



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

Caracterização genética de isolados clínicos de *Enterobacter aerogenes* e *Enterobacter cloacae*: determinantes de resistência e virulência

Doutoranda: Adriane Borges Cabral

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Catarina de Souza Lopes

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Recife

2016

Adriane Borges Cabral

Caracterização genética de isolados clínicos de *Enterobacter aerogenes* e *Enterobacter cloacae*: determinantes de resistência e virulência

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de doutor em Medicina Tropical.

Orientadores:

Prof^a. Dr^a. Ana Catarina de Souza Lopes

Prof^a. Dr^a. Célia Maria M. B. de Castro

Recife

2016

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

C117c Cabral, Adriane Borges.
Caracterização genética de isolados clínicos de *Enterobacter aerogenes* e *Enterobacter cloacae*: determinantes de resistência e virulência / Adriane Borges Cabral. – 2016.
168 f.: il. tab.; 30 cm.

Orientadora: Ana Catarina de Souza Lopes.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical. Recife, 2016.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. *Enterobacter aerogenes*. 2. *Enterobacter cloacae*. 3. Resistência. 4. Virulência. 5. Beta-lactamases. I. Lopes, Ana Catarina de Souza (Orientadora). II. Título.

618.9883

CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2016-077)

Ata da Defesa de Tese de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, no dia 26 de fevereiro de 2016.

Aos 26 (vinte e seis) dias do mês de fevereiro de dois mil e dezesseis, às 9 horas, na Sala Prof. Murillo La Greca – 3º. and. do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CCS/UFPE), em sessão pública, teve início a defesa da Tese intitulada “CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *Enterobacter Aerogenes* E *Enterobacter Cloacae*: DETERMINANTES DE RESISTÊNCIA E VIRULÊNCIA” da aluna Adriane Borges Cabral, na área de concentração Medicina Tropical, sob a orientação do Profa. Dra. Ana Catarina de Souza Lopes e coorientação da Profa. Dra. Célia Maria Machado Barbosa de Castro. A doutoranda cumpriu todos os demais requisitos regimentais para a obtenção do grau de DOUTORA em Medicina Tropical. A Banca Examinadora foi indicada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical, na sua Reunião ordinária e homologada pela Diretoria de Pós-Graduação, através do Processo Nº 23076.003893/2016-32 em 29/01/2016, composta pelos Professores: Ana Catarina de Souza Lopes (Presidente da Banca), do Departamento de Medicina Tropical da UFPE; Antônio Mauro Rezende, do Departamento de Saúde Coletiva do CPqAM/FIOCRUZ; Maria Betânia Melo de Oliveira, do Departamento de Bioquímica da UFPE, Dyana Leal Veras, do Departamento de Parasitologia do CPqAM/FIOCRUZ; Nilma Cintra Leal, do Departameto de Microbiologia do CPqAM/FIOCRUZ. Após cumpridas as formalidades, a candidata foi convidada a discorrer sobre o conteúdo da Tese. Concluída a explanação, a candidata foi arguida pela Banca Examinadora que, em seguida, reuniu-se para deliberar e conceder à mesma a menção (Aprovada/Reprovada/Em exigência) Aprovada da referida Tese. E, para constar, lavrei a presente Ata que vai por mim assinada, Secretário de Pós-Graduação, e pelos membros da Banca Examinadora.

Recife, 26/02/2016.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ana Catarina de Souza Lopes	_____
Prof. Dr. Antonio Mauro Rezende	_____
Profa. Dra. Maria Betânia Melo Oliveira	_____
Profa. Dra. Dyana Leal Veras	_____
Profa. Dra. Nilma Cintra Leal	_____

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL**

REITOR

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Nicodemos Teles de Pontes Filho

**COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
TROPICAL**

Prof^a. Valdênia Maria Oliveira de Souza

**VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
MEDICINA TROPICAL**

Prof^a. Vera Magalhães da Silveira

CORPO DOCENTE

Prof^a. Ana Catarina de Souza Lopes
Prof^a. Ana Lúcia Coutinho Domingues
Prof^a. Célia Maria Machado Barbosa de Castro
Prof. Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto
Prof. Fábio André Brayner dos Santos
Prof^a. Heloísa Ramos Lacerda de Melo
Prof^a. Maria Amélia Vieira Maciel
Prof^a. Maria de Fátima Pessoa Militão de Albuquerque
Prof^a. Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho
Prof^a. Marli Tenório Cordeiro
Prof^a. Rejane Pereira Neves
Prof. Ricardo Arraes de Alencar Ximenes
Prof^a. Valdênia Maria Oliveira de Souza
Prof^a. Vera Magalhães da Silveira
Prof^a. Vlândia Maria Assis Costa

DEDICO,

*Aos meus pais Luís Borges (em
memória) e Heloísa Borges por todo
o amor, educação e incentivo,
alicerces da minha formação.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela luz e proteção infinita em tudo que faço na minha vida;

A minha mãe, pelo amor, incentivo e educação; aos meus irmãos, por todo o apoio e incentivo; aos meus sobrinhos, por todo o amor e alegria e a toda a minha família;

À Prof^a. Dr^a. Ana Catarina Lopes, por mais quatro anos de convivência, nos quais pude contar com ensinamentos, orientação e incentivo a minha carreira na pesquisa e docência. Colaboração e amizade que torço para que permaneçam por toda a minha trajetória;

À Prof^a. Dr^a. Célia de Castro, pela disponibilidade de parceria na Imunologia, que infelizmente não se concretizou por escassos recursos financeiros;

Ao Prof. Dr. Antônio Rezende, por todo suporte, disponibilidade e ensinamentos em sequenciamento genômico, sem o qual não seria possível a realização desse trabalho;

À Dr^a. Nilma Leal e ao Prof. Dr. Rodrigo Galhardo por tornarem possível a execução do sequenciamento genômico no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães e Universidade de São Paulo, respectivamente;

À equipe de microbiologia do Hospital Agamenon Magalhães, em especial a Dra. Josi Barros e ao Dr. Marcelo Antunes, pela disponibilização dos isolados utilizados;

Às amigas, em especial a Cecília Fernandes, Renata Suélen e Gabriela Tenório, a quem devo os momentos de descontração em meio a tantas correrias;

Aos amigos de laboratório da Microbiologia, em especial Alexandra Mariá e Elza Firmo, pela amizade, compartilhamento de conhecimentos e por toda a ajuda prestada;

Às LACENianas, em especial a Vanessa Karina, pela amizade e por toda ajuda recebida;

Aos amigos do LMSPO, em especial a minha ex-equipe de TB, que fizeram parte do início desta trajetória;

Aos professores e a todos que fazem a Disciplina de Microbiologia, pelos ensinamentos e amizade ao longo de todos esses anos que faço parte da Disciplina, em especial a Prof^a. Dr^a. Maria Amélia Maciel, por toda colaboração e a Prof^a. Ivanize Acca, por todo o incentivo;

Aos professores e a todos que fazem o Departamento de Medicina Tropical, pelos ensinamentos e pela contribuição na minha formação, em especial a Walter Leite, por toda a prestatividade;

À FACEPE, pelo suporte financeiro e a todos que direta ou indiretamente me ajudaram a realizar este trabalho.

***“Suba o primeiro degrau com fé.
Não é necessário que você veja toda
a escada. Apenas dê o primeiro
passo.”***

Martin Luther King

RESUMO

Enterobacter aerogenes e *Enterobacter cloacae* são importantes patógenos causadores de Infecções relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS), podendo apresentar diferentes genes de virulência e de resistência a antimicrobianos. O objetivo desse estudo foi caracterizar e comparar genomicamente isolados de *E. aerogenes* e *E. cloacae* multidrogas resistentes (MDR), provenientes de um Hospital público de Recife-PE entre 2011 e 2013, através da investigação de genes relacionados à resistência a antimicrobianos e à virulência, como também analisar o perfil plasmidial e relação clonal dos isolados. Portanto, este estudo foi dividido em três etapas: (1) caracterizar fenotipicamente e genotipicamente 51 isolados de *E. aerogenes* e *E. cloacae* provenientes de infecção ou colonização em pacientes de um hospital público de Recife-PE, Brasil, através de perfil de susceptibilidade a antimicrobianos, análises de genes de β -lactamase por PCR e sequenciamento de DNA, perfil plasmidial e ERIC-PCR; (2) realizar o primeiro sequenciamento genômico de 2 isolados de *E. aerogenes*, *bla*_{KPC-2} positivos, provenientes de colonização (Ea5A) e de infecção (Ea7A) em pacientes internados na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) de um mesmo hospital, além de análise comparativa com 2 cepas de *E. aerogenes* sequenciadas anteriormente e (3) realizar sequenciamento genômico de 2 isolados de *E. cloacae*, *bla*_{CTX-M-15} positivos, provenientes de infecções: Ec2A (secreção ocular) e Ec7A (hemocultura) em pacientes internados na Unidade de Terapia Intensiva neonatal (UTI neo) de um mesmo hospital, além de análise comparativa com cepas de *E. cloacae* sequenciadas anteriormente. Em ambas as espécies houve detecção de altas taxas para ESBL (41%) e carbapenemases (18% para *E. cloacae* e 88% para *E. aerogenes*), com identificação das variantes: *bla*_{TEM-1}, *bla*_{CTX-M-15} e *bla*_{KPC-2}. Os isolados apresentaram disseminação clonal, com *E. cloacae* *bla*_{CTX-M} positivo disseminado na UTI neonatal e *E. aerogenes* *bla*_{KPC} positivo na UTI e em outros setores do hospital. Foi visto que apesar dos isolados apresentarem relação clonal pela ERIC-PCR apresentaram diferentes perfis plasmidiais e de resistências, além de, diferentes genes de resistência. O sequenciamento genômico permitiu a detecção de: (1) vasto arsenal de genes de resistência a beta-lactâmicos, assim como, genes de resistência a outras classes de antimicrobianos, (2) diversos genes de virulência relacionados a adesinas fimbriais, sideróforos, cápsula e biofilme e (3) cinco tipos de sistemas de efluxo e quatro tipos de sistemas de secreção, relacionados principalmente à resistência e virulência, respectivamente. Em relação à análise comparativa

dos genomas, foi visto que apesar de serem clones pela ERIC-PCR e provenientes do mesmo setor hospitalar, ambas as espécies apresentaram diferenças sutis no quantitativo de genes totais, genes de resistência, genes de virulência, sistemas de efluxo e secreção, além de características exclusivas de cada isolado. Também foi possível detectar que dentre os isolados de *E. aerogenes*, foi visto que o isolado proveniente de colonização (Ea5A), apresentou genes de virulência potenciais para estabelecer a infecção, além de elementos genéticos móveis capazes de transmitir diversos genes para outras bactérias presentes na microbiota entérica do paciente, o que reforça a importância da colonização no contexto de IRAS. Considerando os isolados de *E. cloacae* sequenciados genomicamente, o isolado proveniente de hemocultura (Ec7A) mostrou maior número de determinantes de resistência (beta-lactamases e sistemas de efluxo) que o isolado proveniente de secreção ocular, o que pode dificultar o tratamento e consequentemente favorecer a evolução para estágios mais severos como sepse e choque séptico. Os resultados aqui apresentados evidenciam o vasto arsenal de genes de resistência e virulência albergados pelos isolados de *E. aerogenes* e *E. cloacae* o que pode facilitar o estabelecimento da infecção e dificultar o tratamento.

Palavras-chave: *Enterobacter aerogenes*. *Enterobacter cloacae*. Resistência. Virulência. Beta-lactamases.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Eletroforese em gel de agarose à 1,5% do produto da ERIC-PCR de isolados representativos de <i>E. aerogenes</i>	51
Figura 2. Eletroforese em gel de agarose à 1,5% do produto da ERIC-PCR de isolados representativos de <i>E. cloacae</i>	51
Figura 3. Eletroforese em gel de agarose à 0,7% do produto da extração de plasmídeos de isolados representativos de <i>E. aerogenes</i> (a) e <i>E. cloacae</i> (c).....	52
Figura 1. Ambiente genético de <i>bla</i> _{TEM-1} nos isolados de <i>E. aerogenes</i> Ea5A e Ea7A.	73
Figura 2. Ambiente genético do gene <i>bla</i> _{KPC-2} no isolado de <i>E. aerogenes</i> Ea5A.	74
Figura 3. Ambiente genético do gene <i>bla</i> _{KPC-2} no isolado de <i>E. aerogenes</i> Ea7A.	74
Figura 4. Alinhamento genômico dos isolados de <i>E. aerogenes</i> Ea5A e Ea7A.	75
Figura 5. Alinhamento da sequência <i>bla</i> _{KPC-2} de Ea5A (Query) com a sequência de referência para <i>bla</i> _{KPC-2}	75
Figura 6. Comparação do DNA cromossômico das 4 cepas de <i>E. aerogenes</i> através do diagrama de Venn.	76
Figura 1. Comparação do DNA cromossômico de Ec7A, Ec2A e ATCC 13047 (EcREF) através do diagrama de Venn.....	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Primers utilizados na PCR e sequenciamento de DNA para detecção dos genes de β -lactamases.....	58
Tabela 2. Caracterização das amostras de <i>Enterobacter aerogenes</i> quanto ao perfil de resistência a antimicrobianos, perfil plasmidial e perfil de ERIC-PCR.	59
Tabela 3. Caracterização das amostras de <i>Enterobacter cloacae</i> quanto ao perfil de resistência a antimicrobianos, perfil plasmidial e perfil de ERIC-PCR.	60
Tabela 4. Caracterização das amostras de <i>Enterobacter aerogenes</i> quanto à fonte de isolamento primário (colonização ou infecção) e genes de beta-lactamases.....	61
Tabela 5. Caracterização das amostras de <i>Enterobacter cloacae</i> quanto à fonte de isolamento primário (colonização ou infecção) e genes de beta-lactamases.....	62
Tabela 1. Características genômicas dos isolados de <i>Enterobacter aerogenes</i> Ea5A e Ea7A analisados nesse estudo e das cepas KCTC 2190 e EA1509E, utilizadas para as análises comparativas.	81
Tabela 2. Caracterização quantitativa e qualitativa dos isolados de <i>Enterobacter aerogenes</i> Ea5A e Ea7A quanto aos genes de resistência a antimicrobianos, genes de virulência, sistemas de efluxo e sistemas de secreção identificados através do Rast ou Resfinder (beta-lactamases)	82
Tabela 3. Proteínas exclusivas relacionadas à resistência, virulência, sistemas de efluxo, e sistemas de secreção dos isolados de <i>Enterobacter aerogenes</i> Ea5A (colonização) e Ea7A (infecção) identificadas através do Rast.	83
Tabela 4. Beta-lactamases e grupos de ortólogos/parálogos (correspondentes a beta-lactamases) exclusivos ou compartilhados pelos isolados de <i>Enterobacter aerogenes</i> Ea5A (colonização) e Ea7A (infecção) comparados.....	84
Tabela 1. Características genômicas dos isolados de <i>Enterobacter cloacae</i> Ec7A e Ec2A e das cepas de referência utilizadas para as análises comparativas.....	99
Tabela 2. Caracterização quantitativa e qualitativa dos isolados de <i>Enterobacter cloacae</i> Ec7A e Ec2A quanto aos genes de resistência a antimicrobianos, genes de virulência, sistemas de efluxo e sistemas de secreção identificados através do Rast ou Resfinder (beta-lactamases)	100

Tabela 3. Grupos de ortólogos e parálogos que correspondem a genes de beta-lactamases exclusivos dos isolados de <i>Enterobacter cloacae</i> Ec7A e Ec2A e compartilhados com as cepas de referência	101
--	-----

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC	Adenosine triphosphate-binding cassette superfamily
AFLP	Polimorfismo de Fragmento Amplificado
AIM	Australian imipemenase
AMC	Amoxicilina/Ácido Clavulânico
AMI	Amicacina
AMO	Amoxicilina
AMP	Ampicilina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APS	Ampicilina/Sulbactam
ATM	Aztreonam
CAZ	Ceftazidima
CDC	Centers for Disease Control
CDS	Sequências codificantes
CFL	Cefalotina
CFO	Cefoxitina
CIP	Ciprofloxacina
CLO	Clofanfenicol
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CPM	Cefepime
CTX	Cefotaxima
CTX-M	Cefotaximase
CCS	Centro de Ciências da Saúde
DMT	Drug/metabolite transporter superfamily
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
ESBL	Extended-Spectrum β -lactamase
ERIC-PCR	PCR de seqüências consenso intergênicas repetitivas de Enterobactérias
EST	Estreptomicina
genes <i>bla</i>	Genes de β -lactamases
GIM	German Imipenemase
GEN	Gentamicina

GES	Guiana Extended Spectrum
h	Horas
IMP	Impipenemase
IMP	Imipenem
inc	Grupo de incompatibiliadade plasmidial
int	Intermediário
IRAS	Infecções relacionadas à Assistência à Saúde
Kb	Quilo-base
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
LB	Luria-Bertani
log	Logarítimo
mA	Miliampere
MATE	Multidrug and toxic compound extrusion family
MBL	metalo- β -lactamase
MDR	Multidroga resistente
MFS	Major Facilitador superfamily
mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MIC	Concentração Mínima Inibitória
mpb	Mega pares de bases
ml	mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
M	Molar
MPM	Meropenem
N	Normal
NAL	Ácido Nalidíxico
NDM	Nova-Delhi Metallo- β -lactamase
ng	Nanograma
pb	Pares de bases
PBPs	Proteínas de ligação à Penicilina
PBRT	Tipagem de replicon baseada em PCR
PCR	Reação em cadeia da polimerase

PFGE	Pulsed-Field Gel Electrophoresis
pH	Potencial de Hidrogênio
pI	Ponto Isoelétrico
PIT	Piperacilina/Tazobactam
q.s.p	Quantidade suficiente para
RAPD	Random-Amplified Polymorphic DNA
REP	Repetitive Element-Based PCR
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNAr	RNA Ribossomal
RNA _t	RNA transportador
RNase	Ribonuclease
RND	Resistance Nodulation-cell division
rpm	Rotações por minuto
SHV	<u>S</u> ulph <u>h</u> ydryl <u>v</u> ariable
SIM	Seul imipemenase
sp.	espécie
spp.	espécies
SPM	São Paulo metalo- β -lactamase
SST	Sistema de secreção tipo
ST	Sequence Tiping
TBE	Tris-borato, ácido bórico, EDTA
TE	Tampão Tris-EDTA
TEM	Referência à Temoniera
TET	Tetraciclina
Tn	Transposon
TSU	Trimetoprim/Sulfa
U	Unidade
UTI	Unidades de terapia intensiva
UTI neo	Unidades de terapia intensiva neonatal
UV	Ultravioleta
v	Volts
VIM	Verona integron-encoded metalo- β -lactamase
Zn	Zinco

°C	Grau Celsius
µg	Micrograma
µl	Microlitro
µM	Micromolar
µmol	Micromol

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1 <i>Enterobacter</i> spp.....	21
2.2. Plasmídeos.....	24
2.3. Antimicrobianos β -lactâmicos	26
2.4. Beta-lactamases	27
2.5. ESBLs	27
2.6. Carbapenemase	30
2.6.1. Serina-carbapenemases: KPC e GES.....	30
2.6.2. Metallo-carbapenemases: VIM, IMP, SPM	32
2.7. Fatores de virulência: adesinas fimbriais.....	33
2.8. Fatores de virulência: sideróforos.....	34
2.9. Sistemas de efluxo e sistemas de secreção	35
2.10. Tipagem molecular de bactérias	36
2.11. Sequenciamento genômico	38
3. OBJETIVOS	40
3.1. Geral.....	40
3.2. Específicos	40
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
4.1. Isolados bacterianos	41
4.2. Extração de DNA total.....	41
4.3. Condições da PCR para identificação dos genes <i>bla</i> _{SHV} e <i>bla</i> _{TEM}	41
4.4. Condições da PCR para identificação dos genes <i>bla</i> _{CTX-M}	42
4.5. Condições da PCR para identificação dos genes <i>bla</i> _{KPC} e <i>bla</i> _{GES}	42
4.6. Condições da PCR para identificação dos genes <i>bla</i> _{VIM} , <i>bla</i> _{IMP} e <i>bla</i> _{SPM}	43
4.7. Eletroforese em gel de agarose	43
4.8. Sequenciamento dos genes de resistência.....	43
4.9. Extração de DNA plasmidial	44
4.10. ERIC-PCR	44
4.11. Sequenciamento genômico	45

4.11.1. Pesquisa de determinantes de resistência e virulência e determinação dos grupos de incompatibilidade plasmidial (inc)	46
5. RESULTADOS	47
5.1. Determinantes genéticos de resistência a beta-lactâmicos e caracterização de isolados de <i>Enterobacter aerogenes</i> e <i>Enterobacter cloacae</i> provenientes de infecção e colonização em pacientes de um hospital público de Recife-PE, Brasil (Artigo 1)	47
5.2. Análise genômica de isolados de <i>Enterobacter aerogenes</i> <i>bla</i> _{KPC-2} positivos provenientes de colonização e infecção em pacientes de UTI: diversidade de genes de resistência e de virulência (Artigo 2)	68
5.3. Análise genômica de isolados de <i>Enterobacter cloacae</i> portadores de <i>bla</i> _{CTX-M-15} provenientes de infecções de pacientes de UTI neonatal: diversidade de genes de resistência e de virulência (Artigo 3)	89
6. CONCLUSÕES	106
REFERÊNCIAS	109
APÊNDICE A (Artigo submetido à Revista: Journal of Hospital Infection).....	124
APÊNDICE B (Artigo submetido à Revista: International Journal of Medical Microbiology).....	146

1. INTRODUÇÃO

Enterobacter aerogenes e *Enterobacter cloacae* são bacilos gram-negativos da família Enterobacteriaceae que destacam-se clinicamente como bactérias oportunistas e têm emergido como patógenos causadores de Infecções relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) principalmente, infecções envolvendo o trato urinário, trato respiratório baixo, pele e tecidos moles, feridas e sistema nervoso central (LEE *et al.*, 2010; DAVIN-REGLI; PAGES, 2015). Estas espécies estão associadas com resistência às cefalosporinas de 3ª e 4ª gerações sugerindo o aumento das cepas produtoras de beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) (TUON *et al.*, 2015). *Enterobacter* produtores de ESBLs são usualmente susceptíveis apenas aos carbapenêmicos, tratamento de escolha para diversas infecções. Entretanto, a emergência de Enterobacteriaceae produzindo carbapenemases tem severamente desafiado a terapia antimicrobiana, uma vez que conferem alto nível de resistência a todos os beta-lactâmicos e níveis distintos de resistência aos carbapenêmicos (TUON *et al.*, 2015).

Carbapenemase do tipo *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) tem sido o principal determinante de resistência aos carbapenêmicos em Enterobacteriaceae (TAVARES *et al.*, 2015). Estas enzimas tornaram-se endêmicas em todo o mundo, inclusive no Brasil, sendo frequentemente detectada em isolados de *Klebsiella pneumoniae* provenientes de Recife-PE (CABRAL *et al.*, 2012; DE CÁSSIA ANDRADE MELO *et al.*, 2014; TUON *et al.*, 2015). A resistência aos carbapenêmicos em enterobactérias é um grave problema de saúde pública de âmbito mundial, particularmente pela elevada mortalidade e pelo reduzido número de opções terapêuticas (ANVISA, 2013). Algumas publicações evidenciam taxas de mortalidade de 40% a 50% em 30 dias (TUMBARELLO *et al.*, 2012; NAVARRO *et al.*, 2013).

