P. putida hospitalar não eram de tanta importância até o momento. No entanto, a presença de P. putida MDR no ambiente hospitalar é cada vez mais relatada (OLIVER et al., 2015; RAPHAEL; RILEY, 2017).

Com resultados preliminares encontrados neste estudo, IMP-16 está inserida em integron de classe I, sendo o primeiro gene cassete. De acordo com a literatura, essas enzimas são geralmente encontradas organizadas como gene cassete, associadas a outros genes de resistência como, por exemplo, AMEs. Recentemente, foram caracterizados diversos isolados de *P. aeruginosa* e *P. putida* produtores de *bla*_{IMP-63}. Liapis e colaboradores (LIAPIS et al., 2019) determinaram diversidade de EGM, entre eles integron de classe I, responsáveis pela disseminação desta metalo-beta-lactamase em isolados clínicos na Europa. Além disso, os autores compararam todas as variantes desta enzima, e IMP-16, detectada no presente estudo, se encontra destacada na Figura 4.

MP-25

MP-25

MP-25

MP-25

MP-29

MP-21

MP-21

MP-21

MP-21

MP-21

MP-21

MP-21

MP-22

MP-21

MP-22

MP-21

MP-22

MP-22

MP-23

MP-24

MP-25

MP-25

MP-25

MP-26

MP-26

MP-27

MP-27

MP-29

MP-21

MP-29

MP-21

MP-29

MP-21

MP-29

MP-21

MP-29

MP

Figura 4: Filogenia das metalo-\u00b1-lactamases do tipo IMP

Fonte: (LIAPIS et al., 2019).

O cladograma é baseado nas sequências de aminoácidos de 76 MBLs do tipo IMP depositadas no banco de dados do NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov). A construção do cladograma foi realizada pelo método da máxima verossimilhança, com 100 repetições. Valores de *bootstrap* são indicados ao lado de cada ramificação. Nesta representação, o comprimento dos ramos é irrelevante da distância evolutiva. IMP-16 está destacada.

No presente estudo, entre os membros da Ordem Enterobacterales, mais de 30% dos isolados de *Klebsiella* spp apresentaram *bla*CTX-M-8, a qual foi relatada primeiramente em isolados do Brasil, em 2000 (BONNET et al., 2000). Desde então, tem-se observado mais relatos deste alelo em amostras ambientais e animais de produção tanto no Brasil quanto em outros países (AIZAWA et al., 2014; CASELLA et al., 2015; DROPA et al., 2016; ELLER et al., 2014; FERREIRA et al., 2014; KAWAMURA et al., 2014). Entretanto, mesmo que em casos esporádicos, ainda sim existem relatos em amostras clínicas, no Brasil e em outros países (GARCIA-FULGUEIRAS et al., 2011; MINARINI et al., 2009; SENNATI et al., 2012). Recentemente foi realizada revisão sistemática pela qual pode-se determinar que as variantes mais predominantes no Brasil são CTX-M-2 e CTX-M15, seguidas por CTX-M-8, CTX-M-9 e CTX-M-59 (ROCHA; PINTO; BARBOSA, 2015).

CTX-M-2 no presente estudo, foi identificado em 30% dos isolados de *Klebsiella* sp. O sucesso da disseminação dos genes da família CTX-M é fortemente relacionado com a habilidade dos mesmos de serem mobilizados por estruturas genéticas, em especial sequências de inserção e integrons. O grupo das enzimas CTX-M-2, em particular, são codificadas por genes frequentemente encontrados em integrons de classe 1, associados a IS*CR1* ou IS*Ecp1* (CANTÓN; GONZÁLEZ-ALBA; GALÁN, 2012; KAYAMA et al., 2015; TOLEMAN; WALSH, 2011). Essas associações já foram relatadas em isolados brasileiros desde 2000, sendo encontrados tanto presentes em plasmídeos como no cromossomo bacteriano (CLÍMACO; MINARINI; DA COSTA DARINI, 2010; DROPA et al., 2015).

Outro gene encontrado nos isolados de *K. pneumoniae* do presente estudo foi *bla*_{KPC-2}. Entre as variantes desta enzima, KPC-2 e KPC-3 estão entre as mais prevalentes, possuindo relatos em diversos membros da ordem Enterobacterales provenientes de vários países. Em alguns países em específico são consideradas endêmicas, como por exemplo, norte dos Estados Unidos, Porto Rico, Colômbia, Grécia, Itália, Israel e China (PITOUT; NORDMANN; POIREL, 2015). No Brasil, *bla*_{KPC-2} teve seu primeiro relato em 2006, em isolado de *K. pneumoniae* o qual também era produtor de *bla*_{CTX-M-2} (MONTEIRO et al., 2009). Desde então, diversos trabalhos relataram não somente *K. pneumoniae* produtora de KPC, mas também membros da ordem Enterobacterales (ANDRADE et al., 2011; D'ALINCOURT CARVALHO-ASSEF et al., 2010; DEL-PELOSO; BARROS; SANTOS, 2010; LEAO et al., 2011; PEREIRA et al., 2013; SEKI et al., 2011; SILVA et al., 2015; TAVARES et al., 2014).

A disseminação de *bla*_{KPC-2} e *bla*_{KPC-3} está fortemente relacionada com isolados de *K. pneumoniae* ST258. Além disso, plasmídeos epidêmicos (ex.: IncFIIk) presentes nessas amostras, associados a EGM, como por exemplo, o Tn*4401*, tem papel significativo na disseminação dessas carbapenemases (NAAS et al., 2008).

Durante o período de estudo (2007-2014), foi possível observar que essas bactérias apresentaram um padrão semelhante no perfil de sensibilidade referente aos beta-lactâmicos entre os anos de 2007-2012. Apenas os isolados referentes aos anos de 2013-2014 apresentaram modificação no perfil de sensibilidade em relação aos carbapenêmicos, sendo estes produtores de *bla*_{KPC-2}. O isolado *K. pneumoniae* 93/13 também apresentou resistência aos carbapenêmicos, no entanto, não foi produtor de nenhuma carbapenemase pesquisada. Diante disso, podemos sugerir que o fenótipo apresentado por esse isolado pode estar relacionado com outros mecanismos de resistência não enzimáticos, como por exemplo, alteração de porinas, hiperexpressão de bombas de efluxo (DU et al., 2018; PULZOVA; NAVRATILOVA; COMOR, 2016)

Os isolados *K. pneumoniae* 802/07, 931/07, 1012/11, 1180/11, 533/11 apresentaram resistência à cefoxitina. Nenhum destes apresentou nenhum gene que pudesse explicar essa resistência, podendo ser sugerido que esse fenótipo de resistência à cefoxitina está relacionado com outros mecanismos de resistência não enzimáticos (DU et al., 2018).