Além da indiscutível importância da resistência bacteriana no contexto de infecções, as bactérias envolvidas em infecções extra-intestinais possuem propriedades associadas com a virulência. A capacidade das bactérias em aderirem às superfícies de tecido no hospedeiro é um passo importante no desenvolvimento da infecção. Essa adesão ocorre principalmente através de dois tipos de adesinas fimbriais, tipo 1 e tipo 3 (STRUVE *et al.*, 2009). Adicionalmente, mecanismos de absorção de ferro são necessários para as bactérias proliferarem com sucesso no organismo hospedeiro, por isso as bactérias desenvolveram várias estratégias para sequestrar ferro de tecidos infectados, como por exemplo, a produção de sideróforos dos tipos aerobactina, enterobactina e yersiniabactina (MOKRACKA *et al.*,

2004).

Geralmente isolados de *Enterobacter* envolvidos em infecções apresentam relação clonal. A disseminação de clones bacterianos é preocupante, mas pode ser evitada ao reforçar medidas de vigilância (MARCHAIM *et al.*, 2008). Dentre as várias técnicas de tipagem bacteriana, perfil plasmidial e ERIC-PCR (PCR das sequências consenso-intergênicas repetitivas de Enterobactérias) têm sido utilizadas com sucesso para caracterizar a relação clonal entre isolados de *Enterobacter* (QUILES *et al.*, 2015; STUMPF *et al.*, 2005).

O sequenciamento genômico esta sendo cada vez mais utilizado, substituindo sequenciamento de amplicons de PCR ou métodos de tipagem. Dentre as suas aplicabilidades, destacam-se: análise filogenética, tipagem, identificação de genes de resistência e virulência, Sequence Typing (ST), fagos, plasmídeos e outras sequências específicas, além de permitir o mapeamento do ambiente circundante aos genes e análises comparativas entre os dados de domínio público (EDWARDS; HOLT, 2013). Alguns autores têm sequenciado genomicamente amostras de *E. aerogenes* e *E. cloacae* (DIENE *et al.*, 2012; SHIN *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2013; WILSON *et al.*, 2014), esses resultados contribuem para um maior conhecimento desses patógenos.

Diante da emergência de isolados de *Enterobacter* spp. multidroga resistentes (MDR) envolvidos em IRAS no Brasil, inclusive em Recife-PE, e considerando que são raros os estudos que determinam ESBLs e carbapenemases nesse gênero bacteriano no Brasil, torna-se importante a caracterização genética de isolados clínicos de *Enterobacter* spp. provenientes de um hospital público de Recife-PE, através da pesquisa dos genes de resistência *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{KPC}, *bla*_{GES}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} e *bla*_{SPM}, dos genes de virulência relacionados a adesinas fimbriais, sideróforos, cápsula e biofilmes, de sistemas de efluxo e secreção e das técnicas de tipagem: perfil plasmidial e ERIC-PCR. Adicionalmente, o sequenciamento genômico irá permitir um maior conhecimento sobre o patógeno acerca da resistência e virulência, além de permitir a identificação de genes exclusivos e compartilhados entre as amostras analisadas nesse estudo e entre genomas publicados em outros estudos. O conhecimento do conteúdo genético de *Enterobacter* spp. permitirá um melhor entendimento dos mecanismos de resistência e virulência nesse gênero bacteriano, sendo importante para orientar medidas profiláticas e terapêuticas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Enterobacter* spp.

Enterobacter spp. são bacilos gram-negativos pertencentes à família Enterobacteriaceae, podem ser encontrados no solo, na água e em vegetais e são constituintes da microbiota intestinal da maioria dos animais, incluindo o homem. Algumas espécies desse gênero estão emergindo como importantes patógenos causadores de IRAS, principalmente infecções envolvendo o trato urinário, trato respiratório baixo, pele e tecidos moles, feridas e sistema nervoso central (LEE *et al.*, 2010). Bactérias entéricas são oportunistas e causam infecções em hospedeiros com defesas imunitárias suprimidas. Crianças, idosos e pacientes com doenças de base ou imunossupressão estão sujeitos a tais infecções (JANDA; ABBOTT, 2006).

Entre as 13 espécies reconhecidas como membros do gênero *Enterobacter*, *E. aerogenes* e *E. cloacae* são as espécies mais frequentemente associadas a doenças humana (GONÇALVES *et al.*, 2000). Estudos brasileiros com *Enterobacter*, quando realizados a nível de espécie detectam principalmente *E. aerogenes* e *E. cloacae* (BONNET *et al.*, 2001; DROPA *et al.*, 2009; ZAVASCKI *et al.*, 2009; CHAGAS *et al.*, 2011; ANDRADE *et al.*, 2011).

Enterobacter aerogenes tem se destacado como um importante patógeno hospitalar. A prevalência desta espécie bacteriana aumentou consideravelmente desde a introdução das cefalosporinas de espectro estendido na prática clínica (BIENDO *et al.*, 2008). Foi originalmente chamado *Aerobacter aerogenes*, e posteriormente foi incluído no gênero *Enterobacter* em 1960. Em 1971, foi proposto que esta espécie fosse renomeada *Klebsiella mobilis* devido à mobilidade conferida por flagelos peritríquios e seu parentesco genético com o gênero *Klebsiella*. É interessante notar que as diferenças fenotípicas entre *E. aerogenes* e o gênero *Klebsiella* incluem não somente a motilidade, mas também a presença de ornitina descarboxilase (ODC) e a falta de atividade de urease em *E. aerogenes* (DIENE *et al.*, 2012). No entanto, o sequenciamento genômico de um isolado clínico MDR (resistentes a um ou mais antimicrobiano de três ou mais categorias testadas) sugeriu uma possível reclassificação das espécies no gênero *Klebsiella*, sob o nome de *K. aeromobilis* (DIENE *et al.*, 2012; DAVIN-REGLI; PAGES, 2015).

Espécies do complexo *E. cloacae* são amplamente encontrados na natureza, mas

também são agentes patogênicos, *E. cloacae* e *E. hormaechei* são mais frequentemente isolados de espécimes clínicos humanos (DAVIN-REGLI; PAGES, 2015). O complexo *E. cloacae* foi identificado a partir de 1970 como patógenos nosocomiais (PAAUW *et al.*, 2009) e foi mostrado ser evolutivamente dividido em duas classes geneticamente distintas. Baseado na diversidade genética, a primeira foi subdividida em dois grupos e a segunda em cinco (PAAUW *et al.*, 2008). Apesar da relevância do *E. cloacae* como patógeno nosocomial, os mecanismos patogênicos e fatores que contribuem na doença associada com o complexo *E. cloacae* ainda não são entendidos; isto pode ser devido à escassez e a dispersão de informações disponíveis. Capacidade de formar biofilmes e secretar várias citotoxinas são importantes para sua patogenicidade (DAVIN-REGLI; PAGES, 2015).

A origem da infecção com *Enterobacter* está relacionada à translocação bacteriana do trato intestinal, o habitat deste patógeno (TUON *et al.*, 2010) e nos últimos anos, são uma causa crescente de infecções adquiridas na comunidade (MARCHAIM *et al.*, 2008).

De acordo com o boletim informativo da ANVISA Ano IV, nº 07, Março de 2014, *Enterobacter* spp. ocupou a 9ª posição em micro-organismos notificados como agentes etiológicos de infecção primária de corrente sanguínea confirmada laboratorialmente (IPCSL) em pacientes adultos hospitalizados em UTIs, 7ª posição em UTI pediátrica e 5ª posição em UTI neonatal (Brasil, 2012). De acordo com a região geográfica, a frequência de *Enterobacter* spp. variou de 4,1% no Nordeste a 6,9% no Norte dentre os principais micro-organismos notificados como agentes etiológicos de IPCSL em pacientes adultos hospitalizados em UTIs, de 2,9% no Sul a 6,6% no Centro-oeste em UTI pediátrica e de 5,5% no Centro-Oeste a 12,8% no Norte em UTI neonatal (Brasil, 2012) (ANVISA, 2014).

Ribeiro *et al.* (2013), analisando Enterobactérias de um serviço de vigilância regional do Sudeste, identificaram *Enterobacter* spp. como o micro-organismo mais frequente, representando 64,9% (224/345) da amostra. Dentre os *Enterobacter* spp. 75% foram *E. cloacae*, 2,7% *E. aerogenes* and 22,3% foram identificados apenas a nível de gênero. Gonçalves *et al.* (2000), relataram um surto de bacteremia associado à terapia intravenosa na cidade de Campinas, São Paulo. As espécies *E. cloacae* e *E. agglomerans* foram identificadas como agentes etiológicos do surto, que acometeu 49 pacientes com 12 mortes. Para Rocha *et al.* (2008), *Enterobacter*, dentre outras Enterobacteriaceae resistentes a cefalosporinas de 3ª e 4ª geração, foram responsáveis por 43,7% dos casos de pneumonia associada a ventilação mecânica na cidade de Uberlândia, Minas Gerais. Pneumonia adquirida no hospital é a principal causa de mortalidade atribuída a IRAS, além de aumentar a permanência e custos

hospitalares (KOLLEF, 2004). Tuon *et al.* (2010), realizaram um estudo de coorte retrospectiva em um Hospital universitário de Curitiba. Cinquenta e oito pacientes com bacteremia devido a *Enterobacter* spp. foram selecionados (sendo 28 casos, *Enterobacter* positivos para ESBLs e 30 controles, *Enterobacter* negativos para ESBLs), a espécie mais comum foi *E. aerogenes* (71%), seguida de *E. gergoviae* (17%) e *E. cloacae* (12%).

De acordo com Tuon *et al.* (2010), *Enterobacter* é um micro-organismo associado com resistência a cefalosporinas de 3ª geração devido ao gene cromossômico Amp-C. No entanto, tem-se observado uma diminuição progressiva da susceptibilidade a cefalosporinas de 4ª geração, sugerindo o aumento de isolados produtores de ESBL além da eminente resistência aos carbapenêmicos, devido a carbapenemases. Entretanto a literatura médica prioriza outras bactérias produtoras de ESBL (*Escherichia coli* e *K. pneumoniae*), havendo poucos relatos desse mecanismo de resistência em espécies de *Enterobacter*. Da mesma maneira, a resistência aos carbapenêmicos entre espécies de *Klebsiella* tem sido bem estudada, enquanto há raros estudos clínico ou epidemiológico focando a resistência aos carbapenêmicos em *Enterobacter* spp. (MARCHAIM *et al.*, 2008).

De acordo com o boletim informativo da ANVISA Ano IV, nº 07, Março de 2014, dentre as porcentagens de resistência e sensibilidade entre os micro-organismos mais frequentemente notificados como agentes etiológicos de IPCSL em pacientes adultos hospitalizados em UTIs (Brasil, 2012), 55,7% dos isolados de *Enterobacter* spp. foram sensíveis às cefalosporinas de 4ª geração e carbapenêmicos, 32,9% foram resistentes às cefalosporinas de 4ª geração, mas sensíveis a carbapenêmicos e 11,4% foram resistentes às cefalosporinas de 4ª geração e carbapenêmicos. Assim como a frequência dos patógenos variou entre as distintas regiões geográficas, os fenótipos de resistência também variaram. A frequência de *Enterobacter* spp. resistentes às cefalosporinas de amplo espectro e carbapenêmicos variou de 3% no Sul a 26,2% no Nordeste.

Em relação às UTIS pediátricas os percentuais obtidos para *Enterobacter* spp. foram: 68,1% de sensíveis às cefalosporinas de 4ª geração e carbapenêmicos, 23,9% de resistentes às cefalosporinas de 4ª geração, mas sensíveis a carbapenêmicos e 8,0% de resistentes às cefalosporinas de 4ª geração e carbapenêmicos. *Enterobacter* spp. resistentes às cefalosporinas de amplo espectro e carbapenêmicos não foram detectados no Norte e Sul, e detectados nos percentuais de 6,6% no Sudeste, 13,3% no Nordeste e 23,1% no Centro-Oeste do país (ANVISA, 2014).

Em relação às UTIS neonatais os percentuais obtidos para *Enterobacter* spp. foram:

62,8% de sensíveis às cefalosporinas de 4ª geração e carbapenêmicos, 33,6% de resistentes às cefalosporinas de 4ª geração, mas sensíveis a carbapenêmicos e 3,6% de resistentes às cefalosporinas de 4ª geração e carbapenêmicos. *Enterobacter spp.* resistentes às cefalosporinas de amplo espectro e carbapenêmicos não foram detectados no Nordeste e Sul, e detectados nos percentuais de 0,9% no Norte, 5,1% no Sudeste e 16,7% no Centro-Oeste do país (ANVISA, 2014).

Através de estudos microbiológicos e genéticos é possível entender como essas bactérias resistentes estão surgindo e determinar o seu modo de disseminação, com isso, prever o comportamento epidemiológico destes patógenos, fornecendo dados necessários para implementar medidas de controle mais adequadas. Estudos adicionais de métodos moleculares são necessários para facilitar a detecção mais acurada e rápida de bactérias gram-negativas resistentes, para melhor definir os mecanismos de resistência e virulência e para desenvolver novas drogas antimicrobianas (JASKULSKI *et al.*, 2013).

2.2. Plasmídeos

Além do cromossomo bacteriano, as bactérias podem conter pequenas moléculas circulares de DNA de dupla fita, denominadas plasmídeos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005). Esses elementos genéticos autoduplicam-se de forma independente da replicação cromossômica, podendo existir em número variável dentro da célula bacteriana e tendo funções diversas e seletivas. Portanto, podem ser classificados como plasmídeos de resistência (Plasmídeos R), de virulência, metabólicos e conjugativos (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Diferentes plasmídeos R quando presentes na mesma célula podem se recombinar. Transposons e integrons estão frequentemente associados aos plasmídeos de resistência das enterobactérias. Os plasmídeos podem ser transferidos de uma bactéria para outra principalmente por conjugação e transformação. A transferência destes plasmídeos de resistência pode ocorrer intra e inter-espécie, facilitando a disseminação da resistência (OZGUMUS *et al.*, 2008). Verma *et al.* (2001), sugerem que a persistência de estirpes MDR no trato digestivo e urinário provavelmente facilita a conjugação de plasmídeos de cepas multirresistentes a outras enterobactérias. A transferência de genes de resistência entre as bactérias potencialmente patogênicas no trato gastrointestinal resulta em bactérias MDR que podem causar infecções e se espalhar para organismos diferentes levando à falha de

tratamento. Portanto, a microbiota pode atuar como um reservatório de transferência de genes de resistência a bactérias patogênicas, que podem levar a infecções com possibilidades limitadas de tratamento (SCHJORRING; STRUVE; KROGFELT, 2008). Cepas resistentes de diferentes gêneros de *Enterobacteriaceae* e que contêm plasmídeos R podem estar presentes no trato gastrointestinal em um nível baixo e depois do tratamento antimicrobiano, podem ser selecionadas e colonizar o intestino (OZGUMUS *et al.*, 2008).

Os plasmídeos são distinguidos uns dos outros pela diferença de peso molecular, expresso em quilo base (Kb) e medido pela diferença de migração eletroforética em gel de agarose (DOMENICO *et al.*, 1992). O tamanho e o número de plasmídeos determinam distintos perfis plasmidiais (FEIZABADI *et al.*, 2008). Perfil plasmidial tem sido utilizado em paralelo com outras técnicas de tipagem para estudar a epidemiologia das infecções por enterobactérias (CANTÓN *et al.*, 2002; HOSSAIN *et al.*, 2004; CHMELNITSKY *et al.*, 2008; MARCHAIM *et al.*, 2008; PETRELLA *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2009). Chmelnitsky *et al.* (2008), encontraram concordância entre o PFGE e perfil plasmidial analisando isolados de *E. cloacae*, visto que, os isolados dos clones genéticos A e B pelo PFGE apresentaram padrões de plasmídeos semelhantes.

Outra forma de analisar os plasmídeos albergados por um isolado é através da Tipagem de replicon baseada em PCR (PBRT) que detecta replicons dos principais grupos de incompatibilidade (inc/rep) dos plasmídeos (CARATTOLI *et al.*, 2005). A importância epidemiológica do rastreamento dos plasmídeos que conferem resistência às drogas levou Carattoli *et al.* (2005), a desenvolver um método de PCR baseado em replicons (inc/rep PCR) dos principais grupos de incompatibilidade de plasmídeo entre *Enterobacteriaceae*. Dezoito pares de iniciadores foram desenhados para reconhecer os inc FIA, FIB, FIC, HI1, HI2, I1-I γ , L/M, N, P, W, T, A/C, K, B/O, X, Y, F, e FIIA. A especificidade do método foi testada e os resultados indicaram que PBRT demonstra alta especificidade e sensibilidade na detecção de replicons em plasmídeos de referência. Estes resultados sugerem que o método é potencialmente aplicável a um grande número de estirpes para rastrear a difusão de plasmídeos de resistência a múltiplas drogas em ambientes diferentes. Esta técnica tem sido utilizada por diversos autores para identificar os grupos de inc dos plasmídeos de *Enterobacter* spp. Em *E. cloacae*, Ribeiro *et al.* (2013), detectaram os grupos incN, incA/C e incF no sudeste e Quiles *et al.* (2015), detectaram os grupos incHI2, incW, incP e incN no Rio de Janeiro. Em *E. aerogenes* os tipos incA/C e incL/M já foram relatados no Brasil (BOGAERTS *et al.*, 2007; MACHADO *et al.*, 2007; DIENE *et al.*, 2012; MARKOVSKA *et*

al., 2014).

A resistência a vários antimicrobianos é bem correlacionada com a presença ou ausência de plasmídeos. Sharma; Ray e Sharma (2010), descrevem uma tendência no aumento de resistência com o aumento do número de plasmídeos. Cepas abrigando múltiplos plasmídeos simultaneamente exibem co-resistência a diferentes classes de antibióticos. SHAHID *et al.* (2008), compararam a perda da resistência a antibióticos à perda de conteúdo do plasmídeo, notando que todos os isolados de que perderam plasmídeos tornaram-se susceptíveis a determinados antibióticos.

2.3. Antimicrobianos β -lactâmicos

Antimicrobianos são fármacos que têm ação sobre micro-organismos e que podem ter origem natural ou semi-sintética, produzidos totalmente ou parcialmente por micro-organismos, como também podem ser totalmente sintetizados em laboratório, neste caso são chamados quimioterápicos (RANG *et al.*, 2006). Geralmente estas drogas apresentam um largo espectro de ação, ou seja, elas atuam sobre vários tipos de micro-organismos. As diferentes classes de antibióticos apresentam diferentes mecanismos de ação, atuando principalmente na parede celular ou ribossomos, mas também podem atuar na membrana citoplasmática, ácidos nucleicos e no metabolismo bacteriano. De acordo com o mecanismo de ação, algumas destas drogas não são seletivas e também atuam sobre as células humanas, causando efeitos adversos. Os principais grupos de antibióticos utilizados para enterobactérias são: β -lactâmicos, aminoglicosídeos, tetraciclinas, cloranfenicol e quinolônicos (CLSI, 2015).

Os β -lactâmicos são os antibióticos mais prescritos mundialmente devido à boa atividade, baixa toxicidade e grande variedade dos compostos disponíveis (THERRIEN; LEVESQUE, 2000). Este grupo inclui: penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos (PFEIFER; CULLIK; WITTE, 2010). Todos os antibióticos β -lactâmicos interferem na síntese do peptidoglicano da parede celular bacteriana, ao interagir com as proteínas de ligação à penicilina (PBPs), localizada na membrana celular (ZEBA, 2005), inibem a enzima de transpeptidação que forma ligações cruzadas das cadeias peptídicas do peptidoglicano. Este processo de inativação interrompe a constituição fisiológica normal do peptidoglicano da parede celular e induz a lise e morte da célula bacteriana. O evento bactericida final consiste na inativação de um inibidor das enzimas autolíticas (autolisinas) na parede celular levando a lise da bactéria (RANG *et al.*, 2006).

A hidrólise de antibióticos β -lactâmicos por β -lactamases é o mecanismo mais comum de resistência a esta classe de agentes antimicrobianos em bactérias gram-negativas clinicamente importantes (BUSH; JACOBY, 2010). Os carbapenêmicos e os monobactâmicos foram desenvolvidos para tratamento das infecções por micro-organismos gram-negativos produtores de β -lactamases resistentes às penicilinas e cefalosporinas (LIVERMORE *et al.*, 2001). A maior utilização destas drogas no ambiente hospitalar resulta em uma maior pressão seletiva sobre a microbiota, o que favorece a seleção de sub-populações de micro-organismos com sensibilidade diminuída ou resistentes a esses antimicrobianos (MENDES *et al.*, 2004a). A resistência às cefalosporinas de 3^a e 4^a geração ocorre principalmente devido a ESBL e aos carbapenêmicos, principalmente pela produção de carbapenemases.

2.4. Beta-lactamases

β -lactamases são enzimas capazes de degradar o anel β -lactâmico dos antibióticos transformando-os em produtos inativos (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). São enzimas codificadas principalmente por genes plasmidiais que são encontrados com frequência entre as enterobactérias, representando uma séria ameaça a atual terapia por antibióticos β -lactâmicos (JEONG *et al.*, 2004; WOODFORD *et al.*, 2005).

As β -lactamases são bastante diversificadas podendo ser agrupadas em 4 classes moleculares (A, B, C e D) de acordo com as características estruturais (classificação de Ambler) ou em 3 principais grupos de acordo com características funcionais e moleculares (esquema de Bush-Jacob-Medeiros de 1995) (ROBIN *et al.*, 2005; BUSH; JACOBY, 2010). As classes A, C e D incluem as serina- β -lactamases, enquanto que a classe B são metaloenzimas que utilizam pelo menos um sítio ativo de íons zinco a fim de facilitar a hidrólise de β -lactâmicos (BUSH; JACOBY, 2010).

Mais de 50 anos de uso inadequado ou abusivo de β -lactâmicos para tratamento de IRAS e infecções comunitárias criou uma enorme pressão seletiva sobre o ecossistema bacteriano, levando à seleção de isolados resistentes produtores de novas β -lactamases (ex. carbapenemases) ou variantes das β -lactamases clássicas (ESBLs), resultando no aumento da morbidade, mortalidade e custos nos cuidados de saúde.

2.5. ESBLs

ESBLs são beta-lactamases capazes de hidrolizar oximino-cefalosporinas e monobactâmicos, mas não carbapenêmicos, e são inibidas pelo ácido clavulânico (BUSH; JACOBY, 2010). A maioria das ESBLs é oriunda das β -lactamases clássicas tipo TEM-1, TEM-2, e SHV-1, as quais diferem dos seus progenitores por poucos aminoácidos (LAGO *et al.*, 2010). O nome TEM é uma referência a Temoniera, paciente grego do qual a bactéria foi isolada. Em contraste, SHV, é a contração de *Sulphydryl variable*, descrição de propriedades bioquímicas desta β -lactamase (HERITAGE *et al.*, 1999).