Vinte determinantes de virulência foram investigados e todos os isolados apresentaram *mrkD* (exceto *K. pneumoniae* 949/11), *entB*, *iroD*, *fecIRA*, *ugE*, *wabG*, *fimH* e *ureA*. No entanto, apenas *K. pneumoniae* 655/14 também apresentou *kfuBC*, um gene que tem sido associado com a capacidade da bactéria de causar infecções invasivas. Além disso, *ybtS* também foi encontrado o qual é importante sistema de sideróforos que desempenha papel fundamental na persistência e capacidade de sobrevivência das bactérias no hospedeiro por meio da aquisição de ferro. O gene *clb* também foi detectado em quatro isolados e recentemente mostrou desempenhar papel importante na caracterização de isolados hipervirulentos de *K. pneumoniae* (CERDEIRA et al., 2018). Em relação ao contexto virulento, a combinação dos genes de virulência encontrados nos isolados do presente estudo parece corresponder ao padrão conhecido observado em isolados associados a infecções hospitalares. Diferentemente do que é comumente encontrado em isolados de KPhv que causam infecções invasivas, como abscesso hepático e meningite (KU et al., 2017). Além disso, não houve diferença nos perfis de virulência entre os isolados produtores de CTX-M

e/ou KPC. Normalmente, um isolado de KPhv possui pelo menos duas das seguintes características microbiológicas: "string test" positivo, amplificação dos genes rmpA/rmpA2 e/ou iuc e/ou ybtS e/ou clb (CERDEIRA et al., 2018). Embora os isolados estudados não tenham apresentado características específicas de uma bactéria causadora de meningite que possam estar associados à sua capacidade de causar doença, os genes ybtS e clb foram encontrados entre os isolados estudados. Sabe-se que esses genes normalmente são mobilizados pelo ICEKp, elemento genético móvel mais comum associado à virulência entre K. pneumoniae (LAM et al., 2018). De acordo com os resultados obtidos após a pesquisa dos determinantes de virulência entre os isolados do estudo, é possível sugerir que estes isolados não foram associados a infecções invasivas. Ainda assim, outros estudos demonstraram que K. pneumoniae com o fenótipo HV e os genes $rmpA^{-}/magA^{-}$ (como o caso do isolado 949/11) foram capazes de causar disseminação metastática (ANDRADE et al., 2018; CUBERO et al., 2016; LIU et al., 2014). Esses resultados reforçam a recente proposta sobre as características de hipermucoviscosidade e hipervirulência entre os isolados de K. pneumoniae. Atualmente esses termos têm sido discutidos como iguais e complementares, ou seja, a hipermucoviscosidade era sinônimo de hipervirulência (CATALÁN-NÁJERA; GARZA-RAMOS; BARRIOS-CAMACHO, 2017). No entanto, para diferenciar K. pneumoniae causadora de meningite de outras K. pneumoniae isoladas de diferentes sítios infecciosos, tem sido demonstrado que são necessários outros experimentos, tais como, expressão de genes de virulência e sua correlação na capacidade dos isolados em causarem infecções invasivas, assim como a pesquisa de possíveis novos determinantes de virulência associados à esta mesma capacidade.

Assim, os resultados aqui apresentados demonstram a necessidade de continuar investigando os determinantes de virulência entre os isolados de *K. pneumoniae* MDR para correlacioná-los com a capacidade desses isolados de causar infecções invasivas. Esses achados são assustadores devido ao fato de que o tratamento dessas infecções já está comprometido com a disseminação de isolados MDR e, combinado com o contexto de virulência, pode representar uma ameaça ainda maior para a saúde pública.

Isolados de *Enterobacter* sp fazem parte do grupo comumente chamando CESP (*Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia* e *Providencia*), composto por membros da ordem Enterobacterales produtores de AmpC cromossômica. Sabe-se que a hiperexpressão da β-lactamase do tipo AmpC confere resistência às cefalosporinas de 3ª geração

(JACOBY, 2009). No entanto, apenas 1 isolado de E. cloacae apresentou hiperexpressão de AmpC pelo teste fenotípico. Além disso, o isolado K. aerogenes 1193/12 foi produtor de CTX-M-15, β-lactamase que está mundialmente disseminada, e assim como a variante CTX-M-2, também é uma das mais detectadas em isolados brasileiros (ROCHA; PINTO; BARBOSA, 2016). Este mesmo isolado também foi produtor de *qnrB1*, assim como 3 isolados de *K. pneumoniae* também coproduziram βlactamases e variantes de *qnr*, corroborando com outros estudos os quais demonstraram coprodução destes genes, em diferentes isolados de membros da Ordem Enterobacterales (FILIPPA et al., 2013; WEI et al., 2015). É conhecido que a presença de genes PMQR não conferem o fenótipo de resistência às quinolonas e sim a diminuição de sensibilidade às mesmas. Em relação aos isolados de enterobactérias do estudo (Klebsiella sp e Enterobacter sp), em ambos os gêneros, mais de 85% dos isolados apresentaram fenótipo de resistência à essa classe, e provavelmente um ou mais mecanismos de resistência estão envolvidos, tais como hiperexpressão de bombas de efluxo, diminuição de permeabilidade de membrana, e o mais comumente encontrado, mutações cromossômicas nos genes gyrA, gyrB, parC e parE (ALDRED et al., 2013).

Onze isolados HLAR foram selecionados para estudo mais aprofundado. Entre os isolados de P. aeruginosa em nosso estudo, tanto aacA4 quanto aph(3')-IIb (100%) foram os genes AME mais prevalentes seguidos por aphA6 e aadA6, aadB, aadA2, aadA7, strA e strB. Estudo publicado em 2013 demonstrou que entre 76 isolados de P. aeruginosa de pacientes internados, quatro aminoglicosídeos foram testados sendo a amicacina a mais ativa contra os isolados (46%) seguida de tobramicina, gentamicina, netilmicina e canamicina. Entre os 9 genes de AMEs detectados, o aph(3')-IIb foi o mais prevalente seguido pelo aacA4, aphA1, aadB, aadA1, aphA6 e aacC1. Estes resultados demonstram a correlação entre o fenótipo e o genótipo entre os isolados de A. baumannii e P. aeruginosa (AGHAZADEH et al., 2013). Estudo recente investigou a prevalência de genes AME em isolados de A. baumannii, onde as taxas de resistência foram de 57,4%, 54%, 87,3%, 47,1% e 21,8% para gentamicina, amicacina, canamicina, tobramicina e netilmicina, respectivamente (HASANI et al., 2016). Outro estudo com 75 isolados de A. baumannii de pacientes internados coletados entre novembro de 2010 e junho de 2011 foram investigados. Destes isolados, 71 eram resistentes a pelo menos um dos aminoglicosídeos testados e apresentavam um ou mais AMEs. Entre os antibióticos testados, a canamicina apresentou a maior taxa de resistência (93%),

seguida pela gentamicina (92%), amicacina (81,4%), tobramicina (69,3%) e netilmicina (61,3%). Entre as AMEs detectadas, *aphA6* foi a predominante seguida por *aadB*, *aacC1*, *aadA1*, *aphA1* e *aacA4* (AGHAZADEH et al., 2013).