Através de mutações pontuais, ocorre substituição de um ou mais aminoácidos na cadeia original aumentando o espectro hidrolítico da enzima consequentemente permitindo a inativação de β -lactâmicos mais recentes como as cefalosporinas de 3^a (Ceftazidima, Cefotaxima, Cefoxitina) e 4^a geração (Cefepime) e monobactâmicos (Aztreonam) (MANZUR *et al.*, 2007; LAGO *et al.*, 2010). Mais recentemente, uma série de enzimas ESBL que não estão relacionadas com as enzimas TEM e SHV foram descritas: CTX-M, OXA, VEB e AmpC (BUSH; JACOBY, 2010).

Até o momento mais de 300 ESBLs foram descritas (<http://www.lahey.org/Studies>). Nos últimos anos, mais de 60 diferentes tipos de ESBLs CTX-M estão emergindo na família Enterobacteriaceae e substituindo TEM e SHV em muitos países (JONES *et al.*, 2009). De acordo com a homologia na sequência de DNA a família CTX-M de ESBLs é atualmente classificada em cinco principais grupos: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 e CTX-M-25 (GOYAL *et al.*, 2009; PFEIFER; CULLIK; WITTE, 2010).

O surgimento e a rápida disseminação de isolados produtores de ESBL é responsável por surtos de infecção em todo o mundo. Unidades de terapia intensiva são particularmente sensíveis em termos de desfechos clínicos e esses organismos têm sido implicados no aumento da morbidade e mortalidade (PATERSON; BONOMO, 2005). Em geral, a difusão de genes de resistência a antibióticos é facilitada por três estratégias principais: (1) disseminação clonal da bactéria que adquiriu genes de resistência, (2) propagação de um plasmídeo particular e/ou transposon entre uma variedade de diferentes isolados, e (3) translocação de genes de resistência entre os diferentes elementos genéticos móveis (PFEIFER; CULLIK; WITTE, 2010). A localização desses genes em elementos móveis pode aumentar a dispersão das ESBLs entre diferentes gêneros de enterobactérias (PITOUT *et al.*, 2005).

Isolados de *Enterobacter* produtores de ESBLs do tipo SHV, TEM e CTX-M já foram relatados em diversas partes do mundo: Grécia (TZELEPI *et al.*, 2000), Espanha (CANTÓN

et al., 2002; MANZUR *et al.*, 2007), Colômbia (GONZALEZ-MEJIA *et al.*, 2006), China (LIU *et al.*, 2007; 2008), Argélia (IABADENE *et al.*, 2008), França (BIENDO *et al.*, 2008), Taiwan (LEE *et al.*, 2010), Índia (MANOHARAN *et al.*, 2011).

A frequência e os tipos predominantes de ESBLs variam de região para região e até mesmo entre instituições de uma mesma região (NOGUEIRA *et al.*, 2015). De acordo com o SMART (Study for monitoring antimicrobial resistance trends), cepas produtoras de ESBLs estão distribuídas no mundo e o tipo predominante é CTX-M-15 (SEKI *et al.*, 2013; NOGUEIRA *et al.*, 2015). De acordo com um estudo realizado nos Estados Unidos analisando dados de 2009 a 2011, a América do Norte teve as menores taxas de produtores de ESBLs, com predomínio do tipo SHV, porém CTX-M-14 e CTX-M-15 estão aumentando e se tornarão os tipos predominantes (SADER *et al.*, 2014). A prevalência dos vários tipos de ESBL na Europa varia de país a país, porém CTX-M é o tipo predominante (JONES *et al.*, 2014). De acordo com o SENTRY (The Antimicrobial Surveillance Program), conduzido de 1998 a 2002, a frequência de ESBL também varia nos países asiáticos, SHV e CTX-M são os tipos mais frequentes (HIRAKATA *et al.*, 2005). Dados epidemiológicos sobre ESBL na África e Austrália são raros. A mais alta prevalência de cepas produtoras de ESBLs foi detectada na América do Sul e CTX-M foi o tipo mais comum. Na América do Sul, incluindo o Brasil, isolados carregando CTX-M-2 tem sido o tipo de CTX-M mais frequente, inclusive em Recife-PE (LOPES *et al.*, 2010; SEKI *et al.*, 2013).

Vários estudos brasileiros reportaram que a frequência de amostras produtoras de ESBL varia entre as diversas instituições, mas no geral é elevada (ANVISA, 2014; NOGUEIRA *et al.*, 2014). No Brasil, ESBLs em *Enterobacter* spp. têm sido relatadas por Bastos *et al.* (2015), na região sudeste por Nogueira *et al.* (2015), além de relatos no Rio de Janeiro (BONNET *et al.*, 2001; CHAGAS *et al.*, 2011; SEKI *et al.*, 2013), em São Paulo (DROPA *et al.*, 2009), no Rio Grande do Sul (LAGO *et al.*, 2010) e no Paraná (TUON *et al.*, 2010; NOGUEIRA *et al.*, 2015).

Com a disseminação de isolados produtores de ESBL em hospitais ao redor do mundo, é necessário conhecer a prevalência de produção de ESBL em uma área geográfica, esse conhecimento guiará o uso correto e perspicaz de antimicrobianos. Há a possibilidade de que o uso restrito de um antimicrobiano leve a um retrocesso da pressão seletiva onde bactérias resistentes não mais terão vantagem adaptativa nesses ambientes (LAGO *et al.*, 2010).

Amostras de *Enterobacter* spp. resistentes à cefalosporinas de quarta-geração, mas sensíveis aos carbapenêmicos, podem corresponder tanto a amostras produtoras de ESBL,

quanto àquelas hiperprodutoras da betalactamase cromossomal AmpC. Independentemente do mecanismo de resistência, a presença deste fenótipo geralmente indica que os carbapenêmicos constituem a opção terapêutica de escolha para o tratamento de infecções graves (ANVISA, 2014).

2.6. Carbapenemase

A resistência a carbapenêmicos em enterobactérias é um grave problema de saúde pública em âmbito mundial, particularmente pela elevada mortalidade e pelo reduzido número de opções terapêuticas (PETRELLA *et al.*, 2008; BENNETT *et al.*, 2009).

As carbapenemases são classificadas em: metalo-beta-lactamases, pertencentes ao grupo 3 ou classe B (IMP, VIM, SPM, GIM, NDM); serina-carbapenemases do grupo 2d ou classe D (OXA-23, OXA-48) e serina-carbapenemases do grupo 2f ou classe A (KPC, GES, SME, NMC-A, IMI) (BUSH, JACOBY; 2010). Indiscutivelmente, do ponto de vista epidemiológico são de extrema relevância as carbapenemases do tipo KPC e as do tipo NDM, pois ambas apresentaram rápida e ampla disseminação mundial após suas descrições iniciais (ANVISA, 2013).

2.6.1. Serina-carbapenemases: KPC e GES

As serina-carbapenemases KPC e GES pertencem a classe molecular A e ao grupo 2, subgrupo 2f, tendo os carbapenêmicos como substrato. Estas enzimas são melhor inibidas pelo tazobactam do que pelo ácido clavulânico. SME, IMI-1 e CNM-1 são os representantes cromossômicos das enzimas do subgrupo 2f (QUEENAN; BUSH, 2007). Mais preocupante, no entanto, é o subgrupo 2f mediado por plasmídeo, incluindo enzimas KPC e algumas GES (antigas IBC).

A família GES (Guiana Extended Spectrum) foi descrita pela primeira vez na França em 1998 em uma amostra de *K. pneumoniae* proveniente de swab retal de uma paciente previamente internada na Guiana Francesa, daí a origem do nome GES (POIREL *et al.*, 2000). Os genes que codificam GES são frequentemente encontrados em integrons e plasmídeos. Uma vez que estas enzimas possuem um espectro de atividade que inclui penicilinas e cefalosporinas de terceira geração foram inicialmente classificadas como ESBL. Contudo foi verificado que GES-2, que possuía a substituição de um aspartato por uma

glicina na posição 170, hidrolisava o imipenem, com isso a família foi reclassificada (POIREL *et al.*, 2001; BUSH; JACOBY, 2010). De acordo com Lee e Jeong (2005), outras variantes como GES-3 e GES-4 também são capazes de hidrolizar o imipenem. GES-1, ao contrário dos outros membros da família GES, tem pouca interação com o imipenem (BUSH; JACOB, 2010). A origem desses genes permanece desconhecida (POIREL; NORDMAN, 2005).

De acordo com Bush e Jacob (2010), há descrição de variantes GES-1 a GES-15. De acordo com Poirel e Nordman (2005), IBC-1 e IBC-2 são análogos mutantes pontuais das enzimas GES e deveriam ser renomeados como GES-7 e GES-8, respectivamente. IBC-1 (Integron-borne β -lactamase) foi detectado em isolado de *E. cloacae* na Grécia por Giakkoup *et al.* (2000). Embora raro, as enzimas GES têm sido identificadas mundialmente com relatos na Grécia, França, Portugal, África do Sul, Guiana Francesa, Brasil, Argentina, Coreia e Japão (QUEENAN; BUSH, 2007). No Brasil, variantes das ESBL do tipo GES são relatadas, principalmente, em isolados de *P. aeruginosa* recuperados de pacientes internados em hospitais (CASTANHEIRA *et al.*, 2004b; PELLEGRINO *et al.*, 2006). Entretanto, as variantes GES-5 e GES-7 já foram identificadas em enterobactérias (cepas de *K. pneumoniae*) no estado de São Paulo (DROPA *et al.*, 2010; PICÃO *et al.*, 2010).

KPC foi inicialmente relatada em isolados de *K. pneumoniae* na cidade de Nova York (YIGIT *et al.*, 2001). Depois expandiu-se ao longo da costa leste dos Estados Unidos e a partir de 2005, a detecção de KPC foi relatada em outros países (NASS *et al.*, 2005). Até o momento há descrição de 16 variantes na base de dados do GenBank-NCBI. Os genes codificando KPC-1 e KPC-2 são idênticos (YIGIT *et al.*, 2001; PATEL; RASHEED; KITCHEL, 2009). As carbapenemases do tipo KPC degradam todos os antibióticos β -lactâmicos inclusive, o grupo carbapenêmico (imipenem, meropenem, ertapenem e doripenem) (PATEL; RASHEED; KITCHEL, 2009) e são inibidas pelo ácido borônico (TSAKRIS *et al.*, 2009).

Os genes *bla*_{KPC} estão localizados no novo transposon tn4401 (NAAS *et al.*, 2008). Este transposon foi identificado em plasmídeos de diferentes tamanhos, sugerindo que o gene também pode se mover pela inserção do transposon em plasmídeos diferentes (PATEL; RASHEED; KITCHEL, 2009). Tn4401 foi proposto estar na origem da mobilização de KPC. Este perfil de disseminação tem limitado as chances de sucesso terapêutico contra estes micro-organismos pan-resistentes (PDR) (resistentes a todos os antimicrobianos testados de acordo com as recomendações do CLSI) (LEAVITT *et al.*, 2007).

Embora a β -lactamase KPC seja predominantemente encontrada em isolados de *K. pneumoniae*, que é o patógeno mais comum carreando os genes *bla*_{KPC} (MONTEIRO *et al.*, 2009; ANDERSON *et al.*, 2007; WOODFORD *et al.*, 2008; CABRAL *et al.*, 2012), alguns trabalhos têm descrito esta enzima em outros membros de enterobactérias (*Enterobacter* spp., *Salmonella* spp., *K. oxytoca*, *E. coli*, *E. cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Serratia* spp. e *Proteus mirabilis*) (MIRIAGOU *et al.*, 2003; YIGIT *et al.*, 2003; ANDERSON *et al.*, 2007; QUEENAN; BUSH, 2007; ZHANG *et al.*, 2007, PETRELLA *et al.*, 2008; CABRAL *et al.*, 2015) e também em não fermentadores como *P. aeruginosa* (VILLEGAS *et al.*, 2007; JÁCOME *et al.*, 2012).

Isolados de *Enterobacter* produtores de KPC foram relatados inicialmente em Boston (HOSSAIN *et al.*, 2004). Em seguida foram detectados em Nova York (BRATU *et al.*, 2005), Reino Unido (BENNETT *et al.*, 2009), França (PETRELLA *et al.*, 2008) e em Israel (MARCHAIM *et al.*, 2008; CHMELNITSKY *et al.*, 2008).

No Brasil, enzimas KPC em isolados de *E. cloacae* já foram detectadas nas regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste (ZAVASCKI *et al.*, 2009; ANDRADE *et al.*, 2011; JASKULSKI *et al.*, 2013; RIBEIRO *et al.*, 2013; TAVARES *et al.*, 2015). Em isolados de *E. aerogenes*, *bla*_{KPC-2} foi detectado nas regiões Sul, Centro-Oeste e Nordeste (JASKULSKI *et al.*, 2013; TUON *et al.*, 2015; TAVARES *et al.*, 2015).

A prevalência de *Enterobacter* resistentes aos carbapenêmicos está aumentando, com graves consequências em termos de desfecho e de cuidados gerais, esses patógenos resistentes representam um grande desafio terapêutico e estão associados a falhas no tratamento, que levam a um aumento da morbidade, mortalidade e custos. Assim, os relatos sobre a resistência aos carbapenêmicos entre isolados de *Enterobacter* são de grande preocupação. É necessário reforço das medidas para controlar a disseminação desses isolados no ambiente hospitalar.

2.6.2. Metallo-carbapenemases: VIM, IMP, SPM

As carbapenemases do tipo metalo β -lactamases hidrolizam penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos e não são inibidas pelo ácido clavulânico. Elas diferem estruturalmente das outras β -lactamases por sua exigência de um íon zinco no sítio ativo, consequentemente são inibidas por metais quelantes de íons tais como ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA), ácido dipicolínico, 1,10-o-fenantrolina e ácido 2-mercaptopropiônico (2-MPA) (MARCHIARO *et al.*, 2008).

Sete subclasses de MBL são conhecidas até o presente momento: IMP, VIM, SPM, GIM, SIM, AIM e NDM identificadas inicialmente no Japão (1991), Itália (1997), Brasil (2001), Alemanha (2004), Coreia (2003/2004), Austrália (2007) e Índia (2008), respectivamente (WATANABE *et al.* 1991; LAURETTI *et al.* 1999; TOLEMAN *et al.* 2002; CASTANHEIRA *et al.* 2004; LEE *et al.* 2005; GUPTA, 2008; YONG *et al.*, 2009). Os tipos IMP, VIM e NDM são os mais frequentemente detectados em enterobactérias.

A primeira descrição de IMP-1 em isolados de *E. aerogenes* e *E. cloacae* ocorreu no Japão por Arakawa *et al.* (2000). O primeiro relato de MBL do tipo VIM (VIM-2) em isolados de *E. Cloacae* foi realizado por Jeong *et al.* (2003), na Coreia. Em seguida enzimas IMP e VIM foram relatadas em espécies de *Enterobacter* na Itália (LUZZARO *et al.*, 2004; CASTANHEIRA *et al.*, 2007), Austrália (PELEG *et al.*, 2005), França (BIENDO *et al.*, 2008), China (CHEN *et al.*, 2009), Espanha (MIRÓ *et al.*, 2010) e na Grécia (PANOPOULOU *et al.*, 2010). O gene que codifica SPM-1 parece estar especificamente relacionado à espécie *P. aeruginosa*, uma vez que, até então, não foi detectado em demais micro-organismos nosocomiais (MENDES *et al.*, 2006). Não foram encontrados relatos de *Enterobacter* spp. produtores destes tipos de MBLs no Brasil.

2.7. Fatores de virulência: adesinas fimbriais

A capacidade das bactérias em aderirem às superfícies de tecido no hospedeiro é um passo importante no desenvolvimento da infecção. Essa adesão ocorre principalmente através de dois tipos de adesinas fimbriais, tipo 1 e tipo 3 (STRUVE *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2013).

Adesinas fimbriais são estruturas protéicas, filamentosas, expressas na superfície celular bacteriana com capacidade de reconhecer receptores moleculares, facilitando a aderência do micro-organismo nas superfícies de tecidos específicos do hospedeiro (STRUVE *et al.*, 2008; STAHLHUT *et al.*, 2009). A maioria dos isolados clínicos são capazes de produzir dois tipos de organelas de adesão: (1) Adesinas fimbriais do tipo 1, hemaglutininas manose-sensível; e (2) Adesinas fimbriais do tipo 3, hemaglutininas manose-resistente (STRUVE *et al.*, 2008; STAHLHUT *et al.*, 2009; DE CÁSSIA ANDRADE MELO *et al.*, 2014).

Fímbrias tipo 1 são bem caracterizadas e encontradas na maioria das espécies de enterobactérias (MANGE *et al.*, 2006). Elas medeiam a adesão a estruturas contendo manose, presentes em células hospedeiras ou na matriz extracelular. Inúmeros estudos demonstraram

que estas fímbrias desempenham um papel significativo na capacidade de enterobactérias em infectar o trato urinário. De acordo com isso, tem sido recentemente estabelecido que as fímbrias tipo 1 são um importante fator de virulência de infecção do trato urinário (STRUVE *et al.*, 2008; 2009).

Stahlhut *et al.* (2009), relatam o papel significativo da adesina fimbrial tipo 1 na capacidade da *E. coli* em infectar o trato urinário, mais especificamente a subunidade fimH (tipo mais comum encontrado em Enterobacteriaceae). O operon *fim* de *K. pneumoniae*, contém um gene *fimK* terminal, não presente na *E. coli* uropatogênica, que suprime a expressão da adesina fimbrial tipo 1 (ROSEN *et al.*, 2008).

Liu *et al.* (2013), compararam fímbrias em diferentes cepas de *E. cloacae* e observaram significativa diversidade. De nove a treze loci codificantes de fímbrias foram identificados em cada amostra, mas somente quatro deles foram conservados nos quatro isolados. A presença de múltiplos genes fimbriais indica que *E. cloacae* é provavelmente capaz de colonizar uma ampla variedade de hospedeiros ou ambientes, o que contribui para a diversidade das espécies. Essa variedade de fímbrias também tem sido relatada em isolados de *E. cloacae* sequenciados genomicamente por outros autores (REN *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2014). Fímbrias do tipo 1 foram detectadas na cepa de *E. aerogenes* KCTC 2190, posterior ATCC 13048 (SHIN *et al.*, 2012; CP002824) sequenciada genomicamente.

As fímbrias são reconhecidas pelas células fagocíticas, portanto, pode ser que a expressão fimbrial seja uma desvantagem em sítios de infecção ricos em fagócitos, tais como os pulmões, enquanto que fatores que protegem a bactéria contra o sistema imunitário, tais como cápsulas e lipopolissacarídeo, têm-se mostrado fatores de virulência essenciais neste ambiente do hospedeiro (SHANKAR-SINHA *et al.*, 2004).

2.8. Fatores de virulência: sideróforos

As bactérias envolvidas em infecções extra-intestinais possuem propriedades associadas com a virulência. A capacidade de adquirir ferro no ambiente do hospedeiro é uma delas. O ferro é um elemento essencial, necessário a quase todas as bactérias. O hospedeiro humano representa um ambiente com disponibilidade extremamente baixa de ferro livre para desenvolvimento das bactérias, já que este elemento localiza-se intracelularmente ligado à proteínas como hemoglobina, ferritina, hemossiderina e mioglobina, e extracelularmente, em ligações de alta afinidade, à proteínas como lactoferrina e transferrina (PODSCHUN *et al.*,

2000).

As bactérias desenvolveram várias estratégias para sequestrar ferro de tecidos infectados. Uma dessas estratégias é a produção de sideróforos que extraem ferro das proteínas e portanto, podem estar relacionados com a virulência bacteriana. Mecanismos de absorção de ferro de alta afinidade são necessários para as bactérias proliferarem com sucesso no organismo hospedeiro (MOKRACKA *et al.*, 2004).

Os sideróforos são pertencentes a dois grupos químicos: Sideróforos Fenolato e Sideróforos Hidroxamato (PODSCHUN *et al.*, 1998; LAWLOR *et al.*, 2007). Entre as enterobactérias, três sistemas de sideróforos são mais prevalentes: enterobactina, aerobactina e yersiniabactina (LAWLOR *et al.*, 2007), sendo o mais comum o sideróforo do grupo químico fenolato, enterobactina (PODSCHUN *et al.*, 2000). Múltiplos sistemas de sideróforos podem ser benéficos para a bactéria, uma vez que podem funcionar em diferentes ambientes no hospedeiro ou em diferentes estágios na infecção (MOKRACKA *et al.*, 2004).

Isolados de *Enterobacter* spp. podem empregar sistemas de absorção de ferro mediados por enterobactina, aerobactina e, em menor extensão, yersiniabactina. Enterobactina e aerobactina são os tipos mais frequentemente detectados em enterobactérias, inclusive em espécies de *Enterobacter* (MOKRACKA *et al.*, 2003; 2004). Ren *et al.* (2010), Gupta *et al.* (2014) e Madhaiyan *et al.* (2015), dentre outros autores, têm relatado sideróforos em *E. cloacae*, por sua vez, enterobactina e aerobactina têm sido detectadas na cepa de *E. aerogenes* KCTC 2190 (SHIN *et al.*, 2012; CP002824).

Já foi demonstrado que a administração parenteral de ferro em um modelo em cobaias aumentou significativamente a susceptibilidade a infecções por uma enterobactéria, reforçando a importância do ferro para o sucesso da infecção (PODSCHUN *et al.*, 1998).

2.9. Sistemas de efluxo e sistemas de secreção

Enquanto a membrana externa proporciona uma barreira natural e atua em conjunto com bombas multidrogas para proteger a célula gram-negativa de agentes prejudiciais (detergentes, desinfetantes, corantes, antibióticos e toxinas), também representa um desafio no que diz respeito à absorção de nutrientes e a excreção de subprodutos. Para este efeito, a membrana externa foi equipada com diferentes vias para o transporte seletivo de moléculas para dentro e para fora da célula: sistemas de efluxo (relacionados à resistência) e sistemas de secreção (relacionados à virulência) (SANDKVIST, 2001).

Até o momento já foram descritas cinco famílias de sistema de efluxo: “Resistance Nodulation-cell division (RND)”, “Adenosine triphosphate-binding cassette superfamily (ABC)”, “Major Facilitator superfamily (MFS)”, “Multidrug and toxic compound extrusion family (MATE)” e “Drug/metabolite transporter superfamily (DMT)” (POOLE *et al.*, 2005). No entanto, as bombas de efluxo associadas à resistência aos antimicrobianos de importância clínica, geralmente pertencem às famílias RND e MFS (POOLE *et al.*, 2005).

A secreção extracelular de proteínas é considerada um dos principais mecanismos de virulência de uma infecção bacteriana. Várias vias altamente especializadas têm evoluído, até o momento foram identificadas seis sistemas de secreção (SST): SST1, SST3 e SST4 (secretam proteínas em uma única etapa), SST2 e SST5 (secretam proteínas em duas etapas) e SST6 (anteriormente relatado como SST4) (SANDKVIST, 2001; FILLOUX *et al.*, 2008; GILLESPIE *et al.*, 2016). Genes de virulência de bactérias patogênicas são frequentemente associados com ilhas de patogenicidade que codifica SST3 ou SST4 adquiridos por transferência horizontal de genes (DOBRINDT *et al.*, 2004; JUHAS *et al.*, 2009).

2.10. Tipagem molecular de bactérias

O processo de tipagem é importante epidemiologicamente no reconhecimento de surtos de infecções, infecções recorrentes, na detecção de transmissão cruzada de patógenos e na determinação da fonte de infecção (OLIVE; BEAN, 1999). Surtos de doenças infecciosas frequentemente são resultantes da exposição a um agente etiológico de origem comum, cujos descendentes são geneticamente idênticos ou estritamente relacionados. Em termos epidemiológicos, os organismos envolvidos em surtos são relacionados clonalmente, ou seja, diferem em no máximo seis bandas, mudanças consistentes com até dois eventos genéticos independentes, de acordo com Tenover *et al.* (1995). Estes organismos são membros de uma mesma espécie e possuem fatores de virulência e características bioquímicas e genéticas semelhantes. Alguns programas de vigilância têm incorporado técnicas de tipagem molecular como um meio de proporcionar informação adicional, para detectar e avaliar o modo de disseminação de patógenos MDR (PFALLEER *et al.*, 2001).

A tipagem de linhagens bacterianas tem sido realizada por diferentes métodos que podem ser classificados em métodos fenotípicos e métodos genotípicos (ARBEIT, 1999). Um dos métodos fenotípicos mais usados para tipar isolados MDR é o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos (SOUZA LOPES *et al.*, 2005). A identificação de genes de resistência a

antimicrobianos pode ser associada à utilização de métodos de genotipagem para identificação de semelhança genética entre as linhagens, permitindo assim o mapeamento da dinâmica de transmissão da infecção (YE *et al.*, 2010).

Também têm sido utilizados diversos métodos moleculares com o objetivo de caracterizar isolados de *Enterobacter* spp. envolvidos em surtos: análise plasmidial (CHEN *et al.*, 2009), Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) (CHMELNITSKY *et al.*, 2008), ribotipagem clássica (IVERSEN *et al.*, 2007), Random-Amplified Polymorphic DNA (RAPD) (YE *et al.*, 2010), polimorfismo de fragmento amplificado (AFLP) (IVERSEN *et al.*, 2007), ribotipagem por PCR e tDNA-PCR (LOPES *et al.*, 2007), PCR dos elementos repetitivos palindrômicos extragênicos (REP-PCR), ERIC-PCR (STUMPF *et al.*, 2005) e MLST (Multilocus Sequence Tipping) (IZDEBSKI *et al.*, 2015).

ERIC-PCR e REP-PCR são os principais grupos de elementos repetitivos que são utilizados com sucesso para a tipagem de enterobactérias. Regiões repetitivas são frequentemente indicativas da transferência horizontal de genes e são marcadores de sequências de inserção e outros elementos móveis (BRETTIN *et al.*, 2014). Estudos demonstraram que apresentam boa correlação com PFGE, considerado o método “padrão ouro” para a tipagem de micro-organismos (STUMPF *et al.*, 2005). Estas técnicas permitem a detecção de clones dentro de um grupo fenotipicamente idêntico que pode ter um impacto direto no método de intervenção terapêutica, por ser essencial para identificar cadeias de transmissão em surtos hospitalares (PFALLEER *et al.*, 2001). Tzelepi *et al.* (2000), Iabadene *et al.* (2008), Liu *et al.* (2008), Ye *et al.* (2008; 2010), dentre outros autores, têm utilizado a ERIC-PCR para tipar isolados de *Enterobacter* spp.

Infecções por micro-organismos podem ser monoclonal ou multiclonal. A relação clonal indica a transmissão de um isolado comum entre os pacientes e a infecção multiclonal indica uma seleção de isolados resistentes (SANTOS *et al.*, 2008). Quando isolados são geneticamente distintos, o grupo de micro-organismos resistentes pode ser originado devido à pressão seletiva excessiva de antimicrobianos, o que favorece os fenótipos de resistência dentro de um grupo independente de isolados (TOSIN; SILBERT; SADER, 2003). Vários padrões distintos sugerem transferência horizontal de genes de resistência, como forma de propagação.

Infecções por isolados de *E. cloacae* tem sido relatadas por diversos autores como policlonal, em contra-partida, infecções por isolados de *E. aerogenes* apresentam disseminação monoclonal (CANTÓN *et al.*, 2002; NOGUEIRA *et al.*, 2014; 2015; DAVIN-

REGLI; PAGES, 2015; TUON *et al.*, 2015).

Análises de similaridade genética de cepas produtoras de CTX-M realizada por Nogueira *et al.* (2015), revelou duas formas de disseminação: a disseminação de clones resistentes persistindo por diversos anos no hospital e a transmissão de plasmídeos de resistência. Essa hipótese é suportada pela observação de clones idênticos com diferentes tipos de CTX-M e cepas não relacionadas carregando genes de ESBL idênticos. Clones de ESBL não foram restritos a certas áreas do hospital, sendo encontrados na UTI e outras unidades hospitalares.

Em relação a KPC, RIBEIRO *et al.* (2013), mostram que não há nenhuma relação clara entre o ambiente genético e o perfil clonal dos isolados, uma vez que o mesmo ambiente genético foi encontrado na maior parte dos isolados de *E. cloacae*, independente do perfil clonal. Por outro lado, os isolados pertencentes ao mesmo grupo clonal apresentaram diferentes ambientes genéticos.

Cassetari *et al.* (2006), sugerem que o problema de disseminação de clones resistentes e de genes no ambiente hospitalar pode ocorrer devido ao contato com os profissionais de saúde e devido à transferência de pacientes entre unidades hospitalares, uma vez que isolados apresentando padrões moleculares idênticos foram observados em diferentes enfermarias e alguns isolados apresentaram padrões idênticos à cepa isolada das mãos de profissionais de saúde. A disseminação de clones bacterianos é preocupante, mas pode ser evitada ao reforçar medidas de vigilância (MARCHAIM *et al.*, 2008).

2.11. Sequenciamento genômico

O sequenciamento genômico tem sido realizado por diversos grupos interessados em tópicos relacionados à genética bacteriana e à evolução. A aplicabilidade do sequenciamento genômico inclui: estudo de isolados clínicos, cepas laboratoriais e estirpes mutantes; investigação de surtos, evolução e disseminação da resistência (EDWARDS; HOLT, 2013). Muitos dos dados gerados estão disponíveis no domínio público (GenBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Diante da procura emergente, Edwards e Holt (2013), elaboraram um guia para análise comparativa de genoma bacteriano usando dados de ‘next-generation sequence’ (NGS). A análise do sequenciamento genômico compreende cinco etapas lógicas: montagem, ordenação de contigs, anotação do genoma, comparação a outros genomas e tipagem. O material

introduz um conjunto de ferramentas simples e gratuitas que podem ser usadas para investigar uma variedade de questões comuns, incluindo (1) como comparar esse genoma a outro? (2) Esse genoma tem plasmídeos, fagos ou genes de resistência? (3) além de permitir análises filogenéticas e tipagem. O guia inclui orientações sobre onde encontrar informações técnicas mais detalhadas, pacotes de softwares alternativos e onde procurar abordagens mais sofisticadas.

Isolados de *E. cloacae* e *E. aerogenes* tem sido sequenciados genomicamente por alguns autores, da mesma forma, análises genômicas comparativas têm sido realizadas. Shin *et al.* (2012), foram os primeiros a realizar sequenciamento genômico de *E. aerogenes* (cepa KCTC 2190) produtor de 2-3-butanediol, Ren *et al.* (2010), foram os responsáveis pelo primeiro sequenciamento genômico de *E. cloacae* e Liu *et al.* (2013), realizaram a primeira análise comparativa do pan-genoma de *E. cloacae* endófito de plantas. Poucos são os estudos que sequenciaram genomicamente isolados de *E. cloacae* e *E. aerogenes* patógenos humanos (REN *et al.*, 2010; DIENE *et al.*, 2012).

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Caracterizar e comparar genomicamente isolados de *E. aerogenes* e *E. cloacae* MDR, provenientes de um Hospital público de Recife-PE entre 2011 e 2013, através da investigação de genes relacionados à resistência a antimicrobianos e à virulência, como também analisar o perfil plasmidial e relação clonal dos isolados.

3.2. Específicos

- Verificar a ocorrência de genes de resistência a beta-lactâmicos e a outras classes de antimicrobianos em isolados de *E. aerogenes* e *E. cloacae* de um Hospital público de Recife-PE entre 2011 a 2013.
- Verificar a ocorrência de genes para ESBLs *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *bla_{CTX-MA}*, *bla_{CTX-M1}* e *bla_{CTX-M2}* nos isolados de *Enterobacter* spp. estudados.
- Verificar a ocorrência de genes para carbapenemases *bla_{KPC}*, *bla_{GES}*, *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}* e *bla_{SPM}* nos isolados estudados.
- Identificar variantes dos genes de resistência nos isolados estudados.
- Verificar a ocorrência de genes de virulência relacionados a adesinas fimbriais, sideróforos, cápsula e biofilmes nos isolados estudados.
- Verificar a ocorrência de genes relacionados a sistemas de efluxo e sistemas de secreção nos isolados estudados.
- Determinar o perfil plasmidial dos isolados de *Enterobacter* spp.
- Determinar os grupos de incompatibilidade plasmidial (inc) nos isolados de *Enterobacter* spp.
- Determinar a relação clonal dos isolados de *Enterobacter* spp.
- Determinar genes exclusivos e compartilhados no genoma de dois isolados de *E. aerogenes* analisados nesse estudo, como também entre cepas de *E. aerogenes* depositadas no “GenBank”.
- Determinar genes exclusivos e compartilhados no genoma de dois isolados de *E. cloacae* analisados nesse estudo, como também entre cepas de *E. cloacae* depositadas no “GenBank”.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Isolados bacterianos

Os isolados de *Enterobacter* spp. foram fornecidos pelo laboratório de análises clínicas de um hospital público da cidade de Recife-PE, durante os anos de 2011 a 2013. A identificação bioquímica e o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos dos isolados foi realizada no Hospital através do sistema automatizado BD Phoenix. Ao chegar no Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular do Departamento de Medicina Tropical-UFPE, os isolados foram submetidos à confirmação da identificação bioquímica (utilizando testes convencionais), para confirmação da pureza da cultura bacteriana e confirmação do perfil de resistência a antimicrobianos [utilizando o teste de difusão de disco em Ágar Müller-Hinton proposta por Kirby e Bauer (CLSI, 2013)]. Os isolados foram mantidos em estoque congelado com glicerol 15% a -20°C. Para as análises foram cultivados em Caldo Brain Heart Infusion (BHI) ou Caldo Luria Bertani (LB) e plaqueados em Ágar nutriente (AN).

4.2. Extração de DNA total

O DNA genômico foi extraído diretamente de uma suspensão da colônia em 200 µL de água destilada estéril. A suspensão foi aquecida a 100°C por 10 minutos, centrifugada (5 min/15000 rpm) e 100 µL do sobrenadante foi recuperado e estocado à -20°C. O DNA foi quantificado através do equipamento Nano Drop para as análises.

4.3. Condições da PCR para identificação dos genes *bla_{SHV}* e *bla_{TEM}*

Os genes *bla_{SHV}* e *bla_{TEM}* foram investigados pela técnica de PCR utilizando os primers descritos na tabela 1. As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25 µl por tubo, compreendendo: 1 µl de DNA genômico a 5ng/µl, 2,0U da enzima *Taq* DNA polimerase (Promega), 200 µM do desoxirribonucleotídeo trifosfato (dNTP) (Ludwig Biotec), 1,5 mM de MgCl₂, 1 µmol dos primers para os genes *bla_{SHV}* e *bla_{TEM}*. Em cada partida de amplificação foi incluso um controle negativo, constituído de um tubo com todos os componentes da reação exceto DNA e um controle positivo, com o DNA da linhagem de *K. pneumoniae* K1P (CABRAL *et al.*, 2012). As amplificações foram realizadas em

termociclador (Bioclycer da Biosystems) programado para 5 minutos à 96°C para desnaturação inicial, seguido de 35 ciclos, consistindo cada ciclo de 1 minuto à 96°C para desnaturação, 1 minuto a uma temperatura de anelamento de 62° C para o gene *bla*_{SHV} e 57° C para o gene *bla*_{TEM} e 1 minuto à 72°C para extensão. Após os 35 ciclos, foi realizada uma etapa de alongamento final de 10 minutos à 72°C.

4.4. Condições da PCR para identificação dos genes *bla*_{CTX-M}

Os genes de resistência *bla*_{CTX-M} foram investigados pela técnica de PCR inicialmente com os iniciadores consensus CTX-MA que amplifica todos os genes *bla*_{CTX-M} (Tabela 1). As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25 µl por tubo, compreendendo: 1µl de DNA genômico a 5ng/µl, 2,0U da enzima *Taq* DNA polimerase (Promega), 200 µM de desoxirribonucleotídeo trifosfato (dNTP) (Ludwig Biotec), 1,5 mM de MgCl₂ e 1 µmol dos primers. Em cada partida de amplificação foi incluso um controle negativo e um controle positivo, com o DNA da linhagem de *K. pneumoniae* K1P (CABRAL *et al.*, 2012). As amplificações do gene *bla*_{CTX-M} foram realizadas com ciclos de desnaturação inicial à 95 °C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos, consistindo cada ciclo de 1 minuto à 95 °C para desnaturação, 1 minuto à 61°C para anelamento do primer e 1 minuto à 72°C para extensão. Após estes ciclos foi realizada uma etapa de alongamento final de 10 minutos à 72 °C. Os isolados positivos para o gene *bla*_{CTX-M} foram submetidos novamente a PCR com primers específicos para o grupo 1 (primers CTX-M13) que amplifica os genes *bla*_{CTX-M-1} e para o grupo 2 (primers CTX-M25) que amplifica os genes *bla*_{CTX-M-2}, nas mesmas condições de reação de PCR descritas acima, porém com temperatura de anelamento específica para cada primer.

4.5. Condições da PCR para identificação dos genes *bla*_{KPC} e *bla*_{GES}

Os genes de resistência *bla*_{KPC} e *bla*_{GES} foram investigados com os primers descritos na tabela 1. As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25 µl por tubo, compreendendo: 1µl de DNA genômico a 5ng/µl, 2,0U da enzima *Taq* DNA polimerase (Promega), 200 µM de dNTP (Ludwig Biotec), 1,5 mM de MgCl₂ e 1 µmol dos primers. Em cada partida de amplificação foi incluso um controle negativo e um controle positivo, para o gene *bla*_{KPC}: isolado de *K. pneumoniae* K1P (CABRAL *et al.*, 2011) e para o gene *bla*_{GES}: *P.*

aeruginosa P119HC (dados não publicados). As amplificações do gene *bla*_{KPC} foram realizadas com ciclos de desnaturação inicial à 95 °C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos, consistindo cada ciclo de 1 minuto à 95°C para desnaturação, 1 minuto à 63°C para anelamento do primer e 1 minuto à 72°C para extensão. Após estes ciclos foi realizada uma etapa de alongamento final de 10 minutos à 72 °C. A amplificação do gene *bla*_{GES} utilizou as seguintes condições: 3 min a 93°C para desnaturação inicial; seguido de 40 ciclos de 1 min à 93°C, 1 min à 55°C e 1 min à 72°C, e 7 min à 72°C para extensão final.

4.6. Condições da PCR para identificação dos genes *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} e *bla*_{SPM}

Os genes de resistência *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} e *bla*_{SPM} foram investigados pela técnica de PCR, com os primers descritos na tabela 1. As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25 µl por tubo, compreendendo: 1µl de DNA genômico a 20ng/µl, 1,0U da enzima *Taq* DNA polimerase (Promega), 100 µM de dNTP (Ludwig Biotec), 1,5 mM de MgCl₂ e 0,4 µmol dos primers. Em cada partida de amplificação foi incluso um controle negativo e um controle positivo, cepas de referência de *P. aeruginosa* (JÁCOME *et al.*, 2012). As amplificações dos genes de MBL foram realizadas com ciclos de desnaturação inicial à 95°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos, consistindo cada ciclo de 1 minuto à 95°C para desnaturação, para anelamento dos primers: 1 minuto à 60°C para *bla*_{IMP} e *bla*_{SPM} e 1 minuto à 62°C para *bla*_{VIM} e para extensão, 1 minuto à 68°C. Após estes ciclos foi realizada uma etapa de alongamento final de 5 minutos à 68°C.

4.7. Eletroforese em gel de agarose

Cinco microlitros dos produtos de amplificação da PCR acrescidos de 1 µl de Blue-green Loading Dye I (LGC biotecnologia) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,0% em tampão TBE (Tris-Borato 0,089M e EDTA 0,002M) e voltagem constante de 100 v. Foi utilizado um marcador de 100pb (Ludwig Biotec) como padrão de peso molecular. Os géis foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de fotodocumentação (Photocap, Vilber Lourmat).

4.8. Sequenciamento dos genes de resistência

Os produtos de PCR positivos para os genes de resistência foram purificados através de Kit comercializável (Promega) e sequenciados pelo método de terminação de cadeia de desoxirribonucleotídeo (Sanger *et al.*, 1977) utilizando-se os primers descritos na tabela 1. As sequências de nucleotídeos foram analisadas pelos programas BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e Clustal W do European Bioinformatics Institute (<http://www.cbi.ac.uk/>). A tradução dos nucleotídeos em proteínas foi realizada utilizando o programa expasy (<http://web.expasy.org/tools/translate>). As sequências foram depositadas no genbank sob números de acesso: KU680809, KU680810, KU680811, KU680812, KU680813 e KF561135.1.

4.9. Extração de DNA plasmidial

A extração de plasmídeos foi realizada através do sistema UltraClean Endotoxin-Free Mini Plasmid Prep Kit (Mo Bio Lab), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA plasmidial (10 µl) adicionado de 2 µl de Blue-green Loading Dye I (LGC biotecnologia) foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 0,7% em tampão TBE. A eletroforese foi realizada à temperatura ambiente por cerca de 2 horas a 70V e 30 mA. Após a migração em gel de agarose o DNA plasmidial foi visualizado e documentado como descrito anteriormente. Foi utilizada a linhagem de *K. pneumoniae* K16R (SOUZA LOPES *et al.*, 2005) com plasmídeos de tamanho conhecido como marcador de peso molecular. A análise do perfil plasmidial e a construção do dendrograma foram feitas utilizando o software DARwin 5.0.

4.10. ERIC-PCR

Para o método da ERIC-PCR foram utilizados os primers descritos na tabela 1. As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25 µl por tubo, compreendendo: 1µl de DNA genômico a 100ng/µl, 1,0U da enzima *Taq* DNA polimerase (Promega), 200 µM de dNTP (Ludwig Biotec), 1,52 mM de MgCl₂ e 0,4 µmol dos primers. Em cada partida de amplificação foi incluso um controle negativo. As amplificações foram realizadas com ciclos de desnaturação inicial à 95 °C por 3 minutos, seguido de 40 ciclos, consistindo cada ciclo de 1 minuto à 92 °C para desnaturação, 1 minuto à 36°C para anelamento do primer e 8 minutos à 72°C para extensão. Após estes ciclos também foi realizada uma etapa de alongamento final de 16 minutos à 72 °C (CABRAL *et al.*, 2012). Os

produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE e voltagem constante de 100v, como citado anteriormente. A análise dos fragmentos amplificados pela ERIC-PCR e a construção do dendrograma foram feitas utilizando o software DARwin 5.0.

4.11. Sequenciamento genômico

Foram selecionadas quatro amostras para realização do sequenciamento genômico: (1) dois isolados de *E. cloacae* positivos para *bla*_{CTX-M} sendo um recuperado de secreção ocular (Ec2A) e o outro de hemocultura (Ec7A), ambos provenientes de pacientes distintos internados em unidade de tratamento intensivo neonatal; e (2) dois isolados de *E. aerogenes* positivos para *bla*_{KPC} sendo um proveniente de colonização (Ea5A) e o outro de infecção (Ea7A), ambos provenientes de pacientes distintos internados em unidade de tratamento intensivo.

Com os DNAs das amostras extraídos, os mesmos foram quantificados novamente utilizando a plataforma fluorimétrica Qubit da ThermoFisher Scientific. Posteriormente à dosagem, os materiais biológicos foram utilizados para montagem das bibliotecas de DNA utilizando o kit Nextera XT da Illumina (Ec7A) e kit TruSeq DNA PCR Free Kit da Illumina (Ec2A, Ea5A e Ea7A). A quantificação das bibliotecas foi realizada pela técnica da PCR em Tempo Real através do kit Library Quantification – Illumina/Universal da empresa Kapa Biosystems e o equipamento 7500 da Applied Biosystems. O sequenciamento genômico foi realizado utilizando o sistema de bibliotecas *pair-end* e o equipamento MiSeq (Illumina) com o cartucho MiSeq Kit V3 de 600 ciclos para a amostra Ec7A que foi sequenciada no Centro de pesquisas Aggeu Magalhães-Fiocruz-Recife e as demais foram sequenciadas no Instituto de Ciências Biológicas-USP-São Paulo. Leituras de 75pb foram gerados para a amostra Ec7A, em contrapartida para as amostras Ec2A, Ea5A e Ea7A, o fragmento teve um comprimento de 1100pb com extremidades de 300pb sequenciadas.

As etapas realizadas para montagem e anotação dos genomas foram: primeiro para avaliação da qualidade dos fragmentos gerados, a ferramenta FASTQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) foi utilizada. Parâmetros tais como qualidade de sequenciamento por base, qualidade de sequenciamento média por leitura, distribuição do tamanho das leituras, quantidade de leituras produzidas e distribuição do conteúdo de nucleotídeos foram avaliados. Após esta avaliação, estes valores produzidos

foram utilizados para configurar a execução da ferramenta Trimmomatic (<http://www.usadellab.org/cms/index.php?page=trimmomatic>) que tem como finalidade a limpeza das informações com baixa qualidade presentes no dado inicial, além da remoção de interferentes. Posteriormente a esta limpeza, os programas *velveth* e *velvetg* do pacote Velvet (ZERBINO; BIRNEY, 2008) foram utilizados para montagem dos contigs. Importante ressaltar que os parâmetros de ambas ferramentas foram configurados com o auxílio da ferramenta Velvetoptimiser (<http://bioinformatics.net.au/software/velvetoptimiser.shtml>) que encapsula os programas *velveth* e *velvetg*. Os programas *blastall* (ALTSCHUL *et al.*, 1990) e *Mauve* (DARLING *et al.*, 2011) foram utilizados para o alinhamento e ordenamento dos contigs em relação às sequências de referência para cromossomo e plasmídeos. Para predição e anotação gênica as ferramentas RASTtk (<http://rast.nmpdr.org/>) e Resfinder-beta-lactamases (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>) foram utilizadas. Foi realizada ainda uma predição de grupos de ortólogos para os genes encontrados utilizando o programa Orthomcl (LI; STOECKERT; ROOS, 2003) (<http://www.orthomcl.org/orthomcl/>). Todas as informações relativas à montagem, predição e anotação gênica e relação de ortologia foram armazenadas em um banco de dados relacional utilizando como ferramenta de gerenciamento o MySQL (<https://www.mysql.com/>).