Além disso, no presente estudo, apenas *A. baumannii* 143/11 apresentou diminuição da CIM na presença do inibidor PAβN, sugerindo mínimo envolvimento de bombas de efluxo nos fenótipos de resistência aos aminoglicosídeos entre os isolados testados neste estudo (BALLABEN et al., 2018). Apesar deste resultado, outros estudos já demonstraram a importância e influência da presença de sistemas de bombas de efluxo da família RND a qual é conhecida por ser associada com isolados MDR de *A. baumannii* (VENTER et al., 2015; YOON et al., 2015).

6.0. Conclusões

- Genes codificadores de β-lactamases em enterobactérias foram frequentes
- Genes codificadores de β-lactamases em A. baumannii foram frequentes e sempre associados com localização cromossômica
- Genes codificadores de β-lactamases em P. aeruginosa foram raros, mas todos os detectados tiveram importância clínica-epidemiológica por estarem em plasmídeos
- Diferentes PMQR foram detectados apenas em isolados de *K. pneumoniae* e *K. aerogenes*
- Fenótipo de HLAR foi devido à presença de 16S-RMTases conhecidas como também pela associação de diferentes AMEs em isolados de enterobactérias e BGN-NF
- Sequenciamento do genoma completo foi essencial para elucidação da associação de diferentes AMEs no fenótipo de HLAR
- O envolvimento de bombas de efluxo no fenótipo de HLAR foi mínimo em BGN-NF
- A arbecacina foi um bom marcador para a produção de 16S-RMTases em isolados tanto de enterobactérias quanto de BGN-NF
- Determinantes de virulência encontrados entre isolados de *K. pneumoniae* foram característicos de isolados associados com infecções hospitalares

7.0. Referências Bibliográficas

ABBOTT, S.L.; *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Plesiomonas* and Other *Enterobacteriaceae*. In: VERSALOVIC, J. et al. **Manual of Clinical Microbiolgy.** Washington: 10th ed. ASM Press, 639-57, 2011.

ADEOLU, M. et al. Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': Proposal for enterobacterales ord. nov. divided into the families *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., *Morganellaceae* fam. nov., and *Budviciaceae* fam. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5575–5599, 2016.

AGHAZADEH, M. et al. Dissemination of Aminoglycoside-Modifying Enzymes and 16S rRNA Methylases Among *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* Isolates. **Microbial drug resistance**, v. 19, n. 4, p. 282–288, 2013.

AIZAWA, J. et al. Identification of fluoroquinolone-resistant extended-spectrum??-lactamase (CTX-M-8)-producing *Escherichia coli* ST224, ST2179 and ST2308 in buffalo (Bubalus bubalis). **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 69, n. 10, p. 2866–2869, 2014.

ALDRED, K. J. et al. Overcoming Target-Mediated Quinolone Resistance in Topoisomerase IV by Introducing Metal Ion-Independent Drug- Enzyme Interactions. **ACS Chem Biol**, v. 12, n. 3, p. 2660–2668, 2013.

ANDRADE, L. N. et al. Determinants of β -lactam resistance in meningitis-causing Enterobacteriaceae in Brazil. **Can J Microbiol**, v. 56, n. 5, p. 399–407, 2010.

ANDRADE, L. N. 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. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 7, p. 3579–3583, 2011.

ANDRADE, L. N. et al. Virulence genes, capsular and plasmid types of multidrugresistant CTX-M(-2, -8, -15) and KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from four major hospitals in Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 91, n. 2, p. 164–168, 2018.

ANDRADE, L. N.; DARINI, A. L. C. Bacilos gram-negativos produtores de beta-lactamases: que bla bla é esse? **Journal of Infection Control**, v. 6, n. 1, p. 1–29, 2017.

AZAM, M. W.; KHAN, A. U. Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. **Drug Discovery Today**, v. 00, n. 00, p. 1–10, 2018.

BALLABEN, A. S. et al. Diversity of high-level aminoglycoside resistance mechanisms among Gram-negative nosocomial pathogens in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, n. August, p. 1–9, 2018.

- BALLABEN, A. S. et al. Plasmid carrying *bla*_{CTX-M-2} and *bla*_{GES-1} in extensively drugresistant *Pseudomonas aeruginosa* from cerebrospinal fluid. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, n. May, 2019.
- BARREIRA, E. Meningite por *Enterobacter sakazakii* em recém-nascido: relato de caso. **Pediatria** (**São Paulo**), v. 25, p. 65–70, 2003.
- BARTON, B. M.; HARDING, G. P.; ZUCCARELLI, A. J. A general method for detecting and sizing large plasmids. **Anal.Biochem.**, v. 226, n. 2, p. 235–240, 1995.
- BERMAN, H. et al. Distribution of strain type and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolates causing meningitis in a large urban setting in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 1418–1422, 2014.
- BERTINI, A. et al. Characterization and PCR-based replicon typing of resistance plasmids in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 10, p. 4168–4177, 2010.
- BOGAERTS, P. et al. Validation of carbapenemase and extended-spectrum β -lactamase multiplex endpoint PCR assays according to ISO 15189. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 7, p. 1576–1582, 2013.
- BOLANO, A. et al. Rapid methods to extract DNA and RNA from *Cryptococcus neoformans*. **FEMS Yeast Research**, v. 1, n. 3, p. 221–224, 2001.
- BONNET, R. et al. A novel CTX-M β -lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant *Enterobacteriaceae* isolated in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 7, p. 1936–1942, 2000.
- BOTELHO, J. et al. The complete nucleotide sequence of an IncP-2 megaplasmid unveils a mosaic architecture comprising a putative novel *bla*_{VIM-2}-harbouring transposon in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 8, p. 2225–2229, 2017.
- BRASIL AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Módulo 6: Detecção e identificação de bactérias de importância médica. **Microbiologia Clínica para o controle da infecção relacionada à assistência em saúde**, p. 1–154, 2013.
- BRISSE, S. et al. Virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*: Identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization. **PLoS ONE**, v. 4, n. 3, 2009.
- BUENO, M. F. C. et al. Coproduction of 16S rRNA methyltransferase RmtD or RmtG with KPC-2 and CTX-M group extended-spectrum βlactamases in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 5, p. 2397–2400, 2013.
- BURROWS, L. L. *Pseudomonas aeruginosa* Twitching Motility: Type IV Pili in Action . **Annual Review of Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 493–520, 2012.