4.11.1. Pesquisa de determinantes de resistência e virulência e determinação dos grupos de incompatibilidade plasmidial (inc)

A listagem dos genes cromossômicos e plasmidiais obtidos através do sequenciamento genômico e anotados através do Rast e Resfinder-beta-lactamases foi manualmente analisada com o objetivo de detectar genes de resistência a beta-lactâmicos, genes de resistência a outras classes de antimicrobianos, genes de virulência relacionados a adesinas fimbriais, sideróforos, cápsula e biofilme, além de genes relacionados aos sistemas de efluxo e secreção.

Também foi realizada pesquisa dos grupos de incompatibilidade plasmidial presentes nos isolados, alinhando as sequências dos primers descritos por Carattoli *et al.* (2005), contra o DNA plasmidial e cromossômico através da ferramenta *blastall*. O alinhamento de 100% das sequências forward e reverse implicou dizer que o isolado contém a sequência compreendida entre ambos os primers, ou seja, o grupo de inc pesquisado.

5. RESULTADOS

5.1. Determinantes genéticos de resistência a beta-lactâmicos e caracterização de isolados de *Enterobacter aerogenes* e *Enterobacter cloacae* provenientes de infecção e colonização em pacientes de um hospital público de Recife-PE, Brasil (Artigo 1)

Introdução

Enterobacter spp. são bacilos gram-negativos pertencentes à família Enterobacteriaceae, podendo ser encontrados no solo, na água, em vegetais e na microbiota intestinal da maioria dos animais, incluindo o homem. Entre as 13 espécies reconhecidas como membros desse gênero, *E. aerogenes* e *E. cloacae* são as espécies mais frequentemente associadas a doenças humanas (GONÇALVES *et al.*, 2000). Essas duas espécies estão emergindo como importantes patógenos envolvidos em infecções relacionadas a assistência à saúde (IRAS), causando um amplo espectro de infecções envolvendo o trato urinário, trato respiratório baixo, pele, tecidos moles, feridas e sistema nervoso central (LEE *et al.*, 2010; DAVIN-REGLI; PAGES, 2015). A maioria das cepas de *Enterobacter* envolvidas em IRAS são produtoras de beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) e o tratamento de infecções causadas por essas cepas representa um desafio à terapia antimicrobiana, pois as ESBLs são capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas de todas as gerações e monobactâmicos, minimizando as opções terapêuticas (LAGO *et al.*, 2010; TUON *et al.*, 2015). Os principais tipos de ESBLs detectadas em Enterobacteriaceae são SHV, TEM, CTX-M e GES.

Os carbapenêmicos são os agentes antimicrobianos mais amplamente usados para tratar infecções causadas por cepas produtoras de ESBLs (NOGUEIRA *et al.*, 2015). Mais recentemente, a emergência de Enterobacteriaceae produtoras de carbapenemases tornou-se um desafio para a terapia antimicrobiana por conferir resistência aos carbapenêmicos (TUON *et al.*, 2015). Os principais tipos de carbapenemases detectadas em Enterobactérias são KPC, VIM, IMP, SPM e GES.

Enzimas *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) em Enterobacteriaceae tornaram-se endêmicas mundialmente. Desde 2010 tem se observado uma grande dispersão do gene *bla*_{KPC} em diversos hospitais em diferentes estados e cidades brasileiras (CABRAL *et al.*, 2012; PEREIRA *et al.*, 2013; DE CÁSSIA ANDRADE MELO *et al.*, 2014; CABRAL *et al.*, 2015). A emergência de KPC dificulta o tratamento das infecções, desde que essa enzima confere altos níveis de resistência a todos os beta-lactâmicos e níveis distintos de resistência

aos carbapenêmicos (TUON *et al.*, 2015). Ainda são escassos os estudos sobre isolados de *Enterobacter* produtores de ESBLs e carbapenemases, no Brasil.

A presença de genes de resistência em elementos genéticos móveis como transposons, integrons e plasmídeos, facilita a disseminação de determinantes de resistência em ambientes hospitalares. Diversos plasmídeos de diferentes tamanhos foram associados com isolados positivos para *bla*_{KPC} em todo o mundo (ANDRADE *et al.*, 2011; PEREIRA *et al.*, 2013; RIBEIRO *et al.*, 2013), destacando a disseminação bem sucedida deste gene. A maioria dos estudos sugere que cepas produtoras de ESBLs são policlonais e que as ESBLs são disseminadas por transferência de plasmídeos, entretanto, durante surtos, disseminação clonal pode ocorrer (MINARINI *et al.*, 2008; CHAGAS *et al.*, 2011; TOLLENTINO *et al.*, 2011; CHANG *et al.*, 2013; NOGUEIRA *et al.*, 2015).

Considerando a importância de *Enterobacter* como causador de IRAS, o objetivo desse estudo foi investigar a frequência e os principais genes de ESBLs e carbapenemases em isolados de *E. aerogenes* e *E. cloacae* provenientes de colonização e infecção em pacientes de um hospital público de Recife-PE, Brasil, nos anos de 2011 a 2013, além de realizar a tipagem molecular através do perfil de ERIC-PCR e perfil plasmidial e a tipagem fenotípica através do perfil de resistência a antimicrobianos.

Materiais e métodos

Isolados bacterianos

Trinta e quatro isolados de *E. aerogenes* e 17 isolados de *E. cloacae* provenientes de diferentes pacientes e sítios de infecção ou colonização foram obtidos da demanda espontânea do laboratório de um hospital público da cidade de Recife-PE, Brasil, durante os anos de 2011 e 2012. Em 2013 foram obtidos novos isolados no mesmo hospital para conferir o perfil clonal dos isolados. Os isolados foram mantidos em estoque congelado à -20°C com glicerol a 15%.

Teste de susceptibilidade a antimicrobianos

A concentração inibitória mínima (CIM) para os antimicrobianos: amicacina (AMI), amoxicilina-ácido clavulânico (AMC), ampicilina (AMP), cefazolina (CFZ), cefepime (CFP), cefotaxima (CFT), ceftiofeno (CFX), ceftriaxona (CEFT), ciprofloxacina (CIP), ertapenem (ERT), gentamicina (GEN), imipenem (IMI), levofloxacina (LEV), meropenem (MER), piperacilina-tazobactam (PIPT), tobramicina (TOB), trimetoprim-sulfametaxazol (TRIS) foi

determinada através do equipamento automatizado BD Phoenix™ (Franklin Lakes, New Jersey, USA).

Extração de DNA, PCR e sequenciamento para os genes de resistência

O DNA genômico foi extraído diretamente de uma suspensão da colônia em 200 µL de água destilada. A suspensão foi aquecida à 100°C por 10 minutos, centrifugada (5 min/15000 rpm) e 100 µL do sobrenadante contendo o DNA foi recuperado e estocado à -20°C. O DNA foi quantificado através do equipamento Nano Drop. PCR para os genes de resistência *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{KPC}, *bla*_{GES}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, e *bla*_{SPM} foram realizadas utilizando primers e condições, conforme especificado na tabela 1. Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose à 1,0%. Amplicons representativos das PCRs positivas para os genes de resistência foram submetidos ao sequenciamento de DNA pelo método de Sanger *et al.* (1977). Dados do sequenciamento foram analisados usando o software Chromas (http://technelysium.com.au/?page_id=13) e para tradução dos nucleotídeos em proteínas foi utilizado o software (<http://web.expasy.org/translate/>). As sequências foram depositadas no genbank sob os números de acesso KU680809, KU680810, KU680811, KU680812, KU680813 e KF561135.1.

Técnicas de tipagem molecular: perfil plasmidial e ERIC-PCR

O DNA plasmidial foi extraído utilizando o Kit UltraClean Endotoxin-Free Mini Plasmid Prep Kit (Mo Bio Lab, USA). A ERIC-PCR foi realizada de acordo com Duan *et al.* (2009) e Cabral *et al.* (2012) (tabela 1). Os produtos da extração de plasmídeos e da ERIC-PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose à 0,7% e 1,5%, respectivamente. O padrão de bandas gerado foi analisado de acordo com Tenover *et al.* (1995) e o software DARwin 5.0 foi usado para gerar o dendrograma. Isolados coletados em 2013 foram submetidos à ERIC-PCR com o objetivo de verificar a relação clonal após intervalo de um ano entre as coletas. Também foram pesquisados os genes de resistência *bla*_{KPC} e *bla*_{CTX-M} nesses novos isolados.

Resultados

Perfil de resistência a antimicrobianos

O perfil de resistência aos antimicrobianos dos isolados de *E. aerogenes* e *E. cloacae* está demonstrado nas tabelas 2 e 3. Os isolados de *E. aerogenes* foram agrupados em diferentes perfis de resistência. R1 (resistente a todos os antimicrobianos), R1a (difere do

perfil R1 pela resistência intermediária a AMI), R1b (difere do perfil R1 pela sensibilidade a AMI), R1c (difere do perfil R1 pela sensibilidade a TRIS), R2 [resistente a todos os antimicrobianos, exceto a AMI (intermediário) e a TRIS (sensível)], R2a (difere do perfil R2 pela sensibilidade a CFP), R2b (resistente a todos, exceto a AMI, TRIS e CFP), R3 (resistente a todos, exceto a AMI e aos carbapenêmicos: IMP, MER e ERT), R4 (resistente a todos, exceto a GEN (sensível) e TOB (intermediário) e R4a (difere do perfil R4 pela resistência intermediária a AMI). Em relação aos isolados de *E. cloacae*, estes foram agrupados nos perfis R4a, R5 [resistente a todos os antimicrobianos, exceto a AMI (sensível), carbapenêmicos (sensível), LEV (sensível) e PIPT (intermediário)] , R5a (difere do perfil R5 por resistência a PIPT), R5b (difere do perfil R5 por resistência intermediária a CFP), R5c (difere do perfil R5 por resistência intermediária a CIP) e R6 (difere do perfil R5 por resistência a PIPT e LEV).

Considerando os isolados de *E. aerogenes*, os antimicrobianos que apresentaram melhor atividade foram: AMI, TRIS, GEN e TOB. Em relação aos isolados de *E. cloacae*, AMI e carbapenêmicos apresentaram melhor atividade.

Dentre os isolados de *E. aerogenes*, apenas Ea14A e Ea17A foram sensíveis a CFP e Ea21A e Ea25A foram sensíveis aos três carbapenêmicos avaliados. Os trinta isolados restantes foram resistentes a todos os beta-lactâmicos testados, com exceção dos casos de disparidades de resistência aos carbapenêmicos apresentada pelos isolados Ea14A, Ea24A, Ea26A, Ea29A, Ea32A e Ea34A, sendo o ertapenem o substrato mais sensível para detecção de resistência aos carbapenêmicos.

Perfil de ERIC-PCR

Os isolados de *E. aerogenes* de todos os setores do hospital apresentaram o mesmo perfil, denominado E1, portanto apresentaram relação clonal pela ERIC-PCR (Figura 1, Tabela 2). Dentre os isolados de *E. cloacae*, todos oriundos da UTI neonatal apresentaram o perfil E2 (Figura 2, Tabela 3), apenas a cepa Ec9A (setor: Unidade coronariana, UCO1) apresentou perfil distinto (E3), entretanto o clone E2 também foi detectado posteriormente nessa unidade. Através da análise de novos isolados no ano seguinte, foi constatada a persistência do clone de *E. aerogenes* (E1) e do perfil E2a relacionado ao clone E2 de *E. cloacae* no hospital.

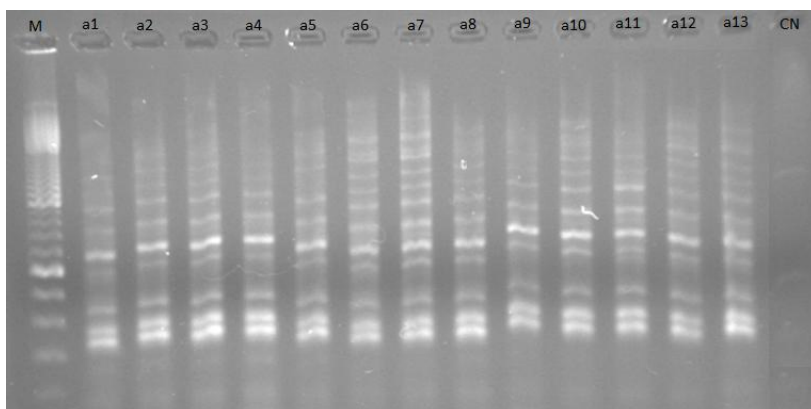


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose à 1,5% do produto da ERIC-PCR de isolados representativos de *E. aerogenes*. Linha 1: marcador de peso molecular de 100pb, linhas 2-14: isolados de *E. aerogenes*, linha 15: controle negativo.

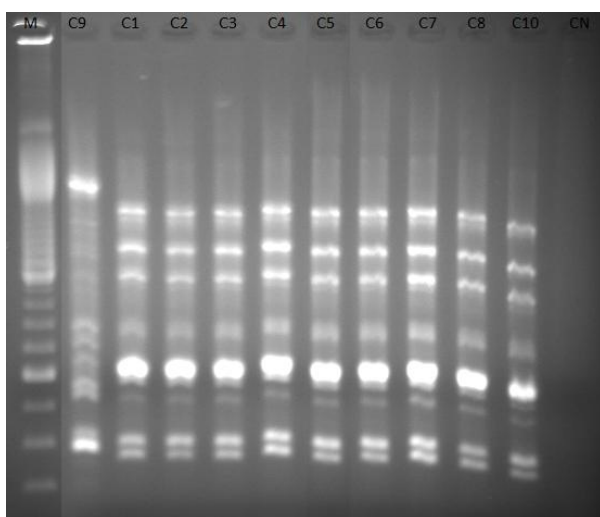


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose à 1,5% do produto da ERIC-PCR de isolados representativos de *E. cloacae*. Linha 1: marcador de peso molecular de 100pb, linhas 2-11: isolados de *E. cloacae*, linha 12: controle negativo.

Perfil plasmidial

Considerando que os isolados eram clones pela ERIC-PCR e pelo perfil de resistência, um representante de cada grupo clonal foi tipado quanto ao seu perfil plasmidial. Os isolados de *E. aerogenes* apresentaram os perfis: P1, P1a, P2 e P3 (Tabela 2). E os perfis: P4, P4a e P5 foram detectados nos isolados de *E. cloacae* (Tabela 3). *Enterobacter aerogenes* apresentaram de 4 a 10 plasmídeos de <12kb a ≥ 150 kb e *E. cloacae* apresentaram de 1 a 4 plasmídeos de 12kb a 90kb (Figura 3).

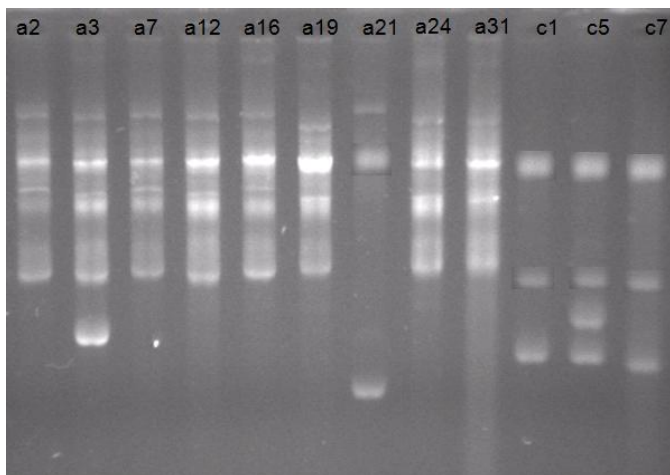


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose à 0,7% do produto da extração de plasmídeos de isolados representativos de *E. aerogenes* (a) e *E. cloacae* (c). Linhas 1, 3-6, 8 e 9: P1 (plasmídeos com pesos moleculares de ≥ 150 pb, 150pb, 130pb, 100pb, 85pb, 80pb, 65pb e 40pb); Linha 2: P1a (≥ 150 pb, 150pb, 130pb, 100pb, 85pb, 80pb, 65pb, 40pb e 15pb); Linha 7: P3 (150pb, 100pb e ≥ 12 pb); Linhas 10 e 12: P4 (90pb, 40pb e 15pb) e Linha 11: P4a (90pb, 40pb, 20pb e 15pb).

Genes de resistência

Os genes *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} e *bla*_{KPC} foram detectados em 17 (50%), em 4 (12%) e em 30 (88%) isolados de *E. aerogenes*, respectivamente. Considerando os isolados de *E. cloacae*, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} e *bla*_{KPC} foram detectados em 16 (94%), 17 (100%) e 3 (18%) isolados, respectivamente. Os genes *bla*_{SHV}, *bla*_{GES}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} e *bla*_{SPM} não foram detectados em ambas espécies (tabelas 4 e 5). Através de sequenciamento do produto de PCR dos genes, de isolados representativos, foram confirmadas as variantes: *bla*_{TEM-1}, *bla*_{CTX-M-15} e *bla*_{KPC-2} nas duas espécies estudadas.

Dentre os isolados de *E. aerogenes*, a positividade simultânea de: (a) *bla*_{CTX-M} e *bla*_{KPC}, (b) *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX-M} e (c) *bla*_{TEM} e *bla*_{KPC} foram detectadas em 1, 2, 15 isolados respectivamente. Vale ressaltar o acúmulo dos três determinantes de resistência pelo isolado de infecção Ea26A (positiva para os genes *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} e *bla*_{KPC}). Considerando os isolados de *E. cloacae*, a co-positividade para (a) *bla*_{TEM} e *bla*_{KPC}, (b) *bla*_{CTX-M} e *bla*_{KPC} e (c) *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX-M} foram detectadas em 3, 3 e 16 isolados respectivamente. Vale ressaltar que os isolados de infecção Ec2A, Ec3A e Ec17A foram positivos para os três genes: *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} e *bla*_{KPC}.

Análise comparativa de acordo com a fonte de isolamento: colonização ou infecção

Dentre os 34 isolados de *E. aerogenes*, 18 foram provenientes de colonização e 16 foram provenientes de infecção (Tabela 4). Dentre os isolados de *E. cloacae*, 3 foram

provenientes de colonização e 14 isolados foram provenientes de infecção (Tabela 5).

Considerando isolados provenientes de infecção e colonização, as ESBLs (*bla*_{CTX-M}) foram distribuídas da seguinte forma: dos 4 isolados de *E. aerogenes* positivos para *bla*_{CTX-M}, 3 correspondem a isolados de infecção (Ea21A, Ea25A e Ea26A) e dos 17 isolados de *E. cloacae* positivos para *bla*_{CTX-M}, 14 correspondem a isolados de infecção. Considerando a distribuição de *bla*_{KPC} em isolados provenientes de infecção e colonização, dos 30 isolados de *E. aerogenes* positivos para *bla*_{KPC}, 16 correspondem a isolados de colonização, todos os isolados de *E. cloacae* positivos para *bla*_{KPC} correspondem a isolados de infecção.

Discussão

A prevalência de infecções por *Enterobacter* sp. em setores clínicos tem aumentado devido à introdução de cefalosporinas de espectro estendido e carbapenêmicos na antibioticoterapia (ANASTAY *et al.*, 2013; DAVIN-REGLI; PAGES, 2015). Com raras exceções, os isolados de *E. aerogenes* avaliados nesse estudo foram resistentes a todos os beta-lactâmicos testados. Desde a última década, *E. cloacae* tem sido repetidamente reportado como patógeno causador de IRAS em unidades neonatal e diversos surtos de infecção (PESTOURIE *et al.*, 2014; DAVIN-REGLI; PAGES, 2015). A maioria das isolados de *E. cloacae* analisados no presente estudo, foram sensíveis aos carbapenêmicos, apenas Ec17A foi resistente.

Além de resistência a carbapenêmicos, no presente estudo, os isolados também mostraram resistência a aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e inibidores de folato. A amicacina foi o antimicrobiano com melhor atividade contra as duas espécies analisadas. Aminoglicosídeos, polimixina B e tigeciclina também têm sido relatadas por outros autores, como eficazes para tratamento de infecções causadas por *Enterobacter* spp. MDR no Brasil (JASKULSKI *et al.*, 2013; RIBEIRO *et al.*, 2013; QUILES *et al.*, 2015; TAVARES *et al.*, 2015). Por outro lado, têm sido recentemente detectados isolados de *E. aerogenes* e *E. cloacae* resistentes à polimixa B e tigeciclina no Brasil (TAVARES *et al.*, 2015). Resistência a outras classes de antimicrobianos pode ser devido à transferência simultânea de genes de resistência via plasmídeos, transposon e integrons (SEKI *et al.*, 2011; 2013).

A taxa de ESBL em *E. aerogenes* detectada no estudo foi de 12%, que corresponde à positividade para *bla*_{CTX-M}, uma vez que *bla*_{TEM-1} trata-se de uma beta-lactamase clássica e não ESBL (LAGO *et al.*, 2010). Com relação aos isolados de *E. cloacae*, todos foram positivos para ESBL. Em outros estudos realizados no Brasil, Nogueira *et al.* (2014), detectaram 20%

de positividade para ESBLs em *Enterobacter* spp., detectando os genes *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-59}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{SHV-12} e *bla*_{PER-2}, taxa inferior a taxa global de ESBL para *Enterobacter* spp. detectada no presente estudo (41%). Com relação ao gene *bla*_{KPC}, Tavares *et al.* (2015), detectou esse gene em 31,4% dos *E. aerogenes* e 17% dos *E. cloacae*. As taxas para *bla*_{KPC} no presente estudo foram de 18% para *E. cloacae* e 88% para *E. aerogenes*, evidenciando a disseminação desses genes no hospital analisado, o que pode ser justificado pela disseminação clonal dos isolados.

Considerando a fonte de isolamento, infecção ou colonização, houve predomínio de *bla*_{CTX-M} em isolados de infecção. Por outro lado, o predomínio de *bla*_{KPC} foi dependente da espécie: *E. cloacae* (infecção) e *E. aerogenes* (colonização). De acordo com o CDC (http://www.cdc.gov/hai/pdfs/labSettings/Klebsiella_or_Ecoli.pdf), pacientes colonizados com enterobactérias resistentes a carbapenêmicos são fontes de transmissão em ambientes de saúde (CALFEE; JENKINS, 2008). Identificar pacientes colonizados com essas cepas e isolar estes pacientes pode ser uma importante etapa para prevenir a transmissão (SIEGEL *et al.*, 2006).

No presente estudo, 41% dos isolados de *Enterobacter* spp. foram provenientes de colonização e destes, 76% foram positivos para *bla*_{KPC}, reforçando a necessidade das culturas de vigilância. De acordo com Schechner *et al.* (2013), basear-se exclusivamente em culturas clínicas não detectará a maioria dos portadores de resistência aos carbapenêmicos, portanto a vigilância ativa de pacientes de alto risco é fortemente recomendada. Culturas de vigilância tem sido alvo de estudos por diversos autores, com o objetivo de verificar medidas preventivas para evolução à infecção a partir de colonização (SCHECHNER *et al.*, 2013; OREN *et al.*, 2013; HAYDEN *et al.*, 2015).

Neste trabalho, não houve detecção do gene *bla*_{SHV}, corroborando dados de baixa frequência desse gene em *Enterobacter* spp., no Brasil (JASKULSKI *et al.*, 2013; NOGUEIRA *et al.*, 2014; TAVARES *et al.*, 2015). Também não houve detecção dos genes de *bla*_{GES}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} e *bla*_{SPM}, corroborando com outro estudo no Brasil (RIBEIRO *et al.*, 2013).

A concomitância de genes de beta-lactamases foi detectada nos isolados do presente estudo, ressaltando a detecção simultânea de *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} e *bla*_{KPC} em isolados de infecção. No Brasil, o acúmulo de determinantes de resistência em enterobactérias tem sido citado por outros autores, Jaskulsky *et al.* (2013), também identificaram positivities simultâneas para *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} e *bla*_{KPC} em isolados de *E. cloacae*, porém, não detectaram

*bla*_{CTX-M} em *E. aerogenes*. Tavares *et al.* (2015), verificaram a associação de ESBLs e KPC em isolados de *E. aerogenes* e *E. cloacae*. Estas associações são muito comuns, uma vez que, diferentes beta-lactamases podem ser codificadas no mesmo plasmídeo (CARATTOLI, 2009; NOGUEIRA *et al.*, 2015). Genes de ESBLs já foram detectados em plasmídeos de diferentes pesos moleculares (HAMMAMI *et al.*, 2012; DAVIN-REGLI; PAGES, 2015), da mesma forma, diversos plasmídeos de diferentes tamanhos foram associados com isolados produtores de KPC em todo o mundo (ANDRADE *et al.*, 2011; PEREIRA *et al.*, 2013; RIBEIRO *et al.*, 2013; TAVARES *et al.*, 2015). Os isolados analisados no presente estudo apresentaram diferentes plasmídeos que podem albergar diferentes genes de resistência.

A sensibilidade *in vitro* apresentada ao CFP pelos isolados Ea14A e Ea17A trata-se de uma falsa sensibilidade, uma vez que os isolados são positivos para *bla*_{KPC}, que degrada todos os beta-lactâmicos. O isolado Ea9A foi resistente aos carbapênicos, porém negativo para os genes de carbapenemases pesquisados, possivelmente apresenta outros mecanismos de resistência, tal como associação entre produção de CTX-M e perda de porinas, que também são responsáveis pela susceptibilidade reduzida aos carbapenêmicos, como previamente reportado (YANG *et al.*, 2009; SEKI *et al.*, 2013).

Dentre os isolados de *E. cloacae*, merece atenção a falsa sensibilidade *in vitro* aos carbapenêmicos apresentada por Ec2A e Ec3A, visto que foram positivos para o gene *bla*_{KPC}. A aquisição de genes de carbapenemases nem sempre é associada com altos níveis de resistência aos carbapenêmicos (POIREL *et al.*, 2007). Esta susceptibilidade variada pode ser explicada por outros fatores como: (I) co-presença de outros mecanismos de resistência (LIVERMORE, 2002), (II) supressão genética que leva a um gene silencioso ou (III) dosagem do gene que é dependente do número de cópias do plasmídeo (PELEG *et al.*, 2005).

O sequenciamento de DNA confirmou as variantes: *bla*_{TEM-1}, *bla*_{CTX-M-15} e *bla*_{KPC-2}. O gene *bla*_{TEM-1} codifica uma beta-lactamase clássica que inativa penicilinas e algumas cefalosporinas, sendo inativa contra oximino-cefalosporinas, como ceftazidima (BUSH; JACOBY, 2010). O sequenciamento extensivo dos genes *bla*_{TEM} em Enterobacteriaceae nos últimos 15 anos, tem revelado que há atualmente sete subtipos de *bla*_{TEM-1} (*bla*_{TEM-1A} a *bla*_{TEM-1G}). Estes são definidos por variações nos nucleotídeos 32, 141, 162 ou 175, que podem produzir um dos três diferentes tipos de promotores (Pr3, Pr4 e Pr5) e por uma variedade de mutações silenciosas na região codificante do gene (TRISTRAM *et al.*, 2005). Variantes a partir de TEM-3 que correspondem a ESBLs, não são comuns no Brasil. Nogueira *et al.* (2015), identificaram a variante TEM-136 em dois isolados de *E. cloacae*. Anteriormente a

este relato, apenas TEM-116 tinha sido detectada no Brasil em enterobactérias (DROPA *et al.*, 2010).

CTX-M foi primeiramente identificada na América do sul e é a ESBL prevalente no Brasil, como também em outras regiões do mundo (NOGUEIRA *et al.*, 2015). CTX-M-2 é o subtipo mais frequente no Brasil, sendo encontrada em diversas espécies de enterobactérias (LOPES *et al.*, 2010; CANTÓN *et al.*, 2012; GALES *et al.*, 2012). Entretanto, estudos mais recentes têm reportado um aumento no número de isolados produtores de CTX-M-15 (variante pertencente ao grupo 1 de CTX-M) (NOGUEIRA *et al.*, 2015). CTX-M-15 em *E. cloacae*, tem sido descrita desde 2004 (PATERSON; BONOMO, 2005). Semelhante ao presente estudo, *bla*_{CTX-M-15} tem sido detectado em espécies de *Enterobacter* no Brasil em outros trabalhos (SEKI *et al.* 2013; NOGUEIRA *et al.* 2015). Vale ressaltar o predomínio de *bla*_{CTX-M} em isolados de infecção no presente estudo.

Carbapenemases do tipo KPC têm sido o principal determinante de resistência em Enterobacteriaceae, sendo *bla*_{KPC-2} a variante mais frequentemente detectada (TZOUVELEKIS *et al.*, 2012; TAVARES *et al.*, 2015). Após o primeiro relato de KPC no Brasil em 2006 (MONTEIRO *et al.*, 2009), sua incidência aumentou significativamente nesse país. No Brasil, enzimas KPC em isolados de *E. cloacae* já foram detectadas nas regiões Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste (ZAVASCKI *et al.*, 2009; ANDRADE *et al.*, 2011; JASKULSKI *et al.*, 2013; RIBEIRO *et al.*, 2013; TAVARES *et al.*, 2015). Em isolados de *E. aerogenes*, *bla*_{KPC-2} foi detectado nas regiões Sul, Centro-Oeste e Nordeste (JASKULSKI *et al.*, 2013; TUON *et al.*, 2015; TAVARES *et al.*, 2015). Destacando-se, no presente estudo, o predomínio de *bla*_{KPC} em isolados de *E. aerogenes* provenientes de colonização.

Através da ERIC-PCR constatou-se que houve disseminação clonal dos isolados em diferentes setores hospitalares. Isolados com relação clonal, mas com diferentes perfis plasmidiais, diferentes perfis de resistência e diferentes conteúdos de genes de resistência têm sido citados na literatura (CABRAL *et al.*, 2012; RAMOS *et al.*, 2014). Nesse estudo, também foi detectado mesmo perfil plasmidial com diferentes perfis de resistência, isso pode ocorrer porque plasmídeos de mesmo peso molecular pode ser portador de vários genes ou não apresentar genes de resistência (CARATTOLI, 2009). Sendo detectado também, mesmo perfil de resistência com diferentes perfis plasmidiais, isso pode ocorrer devido à disseminação de genes de resistência associados a elementos móveis (OCHMAN *et al.*, 2000).

No presente estudo, isolados de *E. aerogenes* e *E. cloacae* apresentaram disseminação

monoclonal. De acordo com a literatura, têm sido relatadas infecções, principalmente, policlonais por isolados de *E. cloacae* (CANTÓN *et al.*, 2002; SEKI *et al.*, 2013; NOGUEIRA *et al.*, 2014; 2015; DAVIN-REGLI; PAGES, 2015; STOESSER *et al.*, 2015; TAVARES *et al.*, 2015; QUILES *et al.*, 2015). Por outro lado, estudos mostram que infecções por isolados de *E. aerogenes* apresentam disseminação monoclonal (BOSSI *et al.*, 1999; NOGUEIRA *et al.*, 2014; 2015; DAVIN-REGLI; PAGES, 2015; TUON *et al.*, 2015). Da mesma forma que detectado no presente estudo, outros autores evidenciaram o mesmo perfil clonal com diferentes perfis plasmidiais e genes de resistência (RIBEIRO *et al.*, 2013; NOGUEIRA *et al.*, 2014; RAMOS *et al.*, 2015).

Infecções causadas por clones de *E. aerogenes* e *E. cloacae* têm sido associadas com colonização de equipamentos cirúrgicos, soluções de limpeza, dispensador de sabão recarregável e pias (DAVIN-REGLI; PAGES, 2015; STOESSER *et al.*, 2015). Dentre as potenciais fontes de micro-organismos, vale ressaltar casos onde o sabão foi apontado como fonte de transmissão inviabilizando a lavagem das mãos como pilar da prática de controle de infecções (STOESSER *et al.*, 2015). No presente estudo, é alarmante a persistência do clone de *E. aerogenes* positivo para *bla*_{KPC}, como também, de *E. cloacae* positivo para *bla*_{CTX-M} no ano seguinte, no mesmo hospital. Esses resultados devem alertar as autoridades médicas para instituir rigorosos métodos de detecção e consequentemente controle da disseminação de isolados MDR em ambiente hospitalar.

Podemos concluir que a disseminação clonal e o acúmulo de determinantes de resistência apresentados pelos isolados demonstram a habilidade de *E. aerogenes* e *E. cloacae* provenientes de colonização e infecção adquirir e manter diferentes genes de resistência. Este fato é preocupante, pois as opções de antimicrobianos disponíveis para o tratamento destas infecções estão cada vez mais reduzidas. São de extrema relevância o uso inteligente de antimicrobianos e a identificação fenotípica e genética precoce dos mecanismos de resistência em isolados não somente de infecção, mas também de colonização para impedir a disseminação desses isolados MDRs, portadores de diferentes genes de resistência.

Tabela 1. Primers utilizados na PCR e sequenciamento de DNA para detecção dos genes de β -lactamases.

Gene	Primer	Sequência (5` - 3`)	temp. ^(a)	Referência
<i>bla</i> _{SHV}	SHV.FoR SHV.ReR	GGGTTATTCTTATTTGTCGC AGCGCGAGAAGCATCCTG	62°C	Rasheed <i>et al.</i> (2000)
<i>bla</i> _{TEM}	T1F T2R	ATAAAATTCTTGAAGACGAAA GACAGTTACCAATGCTTAATC	57°C	Rasheed <i>et al.</i> (2000)
<i>bla</i> _{CTX-M}	CTX-MA1 CTX-MA2	SCSATGTGCAGYACCAGTAA CCGCRATATGRTTGGTGGTG	61°C	Saladin <i>et al.</i> (2002)
<i>bla</i> _{CTX-M-1}	CTX-M13U CTX-M13L	GGTTAAAAAATCACTGCGTC TTGGTGACGATTTTAGCCGC	60°C	Saladin <i>et al.</i> (2002)
<i>bla</i> _{CTX-M-2}	CTX-M25U CTX-M25L	ATGATGACTCAGAGCATTCG TGGGTTACGATTTTCGCCGC	62°C	Saladin <i>et al.</i> (2002)
<i>bla</i> _{KPC}	KPC-1a KPC-1b	TGTCACTGTATCGCCGTC CTCAGTGCTCTACAGAAAACC	63°C	Yigit <i>et al.</i> (2001)
<i>bla</i> _{VIM}	VIM-DIA F VIM-DIA R	CAGATTGCCGATGGTGTGTTGG AGGTGGGCCATTCAGCCAGA	62°C	Dong <i>et al.</i> (2008)
<i>bla</i> _{IMP}	IMP-DIA F IMP-DIA R	GGAATAGAGTGGCTTAATTCTC GTGATGCGTCYCCAAYTTCATC	60°C	Dong <i>et al.</i> (2008)
<i>bla</i> _{SPM}	SPM-DIA F SPM-DIA R	CCTACAATCTAACGGCGACC TCGCCGTGTCCAGGTATAAC	60°	Gales <i>et al.</i> (2003)
NA	ERIC-1 ERIC-2	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAAC AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG	36°C	Duan <i>et al.</i> , (2009)

(a)Temp, temperatura de anelamento; NA, não aplicável. Todos os nomes dos primer foram descritos de acordo com as respectivas referências F (e For, 1, U, a), sequência forward; R (e Rev, 2, L, b), sequência reverse.

Tabela 2. Caracterização das amostras de *Enterobacter aerogenes* quanto ao perfil de resistência a antimicrobianos, perfil plasmidial e perfil de ERIC-PCR.

ISOLADO	SETOR	PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS	PR	PP	PE
Ea1A	UTI	AMI (sens), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN, IMI, LEV, MER, PIPT, TOB, TRIS	R1b	P1	E1
Ea2A	UCO1	AMI, AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN, IMI, LEV, MER, PIPT, TIG (sens), TOB, TRIS	R1	P1	E1
Ea3A	UCO2	AMI, AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN (sens), IMI, LEV, MER, PIPT, TIG (sens), TOB (int), TRIS	R4	P1a	E1
Ea4A	Cardio	AMI, AMC*, AMP, AMPS, CFZ, CFP, CFT*, CFX, CEFT, CEFU, CIP, ERT*, GEN (sens), IMI, LEV, MER, PIPT, TOB (int), TRIS	R4	P1a	E1
Ea5A	UTI	AMI (int), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN, IMI, LEV, MER, PIPT, TOB, TRIS	R1a	P1	E1
Ea6A	UTI	AMI (int), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN, IMI, LEV, MER, PIPT, TOB, TRIS	R1a	P1	E1
Ea7A	UTI	AMI (sens), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN, IMI, LEV, MER, PIPT, TIG (sens), TOB, TRIS	R1b	P1	E1
Ea8A	UTI	AMI (sens), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN, IMI, LEV, MER, PIPT, TOB, TRIS	R1b	P1	E1
Ea9A	UTI	AMI (sens), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN, IMI, LEV, MER, PIPT, TOB, TRIS	R1b	P1	E1
Ea10A	Cardio	NAL, AMI (int), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN (sens), IMI, LEV, MER, NIT (int), NOR, PIPT, TIG (sens), TOB (int), TRIS	R4a	P1	E1
Ea11A	Clin Med.	AMI (int), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN, IMI, LEV, MER, NIT (sens), PIPT, POLI (sens), TOB, TRIS	R1a	P1	E1
Ea12A	UTI	AMI (int), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN, IMI, LEV, MER, PIPT, TIG (sens), TOB, TRIS	R1a	P1	E1
Ea13A	UCO	AMI (int), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN (sens), IMI, LEV, MER, PIPT, TOB (int), TRIS	R4a	P1	E1
Ea14A	UCO	AMI (sens), AMC, AMP, CFZ, CFP (sens), CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN, IMI (int), LEV, MER (int), PIPT, TOB, TRIS (sens)	R2b	P2	E1
Ea15A	UTI	AMI (sens), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN, IMI, LEV, MER, PIPT, TIG (sens), TOB, TRIS	R1b	P1	E1
Ea16A	UCO1	AMI, AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN, IMI, LEV, MER, PIPT, TOB, TRIS (sens)	R1c	P1	E1
Ea17A	UCO1	AMI (int), AMC, AMP, CFZ, CFP (sens), CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN, IMI, LEV, MER, PIPT, TOB, TRIS (sens)	R2a	P1	E1
Ea18A	UTI	AMI, AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN, IMI, LEV, MER, PIPT, TIG (sens), TOB, TRIS	R1	P1	E1
Ea19A	UTI	AMI (int), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN (sens), IMI, LEV, MER, PIPT, TIG (sens), TOB (int), TRIS	R4a	P1	E1
Ea20A	UCO1	AMI, AMC*, AMP, AMPS, CFZ, CFP, CFT*, CFX, CEFT, CEFU, CIP, ERT*, GEN, IMI, LEV, MER, PIPT, TOB, TRIS (sens)	R1c	P1	E1
Ea21A	Clin Med	AMI (sens), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT (sens), GEN, IMI(sens), LEV, MER(sens), NIT (sens), NOR, PIPT, TOB, TRIS	R3	P3	E1
Ea22A	UCO1	AMI (sens), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN, IMI, LEV, MER, PIPT, TOB, TRIS	R1b	P1	E1
Ea23A	UCO1	AMI, AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN (sens), IMI, LEV, MER, PIPT, TOB (int), TRIS	R4	P1a	E1
Ea24A	UTI	AMI (sens), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN, IMI(int), LEV, MER(int), PIPT, TOB, TRIS	R1b	P1	E1
Ea25A	Clin Med	NAL, AMI (sens), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT(sens), GEN, IMI(sens), LEV, MER(sens), NIT (sens), NOR, PIPT, TOB, TRIS	R3	P3	E1
Ea26A	Cardio	NAL, AMI (int), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN, IMI(sens), LEV, MER(int), NIT (int), NOR, PIPT, TOB, TRIS	R1a	P1	E1
Ea27A	UCO1	AMI, AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN, IMI, LEV, MER, PIPT, TIG(sens), TOB, TRIS(sens)	R1c	P1	E1
Ea28A	UTI	AMI (int), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN(sens), IMI, LEV, MER, PIPT, TIG(sens), TOB (int), TRIS	R4a	P1	E1
Ea29A	UCO1	AMI, AMC*, AMP, AMPS, CFZ, CFP, CFT*, CFX, CEFT, CEFU, CIP, ERT*, GEN(sens), IMI(int), LEV, MER, PIPT, TOB(int), TRIS	R4	P1a	E1
Ea30A	UTI	AMI, AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN(sens), IMI, LEV, MER, PIPT, TIG(sens), TOB (int), TRIS	R4	P1a	E1
Ea31A	Cardio	AMI (int), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN, IMI, LEV, MER, PIPT, TOB, TRIS(sens)	R2	P1	E1
Ea32A	UCO1	AMI (int), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN(sens), IMI(int), LEV, MER, PIPT, TIG(sens), TOB(int), TRIS	R4a	P1	E1
Ea33A	UTI	AMI, AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN(sens), IMI, LEV, MER, PIPT, TIG(sens), TOB(int), TRIS	R4	P1a	E1
Ea34A	UTI	AMI (int), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN(sens), IMI(sens), LEV, MER, PIPT, TIG(sens), TOB(int), TRIS	R4a	P1	E1

Ea, *Enterobacter aerogenes*; PR, Perfil de resistência a antimicrobianos; PP, perfil plasmidial; PE, perfil

de ERIC-PCR; UTI, Unidade de tratamento intensivo; UCO, Unidade coronariana; Cardio, cardiologia; Clin. Med, clínica médica; AMI, amicacina; AMC, amoxicilina-ácido clavulânico; AMP, ampicilina; CFZ, cefazolina; CFP, cefepime; CFT, cefotaxima; CFX, ceftiofina; CEFT, ceftriaxona; CIP, ciprofloxacina; ERT, ertapenem; GEN, gentamicina; IMI, imipenem; LEV, levofloxacina; MER, meropenem; PIPT, piperacilina-tazobactam; TOB, tobramicina; TRIS, trimetoprim-sulfametaxazol; sens, sensível; int, resistência intermediária.

Tabela 3. Caracterização das amostras de *Enterobacter cloacae* quanto ao perfil de resistência a antimicrobianos, perfil plasmidial e perfil de ERIC-PCR.

ISOLADO	SETOR	PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS	PR	PP	PE
Ec1A	UTI NEO	AMI (sens), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT (sens), GEN, IMI (sens), LEV(sens), MER(sens), PIPT (int), TIG (sens),TOB, TRIS	R5	P4	E2
Ec2A	UTI NEO	AMI (sens), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT (sens), GEN, IMI (sens), LEV(sens), MER(sens), PIPT (int), TIG (sens),TOB, TRIS	R5	P4	E2
Ec3A	UTI NEO	AMI (sens), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT (sens), GEN, IMI (sens), LEV(sens), MER(sens), PIPT (int), TIG (sens),TOB, TRIS	R5	P4	E2
Ec4A	UTI NEO	AMI (sens), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT (sens), GEN, IMI (sens), LEV(sens), MER(sens), PIPT (int), TIG (sens),TOB, TRIS	R5	P4	E2
Ec5A	UTI NEO	AMI (sens), AMC, AMP, CFZ, CFP(int), CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT (sens), GEN, IMI (sens), LEV(sens), MER(sens), PIPT (int), TOB, TRIS	R5b	P4a	E2
Ec6A	UTI NEO	AMI (sens), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT (sens), GEN, IMI (sens), LEV(sens), MER(sens), PIPT (int), TOB, TRIS	R5	P4	E2
Ec7A	UTI NEO	AMI (sens), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT (sens), GEN, IMI (sens), LEV(sens), MER(sens), PIPT , TOB, TRIS	R5a	P4	E2
Ec8A	UTI NEO	AMI (sens), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT (sens), GEN, IMI (sens), LEV, MER(sens), PIPT , TIG(sens),TOB, TRIS	R6	P4	E2
Ec9A	UCO1	AMI (sens), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT (sens), GEN, IMI (sens), LEV(sens), MER(sens), PIPT , TOB, TRIS	R5a	P5	E3
Ec10A	UTI NEO	AMI (sens), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT (sens), GEN, IMI (sens), LEV(sens), MER(sens), PIPT , TOB, TRIS	R5a	P4	E2
Ec11A	UTI NEO	AMI (sens), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT (sens), GEN, IMI (sens), LEV(sens), MER(sens), PIPT (int), TIG (sens),TOB, TRIS	R5	P4	E2
Ec12A	UTI NEO	AMI (sens), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT (sens), GEN, IMI (sens), LEV(sens), MER(sens), PIPT (int), TIG (sens),TOB, TRIS	R5	P4	E2
Ec13A	UTI NEO	AMI (sens), AMC*, AMP, AMPS, CFZ, CFP, CFT*, CFX, CEFT, CEFU, CIP, ERT*, GEN, IMI (sens), LEV(sens), MER(sens), PIPT, TIG (sens),TOB, TRIS	R5a	P4	E2
Ec14A	UTI NEO	AMI (sens), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT (sens), GEN, IMI (sens), LEV(sens), MER(sens), PIPT, TIG (sens),TOB, TRIS	R5a	P4	E2
Ec15A	UTI NEO	AMI (sens), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT (sens), GEN, IMI (sens), LEV(sens), MER(sens), PIPT, TIG (sens),TOB, TRIS	R5a	P4	E2
Ec16A	UTI NEO	AMI (sens), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP(int), ERT (sens), GEN, IMI (sens), LEV(sens), MER(sens), PIPT(int), TIG (sens),TOB, TRIS	R5c	P4	E2
Ec17A	UCO1	AMI (int), AMC*, AMP, AMPS, CFZ, CFP, CFT*, CFX, CEFT, CEFU, CIP, ERT*, GEN, IMI, LEV, MER, PIPT, TIG(sens), TOB, TRIS	R1a	P1	E2

Ec: *Enterobacter cloacae*; PR, Perfil de resistência a antimicrobianos; PP, perfil plasmidial; PE, perfil de ERIC-PCR; UTI NEO, Unidade de tratamento intensivo neonatal; UCO, Unidade coronariana; Cardio, cardiologia; Clin. Med, clínica médica; AMI, amicacina; AMC, amoxicilina-ácido clavulânico; AMP, ampicilina; CFZ, cefazolina; CFP, cefepime; CFT, cefotaxima; CFX, ceftiofina; CEFT, ceftriaxona; CIP, ciprofloxacina; ERT, ertapenem; GEN, gentamicina; IMI, imipenem; LEV, levofloxacina; MER, meropenem; PIPT, piperacilina-tazobactam; TOB, tobramicina; TRIS, trimetoprim-sulfametaxazol; sens, sensível; int, resistência intermediária

Tabela 4. Caracterização das amostras de *Enterobacter aerogenes* quanto à fonte de isolamento primário (colonização ou infecção) e genes de beta-lactamases.