- BUSH, K. Carbapenemases: Partners in crime. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 1, n. 1, p. 7–16, 2013.
- BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of β-lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969–976, 2010.
- CACCI, L. C. et al. Mechanisms of carbapenem resistance in endemic *Pseudomonas aeruginosa* isolates after an SPM-1 metallo- β -lactamase producing strain subsided in an intensive care unit of a teaching hospital in Brazil. v. 111, n. September, p. 551–558, 2016.
- CANTÓN, R.; GONZÁLEZ-ALBA, J. M.; GALÁN, J. C. CTX-M enzymes: Origin and diffusion. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. APR, 2012.
- CARATTOLI, A. et al. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. **Journal of Microbiological Methods**, v. 63, n. 3, p. 219–228, 2005.
- CARATTOLI, A. Plasmids and the spread of resistance. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, n. 6–7, p. 298–304, 2013.
- CARNEIRO, M. R. et al. Case Report Meningitis caused by *Salmonella enterica* serotype Panama in Brazil: first case reported. v. 51, n. 2, p. 244–246, 2018.
- CARTER, M. W. et al. Detection of extended-spectrum Beta-lactamases in klebsiellae with the Oxoid combination disk method. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 11, p. 4228–4232, 2000.
- CARVALHO, K. R. et al. Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes carrying blaOXA-23 collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 34, n. 1, p. 25–28, 2009.
- CASELLA, T. et al. Detection of *bla*_{CTX-M}-type genes in complex class 1 integrons carried by *Enterobacteriaceae* isolated from retail chicken meat in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, v. 197, p. 88–91, 2015.
- CATALÁN-NÁJERA, J. C.; GARZA-RAMOS, U.; BARRIOS-CAMACHO, H. Hypervirulence and hypermucoviscosity: Two different but complementary *Klebsiella* spp. phenotypes? **Virulence**, v. 8, n. 7, p. 1111–1123, 2017.
- CATTOIR, V. et al. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, n. 2, p. 394–397, 2007.
- CAVACO, L. M. et al. *qnrD*, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and Bovismorbificans strains of human origin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 2, p. 603–608, 2009.
- CERDEIRA, L. T. et al. Yersiniabactin, Colibactin and Wider Resistome Contribute to Enhanced Virulence and Persistence of KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* CG258 in South America. **bioRxiv**, p. 435750, 2018.

- CHAGAS, T. P. G. et al. Characterization of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Brazil (2008-2011): Countrywide spread of OXA-23-producing clones (CC15 and CC79). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 79, n. 4, p. 468–472, 2014.
- CHARFI-KESSIS, K. et al. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains carrying the bla_{OXA-23} and the bla_{GES-11} genes in a neonatology center in Tunisia. **Microbial pathogenesis**, v. 74, p. 20–4, 2014.
- CHEN, Y. et al. Spread of the *bla*_{OXA-23}-Containing Tn 2008 in Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates Grouped in CC92 from China. v. 8, n. February, p. 1–6, 2017.
- CHOU, H. C. et al. Isolation of a chromosomal region of *Klebsiella pneumoniae* associated with allantoin metabolism and liver infection. **Infection and Immunity**, 2004.
- CLÍMACO, E. C. et al. Clonal complexes 104, 109 and 113 playing a major role in the dissemination of OXA-carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in Southeast Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 19, p. 127–133, 2013.
- CLÍMACO, E. C.; MINARINI, L. A. R.; DA COSTA DARINI, A. L. CTX-M-producing *Klebsiella* spp. in a Brazilian hospital: What has changed in 6 years? **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 68, n. 2, p. 186–189, 2010.
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. 26th. ed. [s.l: s.n.].
- COELHO-SOUZA, T. et al. Longitudinal surveillance for meningitis by *Acinetobacter* in a large urban setting in Brazil. p. 17–20, 2013.
- COMPAIN, F. et al. Multiplex PCR for detection of seven virulence factors and K1/K2 capsular serotypes of *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 12, p. 4377–4380, 2014.
- COOLS, P. Acinetobacter, Chryseobacterium, Moraxella, and Other Nonfermentative Gram-Negative Rods. In: CARROLL, K. C. et al. **Manual of Clinical Microbiolgy.** Washington: 12th ed. ASM Press, 807-28, 2019.
- CORREA, A. et al. Dissemination of high-risk clones of extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Colombia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 4, p. 2421–2425, 2015.
- CORRÊA, L. L. et al. Revised and updated multiplex PCR targeting acquired 16S rRNA methyltransferases. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 43, n. 5, p. 479–481, 2014.
- COX, G. et al. Plazomicin retains antibiotic activity against most aminoglycoside modifying enzymes. **ACS Infectious Diseases**, p. acsinfecdis.8b00001, 2018.