ISOLADO	Fonte de isolamento primário	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{VIM}	<i>bla</i> _{IMP}	<i>bla</i> _{SPM}	<i>bla</i> _{GES}	<i>bla</i> _{KPC}
Ea1A	SWAB NASAL	-	+	-	-	-	-	-	+
Ea2A	SWAB RETAL	-	+	-	-	-	-	-	+
Ea3A	SWAB RETAL	-	-	-	-	-	-	-	+
Ea4A	SWAB RETAL	-	-	-	-	-	-	-	+
Ea5A	SWAB RETAL	-	+	-	-	-	-	-	+
Ea6A	SWAB RETAL	-	+	-	-	-	-	-	+
Ea7A	SANGUE	-	-	-	-	-	-	-	+
Ea8A	SWAB RETAL	-	+	-	-	-	-	-	+
Ea9A	SWAB RETAL	-	+	-	-	-	-	-	-
Ea10A	URINA	-	-	-	-	-	-	-	+
Ea11A	URINA	-	+	-	-	-	-	-	+
Ea12A	PONTA DE CATÉTER	-	+	-	-	-	-	-	+
Ea13A	SWAB RETAL	-	-	-	-	-	-	-	+
Ea14A	SWAB RETAL	-	+	-	-	-	-	-	+
Ea15A	SECREÇÃO TRAQUEAL	-	+	-	-	-	-	-	+
Ea16A	SWAB RETAL	-	+	-	-	-	-	-	+
Ea17A	SWAB RETAL	-	+	-	-	-	-	-	+
Ea18A	SANGUE	-	-	-	-	-	-	-	+
Ea19A	SECREÇÃO TRAQUEAL	-	-	-	-	-	-	-	+
Ea20A	SWAB RETAL	-	-	-	-	-	-	-	+
Ea21A	URINA	-	-	+	-	-	-	-	-
Ea22A	SWAB RETAL	-	+	+	-	-	-	-	-
Ea23A	SWAB RETAL	-	-	-	-	-	-	-	+
Ea24A	SWAB RETAL	-	+	-	-	-	-	-	+
Ea25A	URINA	-	-	+	-	-	-	-	-
Ea26A	URINA	-	+	+	-	-	-	-	+
Ea27A	SANGUE	-	+	-	-	-	-	-	+
Ea28A	SANGUE	-	-	-	-	-	-	-	+
Ea29A	SWAB RETAL	-	-	-	-	-	-	-	+
Ea30A	LÍQUIDO ASCÍTICO	-	-	-	-	-	-	-	+
Ea31A	SWAB RETAL	-	+	-	-	-	-	-	+
Ea32A	SANGUE	-	-	-	-	-	-	-	+
Ea33A	SANGUE	-	-	-	-	-	-	-	+
Ea34A	SANGUE	-	-	-	-	-	-	-	+

Ea, *Enterobacter aerogenes*; +, presença do gene; -, ausência do gene

Tabela 5. Caracterização das amostras de *Enterobacter cloacae* quanto à fonte de isolamento primário (colonização ou infecção) e genes de beta-lactamases.

ISOLADO	Fonte de isolamento primário	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{VIM}	<i>bla</i> _{IMP}	<i>bla</i> _{SPM}	<i>bla</i> _{GES}	<i>bla</i> _{KPC}
Ec1A	SECREÇÃO OCULAR	-	-	+	-	-	-	-	-
Ec2A	SECREÇÃO OCULAR	-	+	+	-	-	-	-	+
Ec3A	SECREÇÃO OCULAR	-	+	+	-	-	-	-	+
Ec4A	SECREÇÃO OCULAR	-	+	+	-	-	-	-	-
Ec5A	SANGUE	-	+	+	-	-	-	-	-
Ec6A	SWAB RETAL	-	+	+	-	-	-	-	-
Ec7A	SANGUE	-	+	+	-	-	-	-	-
Ec8A	SANGUE	-	+	+	-	-	-	-	-
Ec9A	SWAB RETAL	-	+	+	-	-	-	-	-
Ec10A	SWAB RETAL	-	+	+	-	-	-	-	-
Ec11A	LCR	-	+	+	-	-	-	-	-
Ec12A	SANGUE	-	+	+	-	-	-	-	-
Ec13A	SANGUE	-	+	+	-	-	-	-	-
Ec14A	SANGUE	-	+	+	-	-	-	-	-
Ec15A	SANGUE	-	+	+	-	-	-	-	-
Ec16A	SANGUE	-	+	+	-	-	-	-	-
Ec17A	SANGUE	-	+	+	-	-	-	-	+

Ec, *Enterobacter cloacae*; +, presença do gene; -, ausência do gene; LCR, líquido cefalo-raquidiano

Referências

Anastay M, Lagier E, Blanc V, Chardon H. Epidémiologie des beta-lactamases à spectre étendu (BLSE) chez les entérobactéries dans un hôpital Du sud de la France, 1997-2007. **Pathologie Biologie**, v.61, p.38-43, 2013.

Andrade LN, Curiao T, Ferreira JC, Longo JM, Clímaco EC, Martinez R, Bellissimo-Rodrigues F, Basile-Filho A, Evaristo MA, Del Peloso PF, Ribeiro VB, Barth AL, Paula MC, Baquero F, Cantón R, Darini AL, Coque TM. 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 (7), p. 3579-3583, 2011.

Bosi C, davin-regli A, Bornet C, Mallea M, Pages J-M, Bollet C. Most *Enterobacter aerogenes* Strains in France Belong to a Prevalent Clone. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37(7), p. 2165–2169, 1999.

Bush K, Jacoby GA. Updated Functional Classification of β -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.54, p.969-976, 2010.

Cabral AB, Melo RCA, Maciel MAV, Lopes ACS. Multidrug resistance genes, including *bla*_{KPC} and *bla*_{CTX-M-2}, among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45(5), p.572-578, 2012.

Cabral AB, Maciel MAV, Barros JF, Antunes MM, Lopes ACS. Detection of *bla*_{KPC-2} in *Proteus mirabilis* in Brazil, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.48(1), p.94-95, 2015.

Calfee D, Jenkins SG. Use of active surveillance cultures to detect asymptomatic colonization with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in intensive care unit patients. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v.29, p.966-968, 2008.

Cantón R, Oliver A, Coque TM, Varela MC, Pérez-Díaz JC, Baquero F. Epidemiology of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Enterobacter* Isolates in a Spanish Hospital during a 12-Year Period. **Journal of clinical microbiology**, v. 40 (4), p. 1237–1243, 2002.

Cantón R, González-Alba JM, Galán JC. CTX-M enzymes: origin and diffusion. **Frontiers in Microbiology**, v.3, p.110, 2012.

Carattoli A. Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.53. p.2227-2238, 2009.

CDC, Center for diseases control and prevention, Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR): Detection of Enterobacteriaceae Isolates Carrying Metallo-Beta-Lactamase, United States, v. 59(24), p.750, 2010.

Chagas TP, Alves RM, Vallim DC, Seki LM, Campos LC, Asensi MD. Diversity of genotypes in CTX-M-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in different hospitals in Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.15, p.420-425, 2011.

Chang CL, Su LH, Lu CM, Tai FT, Huang YC, Chang KK. Outbreak of ertapenem-resistant *Enterobacter cloacae* urinary tract infections due to a contaminated ureterscope. **Journal of Hospital Infection**, v.85(2), p.118-124, 2013.

Davin-Regli A, Pagès J-M. *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. **Frontiers in Microbiology**, v.6, p.392, 2015.

de Cássia Andrade Melo R , de Barros EM, Loureiro NG, de Melo HR, Maciel MA, Souza Lopes AC. Presence of fimH, mrkD, and irp2 virulence genes in KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Recife-PE, Brazil. **Current Microbiology**, v.69(6), p.824-831, 2014.

Dong F, Xu Xi-wei, Song Wen-qi, Lü Ping, Yu Sang-jie, Yang Yong-hong, Shen Xu-zhuang. Characterization of multidrug-resistant and metallo-betalactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a paediatric clinic in China. **Chinese Medical Journal**, v.121, p.1611-1616, 2008.

Dropa M, Balsalobre LC, Lincopan N, Mamizuka EM, Cassettari VC, Matté GR, Matté MH. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carrying the novel extended-spectrum β -lactamase gene variants *bla*_{SHV-40}, *bla*_{TEM-116} and the class 1 integron-associated *bla*_{GES-7} in Brazil. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16(6), p. 630-632, 2010.

Duan H, Chai T, Liu J, Zhang X, Qi C, Gao J, Wang Y, Cai Y, Miao Z, Yao M, Schlenker G. Source identification of airborne *Escherichia coli* of swine house surroundings using ERIC-PCR and REP-PCR. **Environmental Research**, v.109, p.511-517, 2009.

Gales AC, Menezes LC, Silbert S, Sader HS. Dissemination in distinct Brazilian

regions of an epidemic carbapenêmicos-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- β -lactamase. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.52, p.699-702, 2003.

Gales AC, Castanheira M, Jones RN, Sader HS. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v.73, p.354-360, 2012.

Gonçalves CR, Vaz TMI, Leite D, Pisani B, Simões M, Prandi MAM, Rocha MMM, Cesar PC, Trabasso P, Nowakonski AV, Irino K. Molecular epidemiology of a nosocomial outbreak due to *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter agglomerans* in Campinas, São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 42 (1), p. 1-7, 2000.

Hammami S, Boutiba-BenBoubaker I, Saidani M, Lakhal E, BenHassen A, Kamoun A, Ghozzi R, Slim A, Ben Redjeb S. Characterization and molecular epidemiology of extended spectrum beta-lactamase producing *Enterobacter cloacae* isolated from a Tunisian hospital. **Microbial Drug Resistance**, v.18, p.59-65, 2012.

Hayden MK, Lin MY, Lolans K, Weiner S, Blom D, Moore NM, Fogg L, Henry D, Lyles R, Thurlow C, Sikka M, Hines D, Weinstein RA. Prevention of colonization and infection by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing enterobacteriaceae in long-term acute-care hospitals. **Clinical Infectious Diseases**, v.60(8), p.1153-1161, 2015.

Jaskulski MR, Medeiros BC, Borges JV, Zalewsky R, Fonseca MEC, Marinowicz DR, Rocha MP, Nodari P, Machado DC. Assessment of extended-spectrum β -lactamase, KPC carbapenemase and porin resistance mechanisms in clinical samples of *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter* spp. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.42, p. 76-79, 2013.

Lago A, Fuentefria SR, Fuentefria DB. Enterobactérias produtoras de ESBL em Passo Fundo, Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43 (4), p.430-434, 2010.

Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? **Clinical Infectious Diseases**, v.34, p.634-640, 2002.

Lee CC, Lee NY, Yan JJ, Lee HC, Chen PL, Chang CM, Wu CJ, Ko NY, Wang LR, Chi CH, Ko, WC. Bacteremia due to Extended-Spectrum- β -Lactamase-producing *Enterobacter cloacae*: Role of Carbapenem Therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54 (9), p. 3551-3556, 2010.

Lopes ACS, Veras DL, Lima AMS, Melo RCA, Ayala J. *bla*_{CTX-M-2} and *bla*_{CTX-M-28} extended-spectrum β -lactamase genes and class 1 integrons in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.105, p.163-167, 2010.

Minarini LA, Clímaco EC, Guimarães DB, Ferreira JC, Palazzo IC, Martinez R, Darini AL. Clonal transmission of ESBL-producing *Klebsiella* spp. at a university hospital in Brazil. **Current Microbiology**, v.56, p.587-591, 2008.

Monteiro J, Santos AF, Asensi MD, Peirano G, Gales AC. First Report of KPC-2-

producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.53, p.333-334, 2009.

Nogueira KD, Paganini MC, Conte A, Cogo LL, Taborda de Messias Reason I, da Silva MJ, Dalla-Costa LM. Emergence of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacter* spp. in patients with bacteremia in a tertiary hospital in southern Brazil. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v.32(2), p.87-92, 2014.

Nogueira KS, Conte D, Maia FV, Dalla-Costa LM. Distribution of extended-spectrum β -lactamase types in a Brazilian tertiary hospital. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.48(2), p.162-169, 2015.

Ochman H, Lawrence JG, Groisman EA. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. **Nature**, v.405, p.299-304, 2000.

Oren I, Sprecher H, Finkelstein R, Hadad S, Neuberger A, Hussein K, Raz-Pasteur A, Lavi N, Saad E, Henig I, Horowitz N, Avivi I, Benyamini N, Fineman R, Ofra Y, Haddad N, Rowe JM, Zuckerman T. Eradication of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae gastrointestinal colonization with nonabsorbable oral antibiotic treatment: A prospective controlled trial. **American Journal of Infection Control**, v.41(12), p.1167-1172, 2013.

Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. **Clinical Microbiology Reviews**, v.18, p.657-686, 2005.

Peleg AY, Franklin C, Bell JM, Spelman DW. Dissemination of the metallo- β -lactamases Gene *bla*IMP-4 among Gram-negative pathogens in a clinical setting in Australia. **Clinical Infectious Diseases**, v.41, p.1549-1556, 2005.

Pereira PS, Araujo CFM, Seki LM, Zahner V, Carvalho-Assef AP, Asensi MD. Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: spread of clonal complex 11(ST11, ST437 and ST340). **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, v.68, p.312-316, 2013.

Poirel L, Pitout JD, Nordmann P. Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. **Future Microbiology**, v.2, p.501-512, 2007.

Pestourie N, Garnier F, Barraud O, Bedu A, Ploy MC, Mounier M. Outbreak of AmpC β -lactamase-hyper-producing *Enterobacter cloacae* in a neonatal intensive care unit in a French teaching hospital. **American Journal of Infection Control**, v.42, p.456-458, 2014.

Quiles MG, Rocchetti TT, Fehlberg LC, Kusano EJ, Chebabo A, Pereira RM, Gales AC, Pignatari AC. Unusual association of NDM-1 with KPC-2 and *armA* among Brazilian Enterobacteriaceae isolates. **Brazilian Journal of Medical and Biology Research**, v.48(2), p.174-177, 2015.

Ramos PIP, Picão RC, de Almeida LGP1, Lima NCB, Girardello R, Vivan ACP, Xavier DE, Barcellos FG, Pelisson M, Vespero EC, Médigue C, de Vasconcelos ATR, Gales AC, Nicolás MF. Comparative analysis of the complete genome of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* Kp13 reveals remarkable genome plasticity and a wide repertoire of virulence and resistance mechanisms. **BMC Genomics**, v.15, p.54, 2014.

Rasheed JK, Anderson GJ, Yigit H, Quennan AM, Doménech-Sánchez A, Swenson JM, Biddle JW, Ferraro MJ, Jacoby GA, Tenover FC. Characterization of the Extended-Spectrum β -lactamase Reference strain, *Klebsiella pneumoniae* K6 (ATCC 700603), which produces the novel enzyme SHV-18. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.44, p.2382-2388, 2000.

Ribeiro VB, Andrade LN, Linhares AR, Barin J, Darini ALC, Zavascki AP, Barth AL. Molecular characterization of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing isolates in southern Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, p.1721-1727, 2013.

Saladin M, Bao Cao VT, Lambert T, Donay J, Herrmann J, Ould-Hocine Z, Verdet C, Delisle F, Philippon A, Arlet G. Diversity of CTX-M β -lactamases and their promoter regions from *Enterobacteriaceae* isolated in three Parisian hospitals. **FEMS Microbiology Letters**, v.209, p.161-168, 2002.

Seki LM, Pereira PS, De Souza MPAH, Conceição Mde S, Marques EA, Porto CO, Colnago EM, Alves Cde F, Gomes D, Assef AP, Samuelsen O, Asensi MD. Molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Brazil: the predominance of sequence type 437. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v.70, p.274-277, 2011.

Seki LM, Pereira PS, Conceição MS, Souza MJ, Marques EA, Carballido JM, de Carvalho MES, Assef APDC, Asensi MD. Molecular epidemiology of CTX-M producing *Enterobacteriaceae* isolated from bloodstream infections in Rio de Janeiro, Brazil: emergence of CTX-M-15. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.17(6), p.640-646, 2013.

Siegel JD, Rhinehart E, Jackson M, Chiarello L, HICPAC. Management of Multidrug-Resistant Organisms in Healthcare Settings 2006. **American Journal of Infection Control**, v.35(10 Suppl 2), p.165-193, 2007.

Schechner V, Kotlovsky T, Kasma M, Mishali H, Schwartz D, Navon-Venezia S, Schwaber MJ, Carmeli Y. Asymptomatic rectal carriage of blaKPC producing carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: who is prone to become clinically infected? **Clinical Microbiology and Infection**, v.19, p. 451-456, 2013.

Stoesser N, Sheppard AE, Shakya M, Sthapit B, Thorson S, Giess A, Kelly D, Pollard AJ, Peto TEA, Walker AS, Crook DW. Dynamics of MDR *Enterobacter cloacae* outbreaks in a neonatal unit in Nepal: insights using wider sampling frames and next-generation sequencing. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.70, p.1008-1015, 2015.

Tavares CP, Pereira PS, de Andrade Marques E, Faria Jr. C, de Souza MPAH, de Almeida R, Alves CFM, Asensi MD, D'Alincourt Carvalho-Assef AP. Molecular epidemiology of KPC-2-producing *Enterobacteriaceae* (non-*Klebsiella pneumoniae*) isolated from Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.82, p.326-330, 2015.

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

Tristram SG, Hawes R, Souprounov J. Variation in selected regions of blaTEM genes

and promoters in *Haemophilus influenzae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.56, p.481-484, 2005.

Tuon FF, Scharf C, Rocha JL, Cieslinsk J, Becker GN, Arend LN. KPC-producing *Enterobacter aerogenes* infection. **The Brazilian Journal of Infectious diseases**, v.19(3), p. 324-327, 2015.

Tzouvelekis LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, Tassios PT, Daikos GL. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. **Clinical Microbiology Reviews**, v.25, p.682-707, 2012.

Wang C , Cai1 P, Chang D, Mi Z. A *Pseudomonas aeruginosa* isolate producing the GES-5 extended-spectrum b-lactamase. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v: 57(6), p. 1261-1262, 2006.

Yang D, Guo Y, Zhang Z. Combined porin loss and extended spectrum beta-lactamase production is associated with an increasing imipenem minimal inhibitory concentration in clinical *Klebsiella pneumoniae* strains. **Current Microbiology**, v.58, p.366-370, 2009.

Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, Alberti S, Bush K, Tenover FC. Novel Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, p.1151-1161, 2001.

Zavascki AP, Machado AB, de Oliveira KR, Superti SV, Pilger DA, Cantarelli VV, Pereira PR, Lieberknecht AC, Barth AL. KPC-2-producing *Enterobacter cloacae* in two cities from Southern Brazil. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 34(3), p. 286-288, 2009.

5.2. Análise genômica de isolados de *Enterobacter aerogenes* *bla*_{KPC-2} positivos provenientes de colonização e infecção em pacientes de UTI: diversidade de genes de resistência e de virulência (Artigo 2)

Introdução

Ao longo da última década, *Enterobacter aerogenes* tornou-se um importante patógeno multidroga resistente (MDR) e responsável por infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), incluindo infecções respiratórias e do trato urinário, septicemia e meningite (LEE *et al.*, 2010; DIENE *et al.*, 2012; DAVIN-REGLI, 2015). Para infecções causadas por *E. aerogenes* produtores de beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs), é recomendado o uso de carbapenêmicos, porém o uso aumentado destes antibióticos levou ao desenvolvimento de resistência, com destaque para enzimas *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) (TUON *et al.*, 2015). Schechner *et al.* (2013), alertam para a importância das culturas de vigilância na redução da disseminação desses micro-organismos em ambientes hospitalares. A importância de pacientes colonizados reside principalmente em serem potenciais fontes de transmissão em ambientes de saúde (CALFEE; JENKINS, 2008). Consequentemente, vigilância microbiológica ativa, assim como, epidemiologia molecular são importantes para o controle de infecções (JUHÁSZ *et al.*, 2012).

Os fatores de virulência são importantes para a colonização e estabelecimento da infecção. Para o sucesso da colonização e proteção contra os sistemas de defesa do hospedeiro, se destacam a presença de cápsula e fatores relacionados à formação do biofilme (TAGHAVI *et al.*, 2015). A fixação de enterobactérias às células do hospedeiro é mediada por diferentes tipos de fímbrias. *Enterobacter* spp. é conhecido por produzir fímbrias tipo 1 e tipo 3 (LIU *et al.*, 2013). Outro fator de virulência que atua para o sucesso da infecção é a presença de sideróforos que contribuem para a capacidade do micro-organismo sobreviver no tecido do hospedeiro, por permitir a captação do ferro geralmente complexado com moléculas portadoras (hemoglobina, lactoferrina e transferrina) uma vez que há reduzida disponibilidade de ferro livre no corpo humano (BULLEN *et al.*, 2005).

Enquanto a membrana externa proporciona uma barreira natural e atua em conjunto com bombas multidrogas para proteger a célula gram-negativa de agentes prejudiciais (detergentes, desinfetantes, corantes, antibióticos e toxinas), também representa um desafio no que diz respeito à absorção de nutrientes e a excreção de subprodutos. Para este efeito, a membrana externa foi equipada com diferentes vias para o transporte seletivo de moléculas

para dentro e para fora da célula: sistemas de efluxo (relacionados à resistência) e sistemas de secreção (relacionados à virulência) (SANDKVIST, 2001).

A aquisição horizontal de genes através de elementos móveis como plasmídeos, transposon, integron e fagos pode resultar em muitos repertórios genômicos diferentes (mobiloma), que podem produzir fenótipos alternativos ou atípicos melhor adaptados ao seu ambiente. *E. aerogenes* tem máquinas de tradução desenvolvidas com capacidade superior para traduzir sequências exógenas, além de ser mais propenso a captar estas sequências de várias fontes ecológicas e disseminá-las, permitindo altos níveis de mosaicismo e consequentemente, a criação de novos repertórios genômicos. Isso explica a plasticidade apresentada por essa espécie bacteriana (DIENE *et al.*, 2013).

O advento da era pós-genômica tem permitido um melhor entendimento sobre as espécies bacterianas. *E. aerogenes* têm sido sequenciado genomicamente em alguns estudos. Shin *et al.* (2012), foram responsáveis pelo primeiro sequenciamento genômico de uma cepa de *E. aerogenes* (KCTC 2190), da mesma forma, Eevers *et al.* (2015), abordaram superficialmente o genoma desta espécie. Ambos os autores evidenciaram genes relacionados ao potencial bioindustrial de *E. aerogenes*. Shin *et al.* (2012), também exploraram características da cepa KCTC 2190 renomeada posteriormente como a cepa de referência para *E. aerogenes* ATCC 13048. Em relação a sequenciamento genômico de *E. aerogenes* patogênico para seres humanos, Diene *et al.* (2012), analisaram a relação genética de *E. aerogenes* e outras enterobactérias.