- CUBERO, M. et al. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* clones causing bacteraemia in adults in a teaching hospital in Barcelona, Spain (2007-2013). **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 2, p. 154–160, 2016.
- CUZON, G. et al. Spread of plasmids carrying multiple GES variants. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 8, p. 5040–5043, 2016.
- D'ALINCOURT CARVALHO-ASSEF, A. P. et al. *Escherichia coli* producing KPC-2 carbapenemase: First report in Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 68, n. 3, p. 337–338, 2010.
- DAL-BÓ, K.; SIVA, R.; SAKAE, T. Nosocomial infections in a neonatal intensive care unit in South Brazil. **Revista brasileira de terapia intensiva**, v. 24, n. 4, p. 381–385, 2012.
- DAVIS, M. A. et al. Discovery of a gene conferring multiple-aminoglycoside resistance in *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 6, p. 2666–2669, 2010.
- DE ALMEIDA, S. M. et al. Nosocomial meningitis caused by *Klebsiella pneumoniae* producing carbapenemase, with initial cerebrospinal fluid minimal inflammatory response. **Arq Neuro-Psiquiatr**, v. 72, n. 5, p. 398–399, 2014.
- DEL-PELOSO, P. F.; BARROS, M. F. L. DE; SANTOS, F. A. DOS. Sepse por *Serratia marcescens* KPC. **J Bras Patol Med Lab**, v. 46, n. 5, p. 365–367, 2010.
- DHANJI, H. et al. Cephalosporin resistance mechanisms in *Escherichia coli* isolated from raw chicken imported into the UK. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 12, p. 2534–2537, 2010.
- DOI, Y.; ARAKAWA, Y. 16S Ribosomal RNA Methylation: Emerging Resistance Mechanism against Aminoglycosides. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, n. 1, p. 88–94, 2007.
- DOI, Y.; WACHINO, J. ICHI; ARAKAWA, Y. Aminoglycoside Resistance: The Emergence of Acquired 16S Ribosomal RNA Methyltransferases. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 2, p. 523–537, 2016.
- DROLET, M. DNA Topoisomerases Methods and Protocols Methods in Molecular Biology 1703. [s.l: s.n.].
- DROPA, M. et al. Complex class 1 integrons harboring CTX-M-2-encoding genes in clinical *Enterobacteriaceae* from a hospital in Brazil. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 9, n. 8, p. 890–897, 2015.
- DROPA, M. et al. Genetic background of novel sequence types of CTX-M-8- and CTX-M-15-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from public wastewater treatment plants in São Paulo, Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, 2016.

- DU, D. et al. Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 9, p. 523–539, 2018.
- ELLER, C. et al. Emergence of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) CTX-M-8 in Germany. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 2, p. 562–564, 2014.
- ELLINGTON, M. J. et al. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo-beta-lactamases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, n. 2, p. 321–322, 2007.
- FANG, F. C.; SANDLER, N.; LIBBY, S. J. Liver abscess caused by magA+ *Klebsiella pneumoniae* in North America. **Journal of Clinical Microbiology**, 2005.
- FENG, Y. et al. Characterization of *Acinetobacter johnsonii* isolate XBB1 carrying nine plasmids and encoding NDM-1, OXA-58 and PER-1 by genome sequencing. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, p. 1–5, 2015.
- FERREIRA, J. C. et al. IncI1/ST113 and IncI1/ST114 conjugative plasmids carrying blaCTX-M-8 in *Escherichia coli* isolated from poultry in Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 80, n. 4, p. 304–306, 2014.
- FERREIRA, J. C. et al. Evaluation and characterization of plasmids carrying CTX-M genes in a non-clonal population of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* isolated from poultry in Brazil. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 85, n. 4, p. 444–448, 2016.
- FILIPPA, N. et al. Outbreak of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* carrying *qnrB1* and *bla*_{CTX-M-15} in a French intensive care unit. **Annals of Intensive Care**, v. 3, n. 1, p. 18, 2013.
- GALETTI, R.; ANDRADE, L. N.; DA COSTA DARINI, A. L. *Pseudomonas aeruginosa* carrying blaCTX-M-2 in Brazil: The occurrence of "high-risk clones"? **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 3, n. 2, p. 153–154, 2015.
- GALIMAND, M.; COURVALIN, P.; LAMBERT, T. Plasmid-Mediated High-Level Resistance to Aminoglycosides in *Enterobacteriaceae* Due to 16S rRNA Methylation. v. 47, n. 8, p. 2565–2571, 2003.
- GARCÍA-FERNÁNDEZ, A. et al. Characterization of plasmids harbouring *qnrS1*, *qnrB2* and *qnrB19* genes in *Salmonella*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, n. 2, p. 274–281, 2009.
- GARCIA-FULGUEIRAS, V. et al. Extended-spectrum beta-lactamases and plasmid-mediated quinolone resistance in enterobacterial clinical isolates in the paediatric hospital of Uruguay. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 8, p. 1725–1729, 2011.
- GHEORGHE, I. et al. Snapshot on carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in bucharest hospitals reveals unusual clones and novel genetic surroundings for *bla*_{OXA-23}. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n.

- 4, p. 1016–1020, 2014.
- GOMILA, M. et al. Phylogenomics and systematics in *Pseudomonas*. **Frontiers in Microbiology**, 2015.
- GONZALEZ-VILLORIA, A. M. et al. A multicenter study in mexico finds *Acinetobacter baumannii* clinical isolates belonging to clonal complexes 636B(113B) and 92B harboring OXA-72, OXA-239, and OXA-469. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 4, p. 2587–2588, 2016.
- GRAY, A. P. et al. Management of a hospital outbreak of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* using a multimodal intervention including daily chlorhexidine baths. **Journal of Hospital Infection**, 2016.
- GUPTA, G.; TAK, V.; MATHUR, P. Detection of AmpC β Lactamases in Gramnegative Bacteria. **Journal of laboratory physicians**, v. 6, n. 1, p. 1–6, 2014.
- HAMIDIAN, M. et al. A GC1 *Acinetobacter baumannii* isolate carrying AbaR3 and the aminoglycoside resistance transposon TnaphA6 in a conjugative plasmid. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 4, p. 955–958, 2014.
- HARADA, S. et al. Chromosomal integration and location on IncT plasmids of the *bla*_{CTX-M-2} gene in *Proteus mirabilis* clinical isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 2, p. 1093–1096, 2012.
- HARRIS, P. N. A.; FERGUSON, J. K. Antibiotic therapy for inducible AmpC β-lactamase-producing Gram-negative bacilli: What are the alternatives to carbapenems, quinolones and aminoglycosides? **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 40, n. 4, p. 297–305, 2012.
- HASANI, A. A. et al. Frequency of Aminoglycoside-Modifying Enzymes and ArmA Among Different Sequence Groups of *Acinetobacter baumannii* in Iran. **Microbial Drug Resistance**, v. 00, n. 00, p. mdr.2015.0254, 2016.
- HIGGINS, P. G.; LEHMANN, M.; SEIFERT, H. Inclusion of OXA-143 primers in a multiplex polymerase chain reaction (PCR) for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 35, n. 3, p. 305, 2010.
- HOFFMANN, H.; ROGGENKAMP, A. Population genetics of the nomenspecies *Enterobacter cloacae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 9, p. 5306–5318, 2003.
- HOLT, K. et al. Five decades of genome evolution in the globally distributed, extensively antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii* global clone 1. **Microbial Genomics**, n. January, 2016.
- HONG, D. J. et al. Epidemiology and characteristics of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. **Infection and Chemotherapy**, v. 47, n. 2, p. 81–97, 2015.

- HÖRNER, R. et al. PERFIL MICROBIOLÓGICO DAS MENINGITES EM UM HOSPITAL PÚBLICO UNIVERSITÁRIO Microbiological profile of meningitis in a public school hospital. v. 34, p. 1–5, 2008.
- HRENOVIC, J. et al. Science of the Total Environment Extensively and multi drug-resistant *Acinetobacter baumannii* recovered from technosol at a dump site in Croatia. **Science of the Total Environment**, v. 607–608, p. 1049–1055, 2017.
- HUANG, T. W. et al. Effective transfer of a 47 kb NDM-1-positive plasmid among *Acinetobacter* species. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 10, p. 2734–2738, 2015.
- JACOBY, G. A. AmpC β -Lactamases. Clinical Microbiology Reviews, v. 22, n. 1, p. 161–182, 2009.
- JACOBY, G.; STRAHILEVITZ, J.; HOOPER, D. Plasmid-mediated quinolone resistance. **Microbiol Spectr.**, v. 2, n. 2, p. 997–1003, 2014.
- KAWAMURA, K. et al. Molecular epidemiology of extended-spectrum β-lactamases and *Escherichia coli* isolated from retail foods including chicken meat in Japan. **Foodborne pathogens and disease**, v. 11, n. 0, p. 104–10, 2014.
- KAYAMA, S. et al. Complete nucleotide sequence of the IncN plasmid encoding IMP-6 and CTX-M-2 from emerging carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in japan. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 2, p. 1356–1359, 2015.
- KHORSI, K. et al. High prevalence of multidrug-resistance in *Acinetobacter baumannii* and dissemination of carbapenemase-encoding genes $bla_{OXA-23-like}$, $bla_{OXA-24-like}$ and bla_{NDM-1} in Algiers hospitals. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, v. 8, n. 6, p. 438–46, 2015.
- KHOSRAVI, A. D. et al. Molecular Methods for Identification of *Acinetobacter* Species by Partial Sequencing of the *rpoB* and 16S rRNA Genes. **Journal of clinical and diagnostic research : JCDR**, v. 9, n. 7, p. DC09-13, 2015.
- KU, Y. H. et al. *Klebsiella pneumoniae* Isolates from Meningitis: Epidemiology, Virulence and Antibiotic Resistance. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2017.
- LA SCOLA, B. et al. Sequencing of the *rpoB* gene and flanking spacers for molecular identification of *Acinetobacter* species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 3, p. 827–832, 2006.
- LAM, M. C. et al. Population genomics of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* clonal-group 23 reveals early emergence and rapid global dissemination. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 2018.
- LAMERS, R. P.; CAVALLARI, J. F.; BURROWS, L. L. The Efflux Inhibitor Phenylalanine-Arginine Beta-Naphthylamide (PAβN) Permeabilizes the Outer Membrane of Gram-Negative Bacteria. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. 1–7, 2013.

- LEAO, R. S. et al. KPC-2 producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* coinfection in a catheter-related infection. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 3, p. 380–382, 2011.
- LEE, I. R. et al. Differential host susceptibility and bacterial virulence factors driving *Klebsiella* liver abscess in an ethnically diverse population. **Scientific Reports**, v. 6, n. February, p. 1–12, 2016.
- LEE, J. H.; LEE, C. S. Clinical usefulness of arbekacin. **Infection and Chemotherapy**, v. 48, n. 1, p. 1–11, 2016.
- LEE, M. J. et al. Comparison of *rpoB* gene sequencing, 16S rRNA gene sequencing, *gyrB* multiplex PCR, and the VITEK2 system for identification of *Acinetobacter* clinical isolates. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 78, n. 1, p. 29–34, 2014.
- LIAPIS, E. et al. Identification of Diverse Integron and Plasmid Structures Carrying a Novel Carbapenemase Among *Pseudomonas* Species. **Frontiers in Microbiology**, 2019.
- LIU, Y. M. et al. Clinical and molecular characteristics of emerging hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections in mainland China. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 9, p. 5379–5385, 2014.
- LIVERMORE, D. M.; WOODFORD, N. The β-lactamase threat in Enterobacteriaceae, Pseudomonas and AcinetobacterTrends in Microbiology, 2006.
- MA, L. et al. Genomic Heterogeneity in *Klebsiella pneumoniae* Strains Is Associated with Primary Pyogenic Liver Abscess and Metastatic Infection . **The Journal of Infectious Diseases**, 2005.
- MAGIORAKOS, A et al. Bacteria: an International Expert Proposal for Interim Standard Definitions for Acquired Resistance. **Microbiology**, v. 18, n. 3, p. 268–281, 2011.
- MALTEZOU, H. C. Metallo-Beta-lactamases in Gram-negative bacteria: introducing the era of pan-resistance? **International Journal of Antimicrobial Agents**, 2009.
- MARTIN, R. M.; BACHMAN, M. A. Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, n. January, p. 1–15, 2018.
- MATHERS, A. J.; PEIRANO, G.; PITOUT, J. D. The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. **Clin.Microbiol.Rev.**, v. 28, n. 1098- 6618 (Electronic), p. 565–591, 2015.
- MENDES, R. E. et al. Integron carrying a novel metallo-beta-lactamase gene, $bla_{\text{IMP-}16}$, and a report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. **Antimicrobial**

agents and chemotherapy, v. 48, n. 12, p. 4693–4702, 2004.

MINARINI, L. A. R. et al. Plasmid-mediated quinolone resistance determinants among enterobacterial isolates from outpatients in Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, n. 3, p. 474–478, 2008.

MINARINI, L. A. R. et al. Predominance of CTX-M-type extended-spectrum betalactamase genes among enterobacterial isolates from outpatients in Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 65, n. 2, p. 202–206, 2009

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia de Vigilância Epidemiológica. [s.l: s.n.].

MONTEIRO, J. et al. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 1, p. 333–334, 2009.

MUGNIER, P. D. et al. Worldwide dissemination of the *bla*_{OXA-23} Carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, p. 35–40, 2010.

MUGNIER, P. D.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Functional analysis of insertion sequence IS*Aba1*, responsible for genomic plasticity of *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 7, p. 2414–2418, 2009.

NAAS, T. et al. Genetic structures at the origin of acquisition of the β -lactamase bla_{KPC} gene. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2008.

NAAS, T.; DORTET, L.; IORGA, B. Structural and functional aspects of class A carbapenemases. **Curr Drug Targets**, v. 17, p. 1006–1028, 2016.

NAAS, T.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Minor extended-spectrum β -lactamases. Clinical Microbiology and Infection, v. 14, p. 42–52, 2008.

NIGRO, S. J. et al. Carbapenem and amikacin resistance on a large conjugative *Acinetobacter baumannii* plasmid. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 4, p. 1259–1261, 2014.

NIGRO, S. J.; HALL, R. M. Structure and context of *Acinetobacter* transposons carrying the OXA-23 carbapenemase gene. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, p. 1–13, 2016.

NORDMANN, P.; NAAS, T.; POIREL, L. Global spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. **Emerging infectious diseases**, v. 17, n. 10, p. 1791–8, 2011.

OLIVER, A. et al. The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. **Drug Resistance Updates**, v. 21–22, p. 41–59, 2015.

PARTRIDGE, S. R. et al. Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 31, n. 4, p. 1–61, 2018.

PATON, R. et al. ARI 1: Beta-lactamase-mediated imipenem resistance in

- *Acinetobacter baumannii*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 2, n. 2, p. 81–87, 1993.
- PAVEZ, M.; MAMIZUKA, E. M.; LINCOPAN, N. Early dissemination of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 2702, 2009.
- PEIRANO, G. et al. Carbapenem-hydrolysing β-lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, n. 2, p. 265–268, 2009.
- PEREIRA, P. S. et al. Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: Spread of clonal complex 11 (ST11, ST437 and ST340). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 2, p. 312–316, 2013.
- PEREIRA, S. G. et al. Multidrug and Extensive Drug Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates from a Portuguese Central Hospital: 10-Year Survey. **Microbial drug resistance** (**Larchmont, N.Y.**), v. 21, n. 2, p. 194–200, 2015.
- PEREZ, F. et al. The continuing challenge of ESBLs Current Opinion in Pharmacology, **Current Opinion in Pharmacology**, v. 7, n. 5, p. 459-469, 2007.
- PHILIPPON, A.; ARLET, G.; JACOBY, G. A. Plasmid-determined AmpC-type β-lactamases, **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2002.
- PICÃO, R. C. et al. Further identification of CTX-M-2 extended-spectrum β-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 5, p. 2225–2226, 2009.
- PITOUT, J. D. D.; NORDMANN, P.; POIREL, L. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 10, p. 5873–5884, 2015.
- POBIEGA, M. et al. Molecular characterization of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from patients with urinary tract infections in Southern Poland. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 83, n. 3, p. 295–7, 2015.
- POTRON, A.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 45, n. 6, p. 568–585, 2015.
- POVILONIS, J. et al. Spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* carrying a plasmid with two genes encoding OXA-72 carbapenemase in Lithuanian hospitals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 5, p. 1000–1006, 2013.
- PULZOVA, L.; NAVRATILOVA, L.; COMOR, L. Alterations in Outer Membrane Permeability Favor Drug-Resistant Phenotype of *Klebsiella pneumoniae*. **Microbial Drug Resistance**, 2016.

- QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: The versatile Beta-lactamases. Clinical Microbiology Reviews, v. 20, n. 3, p. 440–458, 2007.
- RAMIREZ, M. S.; TOLMASKY, M. E. Aminoglycoside modifying enzymes, **Drug Resistance Updates**, 2010.
- RAPHAEL, E.; RILEY, L. W. Infections Caused by Antimicrobial Drug-Resistant Saprophytic Gram-Negative Bacteria in the Environment. **Frontiers in Medicine**, v. 4, n. October, 2017.
- REGUÉ, M. et al. A gene, *uge*, is essential for *Klebsiella pneumoniae* virulence. **Infect Immun**, v. 72, n. 1, p. 54–61, 2004.
- RIVERA, G. et al. Extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated in a university hospital: Role of inter-hospital transmission. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 10, n. 01, 2016.
- ROCHA, F. R.; PINTO, V. P. T.; BARBOSA, F. C. B. The Spread of CTX-M-Type Extended-Spectrum β -Lactamases in Brazil: A Systematic Review. **Microbial Drug Resistance**, 2016.
- RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, J. M.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Genetic and functional variability of AmpC-type β-lactamases from *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 11, p. 4930–4933, 2010.
- ROYER, S. et al. Molecular characterization and clonal dynamics of nosocomial bla OXA-23 producing XDR *Acinetobacter baumannii*, **PLOS ONE**, v. 113, p. 1–14, 2018.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- **SECRETARIA DO ESTADO DE SÃO PAULO. PROTOCOLO LABORATORIAL: MENINGITES BACTERIANAS** Atualização setembro de 2017 Acondicionamento, transporte e manuseio de cepas de. 2017.
- SEKI, L. M. et al. Molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Brazil: The predominance of sequence type 437. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 70, n. 2, p. 274–277, 2011.
- SENNATI, S. et al. Changing Epidemiology of Extended-Spectrum β -Lactamases in Argentina: Emergence of CTX-M-15. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 11, p. 6003–6005, 2012.
- SHARMA, M.; PATHAK, S.; SRIVASTAVA, P. Prevalence and antibiogram of Extended Spectrum β-lactamase (ESBL) producing Gram negative bacilli and further molecular characterization of ESBL producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 7, n. 10, p. 2173–2177, 2013.
- SHI, Q. et al. Diversity of virulence level phenotype of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* from different sequence type lineage. **BMC Microbiology**, v. 18, n. 1, p.

- 1–6, 2018.
- SILVA, K. E. et al. Coproduction of KPC-2 and IMP-10 in carbapenem-resistant *Serratia marcescens* isolated from an outbreak in a Brazilian teaching hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 7, p. 2324–2328, 2015.
- SOOD, S.; KUMAR VAID, V.; BHARTIYA, H. Meningitis due to *Stenotrophomonas maltophilia* after a neurosurgical procedure. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 7, n. 8, p. 1696–1697, 2013.
- TACCONELLI, E. et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 18, n. 3, p. 318–327, 2018.
- TAVARES, C. P. et al. Molecular epidemiology of KPC-2-producing *Enterobacteriaceae* (non-*Klebsiella pneumoniae*) isolated from Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 82, n. 4, p. 326–330, 2014.
- TEBANO, G. et al. Epidemiology and risk factors of multidrug-resistant bacteria in respiratory samples after lung transplantation. **Transplant Infectious Disease**, p. n/a-n/a, 2015.
- TINDALL, B. J.; SUTTON, G.; GARRITY, G. M. *Enterobacter aerogenes* hormaeche and Edwards 1960 (Approved lists 1980) and *Klebsiella mobilis* bascomb et al. 1971 (approved lists 1980) share the same nomenclatural type (ATCC 13048) on the approved lists and are homotypic synonyms, with consequences for. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 67, n. 2, p. 502–504, 2017.
- TOH, B. E. W. et al. Species identification within *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex using MALDI-TOF MS. **Journal of Microbiological Methods**, v. 118, p. 128–132, 2015.
- TOLEMAN, M. A.; WALSH, T. R. Combinatorial events of insertion sequences and ICE in Gram-negative bacteria. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 35, n. 5, p. 912–935, 2011.
- TOWNER, K. J. et al. Distribution of intrinsic plasmid replicase genes and their association with carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase genes in European clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 5, p. 2154–2159, 2011.
- TURTON, J. F. et al. The role of IS*Aba1* in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 258, n. 1, p. 72–77, 2006.
- TURTON, J. F. et al. PCR characterization and typing of *Klebsiella pneumoniae* using capsular type-specific, variable number tandem repeat and virulence gene targets. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, n. 5, p. 541–547, 2010.
- TURTON, J. F. et al. Virulence genes in isolates of *Klebsiella pneumoniae* from the UK during 2016, including among carbapenemase gene-positive hypervirulent K1-st23 and

'non-hypervirulent' types ST147, ST15 and ST383. **Journal of Medical Microbiology**, v. 67, n. 1, p. 118–128, 2018a.

TURTON, J. F. et al. Capsular type K54, clonal group 29 and virulence plasmids: An analysis of K54 and non-K54 closely related isolates of *Klebsiella pneumoniae*. **Epidemiology and Infection**, v. 5, 2018b.

VENTER, H. et al. RND-type drug efflux pumps from Gram-negative bacteria: Molecular mechanism and inhibition. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. APR, p. 1–11, 2015.

VILACOBA, E. et al. SHORT REPORT Widespread dispersion of the resistance element tet(B):ISCR2 in XDR Acinetobacter baumannii isolates. n. 2016, p. 1574–1578, 2017.

WACHINO, J. et al. Novel Plasmid-Mediated 16S rRNA m 1 A1408 Methyltransferase , NpmA , Found in a Clinically Isolated *Escherichia coli* Strain Resistant to Structurally Diverse Aminoglycosides. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 12, p. 4401–4409, 2007.

WACHINO, J.; ARAKAWA, Y. Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: An update. **Drug Resistance Updates**, v. 15, n. 3, p. 133–148, 2012.

WANG, J. et al. Species distribution of clinical *Acinetobacter* isolates revealed by different identification techniques. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. 1–7, 2014.

WANG, M. et al. New plasmid-mediated quinolone resistance gene, *qnrC*, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 5, p. 1892–1897, 2009.

WATANABE, M. et al. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 35, n. 1, p. 147–151, 1991.

WEI, D.-D. et al. Characterization of Extended-Spectrum Beta-Lactamase, Carbapenemase, and Plasmid Quinolone Determinants in *Klebsiella pneumoniae* Isolates Carrying Distinct Types of 16S rRNA Methylase Genes, and Their Association with Mobile Genetic Elements. **Microbial Drug Resistance**, v. 21, n. 2, p. 186–193, 2015.

WHO. Global Priority List Of Antibiotic-Resistant Bacteria To Guide Research, Discovery And Development Of New AntibioticsWorld Health Organization (WHO). [s.l: s.n.].

WHO. Defeating meningitis by 2030 First meeting of the Technical Taskforce, Geneva, 18 and 19 July 2018. n. July, p. 1–26, 2018.

WILLMANN, M. et al. Analysis of a long-term outbreak of XDR *Pseudomonas aeruginosa*: A molecular epidemiological study. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 5, p. 1322–1330, 2014.

- WOERTHER, P. L. et al. Trends in human fecal carriage of extended-spectrum betalactamases in the community: Toward the globalization of CTX-M. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 4, p. 744–758, 2013.
- WOODFORD, N. et al. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 27, p. 351–353, 2006.
- WOODFORD, N.; FAGAN, E. J.; ELLINGTON, M. J. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum beta-lactamases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 154–155, 2006.
- WOODFORD, N.; TURTON, J. F.; LIVERMORE, D. M. Multiresistant Gram-negative bacteria: The role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 35, n. 5, p. 736–755, 2011.
- WRIGHT, L. L. et al. Dominance of international "high-risk clones" among metallo-β-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the UK. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 1, p. 103–110, 2015.
- XIA, R. et al. qnrVC -Like Gene Located in a Novel Complex Class 1 Integron Harboring the IS*CR1* Element in an *Aeromonas punctata* Strain from an Aquatic Environment in Shandong Province, China, **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 8, p. 3471–3474, 2010.
- XIANG, Y. et al. The Draft Genome Sequence of *Pseudomonas putida* Strain TGRB4, an Aerobic Bacterium Capable of Producing Methylmercury, **Current Microbiology**, 2019.
- XIONG, J. et al. Complete Sequence of pOZ176, a 500-Kilobase IncP-2 Plasmid Encoding IMP-9-Mediated Carbapenem Resistance, from Outbreak Isolate *Pseudomonas aeruginosa* 96, **Antimicrobial Agents and Chemotherapy,** v. 57, n. 8, p. 3775–3782, 2013.
- YAYAN, J.; GHEBREMEDHIN, B.; RASCHE, K. Antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* in pneumonia at a single university hospital center in Germany over a 10-Year Period. **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, p. 1–20, 2015.
- YE, M. et al. Clinical and Genomic Analysis of Liver Abscess-Causing *Klebsiella* pneumoniae Identifies New Liver Abscess-Associated Virulence Genes. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 6, n. November, p. 1–12, 2016.
- YIGIT, H. et al. Novel Carbapenem-Hydrolyzing Beta -Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*, **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 4, p. 1151–1161, 2001.
- YOKOYAMA, K. et al. Mechanisms of disease Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. p. 1888–1893, 2003.
- YOON, E. J. et al. Contribution of resistance-nodulation-cell division efflux systems to

antibiotic resistance and biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. **mBio**, v. 6, n. 2, p. 1–13, 2015.

YU, V. L. et al. Virulence characteristics of *Klebsiella* and clinical manifestations of *K. pneumoniae* bloodstream infections. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 7, p. 986–993, 2007.

YUAN, M. et al. pSY153-MDR, a p12969-DIM-related mega plasmid carrying bla_{IMP-45} and armA, from clinical *Pseudomonas putida*. **Oncotarget**, 2017.

ZAPOR, M. J. et al. In vitro activity of the aminoglycoside antibiotic arbekacin against *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* isolated from war-wounded patients at Walter Reed Army Medical Center. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 7, p. 3015–3017, 2010.