Diante de escassos relatos na literatura, o sequenciamento genômico das cepas Ea5a e Ea7A MDR, *bla*_{KPC-2} positivas, provenientes de colonização e de infecção de pacientes de UTI permitirá um melhor conhecimento desse patógeno. Adicionalmente, a análise comparativa entre os isolados em estudo e as cepas anteriormente sequenciadas permitirá uma maior compreensão das similaridades e particularidades apresentada pela espécie.

Materiais e métodos

Isolados bacterianos

Foram analisados nesse estudo, dois isolados de *E. aerogenes* MDR (Ea5A e Ea7A) *bla*_{KPC} positivos, com mesmo perfil de resistência, exceto em relação à amicacina (Ea5A apresentou resistência intermediária, enquanto Ea7A mostrou sensibilidade a este antimicrobiano), sendo um recuperado de colonização (Ea5A, swab retal) e o outro recuperado de infecção (bacteremia) (Ea7A, sangue) ambos coletados em 14 de novembro de 2011, provenientes de

pacientes distintos internados em Unidade de terapia intensiva (UTI) de um hospital público de Recife-PE, Brasil. A identificação bioquímica e perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados foram realizados utilizando o equipamento automatizado BD PhoenixTM (Franklin Lakes, New Jersey, USA). Os isolados foram mantidos em estoque congelado à -20°C com glicerol a 15%.

Extração de DNA e ERIC-PCR

O DNA foi extraído utilizando o Kit Wizard genomic DNA purification kit (Promega). O DNA foi quantificado através do equipamento Nano Drop. O perfil de ERIC-PCR foi obtido através de amplificação por PCR conforme primers de Duan *et al.* (2009) e metodologia de Cabral *et al.* (2012). O produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose à 1,5% (ERIC-PCR), em seguida fotografado. A análise do padrão de bandas geradas pela ERIC-PCR foi analisada utilizando o software DARVIN 5.0.

Sequenciamento genômico

Com o DNA extraído, foram montadas as bibliotecas de DNA utilizando o kit TruSeq DNA PCR Free Kit da (Illumina). As bibliotecas foram quantificadas utilizando o kit da Kappa Biosystems, segundo recomendação do fabricante e o sequenciamento genômico foi realizado utilizando o equipamento MiSeq (Illumina). Extremidades de 300pb foram sequenciadas para o amplicon de 1100pb de comprimento.

Ferramentas de análise in silico utilizadas

Foram utilizadas diversas ferramentas gratuitas para as análises dos fragmentos gerados. Para a análise da qualidade do sequenciamento: fastqc (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>), para remoção de interferentes: Trimmomatic (<http://www.usadellab.org/cms/index.php?page=trimmomatic>), para montagem de contigs: Velvet (ZERBINO; BIRNEY, 2008), para alinhamento e ordenamento dos contigs a sequências de referência para cromossomo e plasmídeos: blastall (ALTSCHUL *et al.*, 1990) e Mauve (DARLING *et al.*, 2011), para predição e anotação gênica: RASTtk (<http://rast.nmpdr.org/>) e Resfinder-beta-lactamases (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>) e para comparação entre os genomas: Orthomcl (LI; STOECKERT; ROOS, 2003) e MySQL (<https://www.mysql.com/>).

Pesquisa dos grupos de incompatibilidade (inc)

Os grupos de incompatibilidade presentes nos isolados foram pesquisados alinhando as sequências dos primers descritos por Carattoli *et al.* (2005), contra o DNA plasmidial e cromossômico através da ferramenta blastall. Alinhamento de 100% das sequências forward e reverse implica dizer que o isolado contém a sequência compreendida entre ambos os primers, ou seja, o grupo de inc pesquisado.

Genomas para análises comparativas:

O GenBank atualmente disponibiliza para downloads dois genomas completos de *E. aerogenes*: KCTC 2190 (posterior ATCC 13048) e *E. aerogenes* EA1509E que foram utilizados para realizar uma análise comparativa com os isolados do estudo. Características genômicas das cepas KCTC 2190 e EA1509E utilizadas para as análises comparativas são descritas na tabela 1.

Resultados

Relação clonal pela ERIC-PCR

Os isolados Ea5A e Ea7A apresentaram relação clonal através da técnica ERIC-PCR, mostrando 100% de similaridade.

Montagem dos contigs:

Considerando Ea5A, foram obtidos um total de 219 contigs, destes 18 foram considerados contigs plasmidiais, o que permitiu a identificação dos plasmídeos: Ea5A_pA (contig: NODE_55_length_72212_cov_88.949898) semelhante ao plasmídeo de referência NZ_CP010365.1 e Ea5A_pB (contig: NODE_111_length_5386_cov_207.211105) semelhante ao plasmídeo de referência NZ_AUPS01000027.1, com os demais contigs (16) não foi possível montar outros plasmídeos. A partir de 201 contigs cromossômicos foi montado um cromossomo de 5.571.633pb baseando-se na referência NC_20181 (Tabela 1).

Considerando Ea7A, foram obtidos um total de 142 contigs, destes 20 foram considerados contigs plasmidiais, o que permitiu a identificação dos mesmos plasmídeos Ea7A_pA (contig: NODE_11_length_72344_cov_28.546349) semelhante ao plasmídeo de referência NZ_CP010365.1 e Ea7A_pB (contig: NODE_57_length_5386_cov_92.687149) semelhante ao plasmídeo de referência NZ_AUPS01000027.1, com os demais contigs (18) não foi possível montar outros plasmídeos. A partir de 122 contigs cromossômicos foi montado um

cromossomo de 5.423.282pb baseando-se na referência NC_20181 (Tabela 1).

Identificação dos genes:

Através da ferramenta **RASTtk**, no DNA cromossômico e plasmidial foram identificadas sequências codificantes (CDS) com funções preditas ou hipotéticas, rRNA e tRNA, descritos na tabela 1.

Pesquisa de grupos de incompatibilidade plasmidial (inc)

De todos os grupos inc pesquisados, foram detectados genes inc dos tipos L/M e A/C no DNA plasmidial de ambos os isolados (Tabela 1). Não houve alinhamento dos primers testados com o DNA cromossômico, confirmando a ausência de plasmídeos identificados pelo inc, integrados ao cromossomo bacteriano.

Genes de resistência a beta-lactâmicos: beta-lactamases

Considerando DNA cromossômico e plasmidial, foram anotados genericamente doze genes de beta-lactamases em ambos os isolados, utilizando o Rast. Através das anotações mais acuradas utilizando o Resfinder-beta-lactamases, foram detectados: *bla*_{TEM-1} e *bla*_{KPC-2} com 100% de similaridade a sequências desses genes depositadas anteriormente (Tabela 2).

Outros genes de resistência

Em ambos os isolados, considerando DNA cromossômico e plasmidial foram detectados genes de resistência a aminoglicosídeos [*acc(3)-III*, *rmt*, *ant(9)*, *tmrB*, *ant(9)*], cloranfenicol (*cat*), sulfonamida (*sulII*), trimetoprim (*dhfr*), macrolídeos (*macA*, *macB*), fosfomicina (*fosA*), polimixina (*pmr*, *arn*) e sulfonamida (*sulIII*) (Tabela 2).

Sistema de efluxo a multidrogas

Considerando o DNA cromossômico de ambos os isolados, foram detectados os genes relacionados aos sistemas de efluxo de multidrogas de diferentes famílias: “Resistance Nodulation-cell division (RND)”, “Adenosine triphosphate-binding cassette superfamily (ABC)”, “Major Facilitator superfamily (MFS)”, “Multidrug and toxic compound extrusion family (MATE)” e “Drug/metabolite transporter superfamily (DMT)” (Tabela 2). Não houve detecção desses genes no DNA plasmidial.

Genes de virulência (fímbrias, sideróforos, biofilme, cápsula)

Em ambos os isolados, no DNA cromossômico foram detectados (a) genes relacionados a sideróforos (30), (b) genes relacionados a fímbrias (58), (c) genes relacionados a síntese, modificação, transporte, regulação do biofilme e matriz extracelular (14), e (d) genes relacionados à biossíntese, regulação e transporte do ácido colônico capsular (9). Os genes específicos detectados estão descritos na tabela 2. Nenhum dos genes foi detectado no DNA plasmidial.

Sistemas de secreção (SST)

Considerando DNA cromossômico de ambos os isolados, houve detecção de sistema de secreção tipo 4 (SST4), SST1 e SST6 (Tabela 2). Nenhum dos genes foi detectado no DNA plasmidial.

Ambiente genético de *bla*_{TEM-1}

Analisando o ambiente genético do *bla*_{TEM-1}, percebe-se que adjacente a esse gene há a presença de genes que codificam elementos móveis, merece destacar também a presença de *acc(3)*-III que confere resistência aos aminoglicosídeos, imediatamente após o gene *bla*_{TEM-1} em ambos os isolados (figura 1).

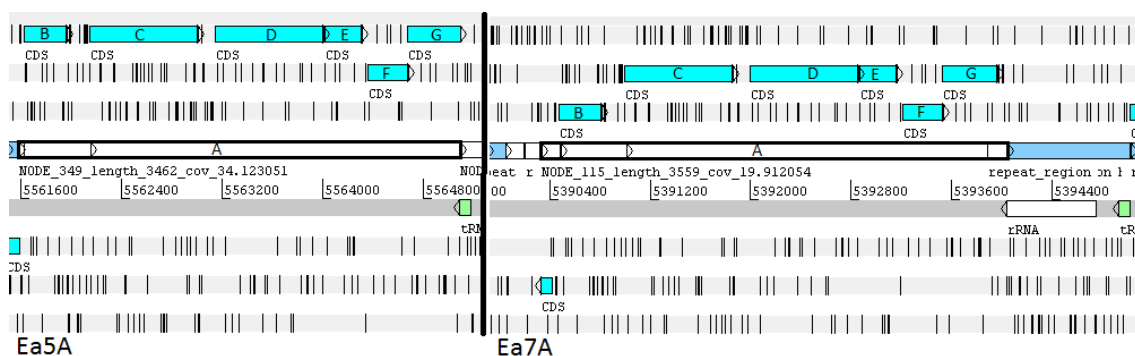


Figura 1. Ambiente genético de *bla*_{TEM-1} nos isolados de *E. aerogenes* Ea5A e Ea7A. Os contigs que albergam os genes estão representados por A, o gene *bla*_{TEM-1} por C, o início e fim do contig: (B e G) correspondem a elementos móveis. (D) corresponde ao gene de resistência a aminoglicosídeos, (E) *tmrB* que resulta em resistência a tunicamicina e (F) representa uma proteína hipotética.

Ambiente genético de *bla*_{KPC-2}

Em relação ao ambiente genético do gene *bla*_{KPC-2} detectado em Ea5A, podemos observar que o gene para essa beta-lactamase juntamente com um gene que codifica uma transposase

compõem o contig node_2 (figura 2). Anteriormente a este contig, tem-se o contig node_401 que possui diversos genes que codificam proteínas de elemento móvel, além de proteína de inversão/recombinação/integração ao DNA, resolvase e transposase. O isolado Ea7A apresentou elemento móvel semelhante anterior e posterior ao gene *bla*_{KPC-2} compondo o contig node_2 (figura 3).

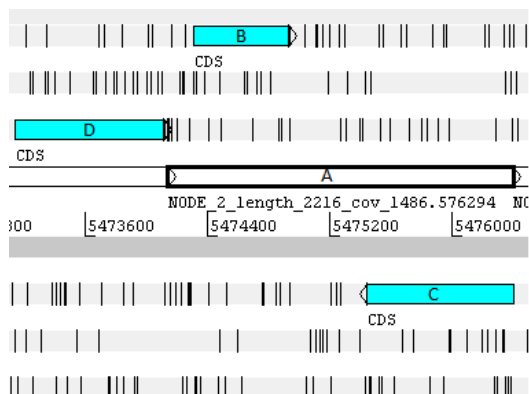


Figura 2. Ambiente genético do gene *bla*_{KPC-2} no isolado de *E. aerogenes* Ea5A. O contig node_2 (A): é composto pelo gene *bla*_{KPC-2} (B) mais transposase (C). D corresponde a um elemento móvel no contig anterior ao gene node_401.

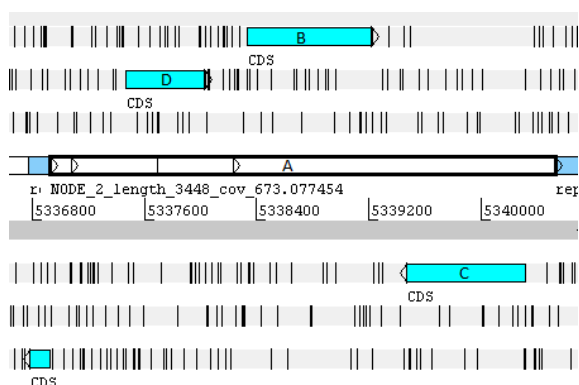


Figura 3. Ambiente genético do gene *bla*_{KPC-2} no isolado de *E. aerogenes* Ea7A. Todos os elementos genéticos *bla*_{KPC-2} (B), transposase (C) e elemento móvel (D) estão presentes no mesmo contig node_2 (A).

Análises comparativas entre os dois isolados (Ea5A e Ea7A), a nível de grandes blocos colinérgicos (LCB)

A análise de sintenia entre os genomas dos isolados Ea5A e Ea7A que foi realizada utilizando o programa Mauve está representada na figura 4.

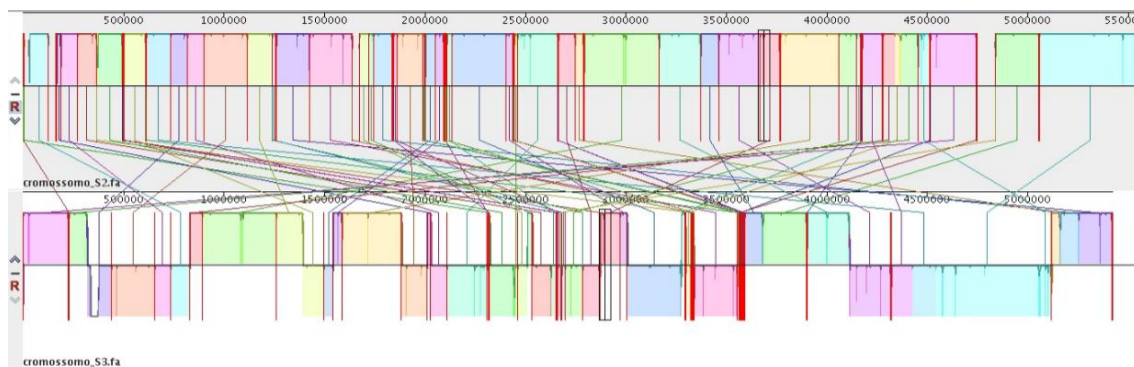


Figura 4. Alinhamento genômico dos isolados de *E. aerogenes* Ea5A e Ea7A. Mauve alinhou as sequências genômicas de Ea5A (cromossomo_S2) e Ea7A (cromossomo_S3). LCB com a mesma cor representam regiões homólogas de sequência, sem rearranjos e compartilhados entre os genomas.

Análises comparativas entre os dois isolados (Ea5A e Ea7A), a nível de genes

Características dos isolados Ea5A e Ea7A quanto a genes de resistência a antimicrobianos, genes de virulência, sistemas de efluxo e sistemas de secreção estão descritos na tabela 2.

Análises comparativas entre os dois isolados (Ea5A e Ea7A), a nível de nucleotídeos

O alinhamento das sequências nucleotídicas das beta-lactamases *bla*_{TEM-1} e *bla*_{KPC-2} permitiu a detecção de uma inserção de uma timina na posição 519 no gene *bla*_{KPC-2} do isolado de colonização Ea5A. Esta inserção foi confirmada ao alinhar esta sequência com a sequência de referência para *bla*_{KPC-2} (AY034847) (Figura 5). Nenhuma mutação, inserção ou deleção foram detectadas nas sequências de *bla*_{TEM-1}.

```

Query  421  TTGGGCGGCCCGGCCGGCTGACGGCCTTCATGCGCTCTATCGGCGATACCACGTTCCGT  480
      |||
Sbjct  426  TTGGGCGGCCCGGCCGGCTGACGGCCTTCATGCGCTCTATCGGCGATACCACGTTCCGT  485

Query  481  CTGGACCGCTGGGAGCTGGAGCTGAACTCCGCAATTCAGGGCGATGCGCGGATACCTC  540
      |||
Sbjct  486  CTGGACCGCTGGGAGCTGGAGCTGAACTCCGCAATTCAGGGCGATGCGCGGATACCTC  544

Query  541  ATCGCCGCGCGCCGTGACGGAAAGCTTACAAAACTGACACTGGGCTCTGCACTGGCTGC  600
      |||
Sbjct  545  ATCGCCGCGCGCCGTGACGGAAAGCTTACAAAACTGACACTGGGCTCTGCACTGGCTGC  604

```

Figura 5. Alinhamento da sequência *bla*_{KPC-2} de Ea5A (Query) com a sequência de referência para *bla*_{KPC-2} (AY034847) (Subject), evidenciando a inserção de uma Timina na posição 519.

Análises comparativas entre os dois isolados de *E. aerogenes* desse estudo (Ea5A e Ea7A) e as cepas de *E. aerogenes* depositadas anteriormente no GenBank (KCTC 2190 e EA1509E)

As características genômicas das cepas Ea5A, Ea7A, KCTC 2190 e EA1509E utilizadas para as análises comparativas estão apresentadas na tabela 1.

A quantidade de proteínas exclusivas dos genomas de Ea5A, Ea7A, KCTC 2190 e

Ea1509E foram 448, 110, 246 e 423, respectivamente (figura 6), por outro lado, 3875 proteínas foram compartilhadas pelos genomas das 4 bactérias. Considerando o DNA plasmidial, Ea5A apresentou 145 proteínas exclusivas versus 144 de Ea7A. Proteínas exclusivas relacionadas à resistência, virulência, sistemas de efluxo e sistemas de secreção dos isolados Ea5A e Ea7A no DNA cromossômico e plasmidial estão descritas na tabela 3.

Foi possível verificar ortólogos/parálogos (correspondentes a beta-lactamases) exclusivos ou compartilhados pelas cepas comparadas (Tabela 4), independente da anotação genérica obtida através do rast.

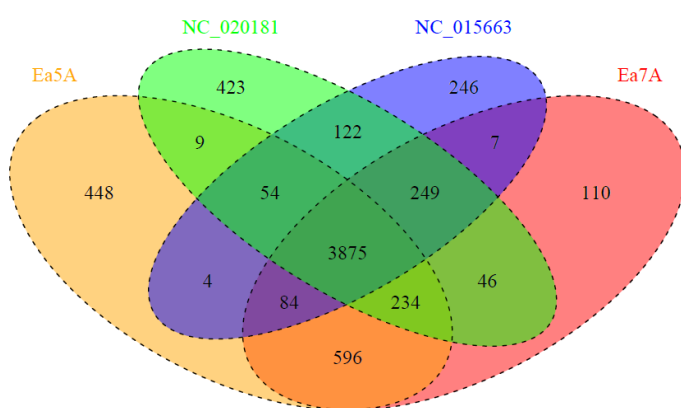


Figura 6. Comparação do DNA cromossômico das 4 cepas de *E. aerogenes* através do diagrama de Venn. O diagrama de Venn mostra o DNA cromossômico de Ea5A, Ea7A, KCTC 2190 (NC_015663) e EA1509E (NC_020181) gerado através do EDGAR (BLOM *et al.*, 2009). Regiões sobrepostas representam sequências codificantes comuns compartilhadas entre os genomas. Número fora das regiões sobrepostas indica o número de sequências codificantes em cada genoma sem homologia a outro genoma sequenciado.

Discussão

Nesse estudo, a análise comparativa mostrou que o DNA cromossômico do isolado de *E. aerogenes* de colonização (Ea5A) apresentou mais genes que o isolado de infecção (Ea7A), por outro lado, considerando o DNA plasmidial, o isolado de infecção apresentou mais genes. Esses achados ressaltam que mesmo os isolados apresentando relação clonal pela ERIC-PCR, eles apresentaram quantidade de genes diferentes, mostrando que não são idênticos geneticamente, como também destaca-se a importância de um maior número de genes plasmidiais no isolado de infecção, o que pode favorecer a disseminação horizontal desses genes. Vale ressaltar que vários genes não tiveram sua função predita, consequentemente estudos adicionais serão conduzidos com o objetivo de anotação mais acurada desses genes.

Considerando o DNA cromossômico e plasmidial, os isolados Ea5A e Ea7A

apresentaram 12 genes de beta-lactamases, valores superiores aos detectados por Diene *et al.* (2012) na cepa EA1509E e para a cepa KCTC 2190 (CP002824). O acúmulo de determinantes de resistência em amostras de *E. aerogenes*, já tinha sido anteriormente citado na literatura (JASKULSKI *et al.*, 2013; KUAI *et al.*, 2014; NOGUEIRA *et al.*, 2014), entretanto, através de sequenciamento genômico fica evidente a quantidade de genes de resistência que podem ser albergados por uma cepa, o que inviabiliza o uso de beta-lactâmicos como opção terapêutica.

Através da análise de ortólogos, as enzimas *bla*_{TEM-1} e *bla*_{KPC-2} compõem o grupo ORTHOMCL3033, que foi exclusivo dos isolados deste estudo, ou seja, as cepas de referência EA1509E e KCTC 2190 usadas para comparação não possuem esses genes. Isto deve alertar para a facilidade de aquisição desses importantes mecanismos de resistência, anteriormente não detectados em *E. aerogenes* sequenciados genomicamente.

Outro ponto que merece ser ressaltado é a localização cromossômica do gene *bla*_{KPC-2} nos isolados Ea5A e Ea7A. O gene *bla*_{KPC}, tem sido descrito mais comumente associado a plasmídeos de diferentes tamanhos e grupos de incompatibilidade (PATEL; RASHEED; KITCHEL, 2009; CUZON *et al.*, 2010; ANDRADE *et al.*, 2011; KUAI *et al.*, 2014; PEREIRA *et al.*, 2015; TAVARES *et al.*, 2015). Entretanto, inclusive no Brasil, através de hibridização, Quiles *et al.* (2015), confirmaram a localização cromossômica do gene *bla*_{KPC} em *E. cloacae*, sugerindo que o transposon associado ao gene *bla*_{KPC}, por se tratar de elemento móvel, pode estar inserido tanto em plasmídeos como no cromossomo. Luo *et al.* (2014), confirmaram que a disseminação de *bla*_{KPC-2} entre diferentes espécies de enterobactérias na China, incluindo *E. aerogenes*, foi relacionada à transferência horizontal do transposon e não a plasmídeos carregando *bla*_{KPC-2}.

Nos isolados do estudo, foram detectados também genes que conferem resistência a outras classes de antimicrobianos, além de beta-lactâmicos, como aminoglicosídeos, cloranfenicol, sulfonamida, macrolídeos, fosfomicina, fosmidomicina e polimixina. Vasto arsenal de genes de resistência também foi detectado por Diene *et al.* (2015), através de sequenciamento genômico na cepa EA1509E, em contra-partida, na cepa KCTC 2190 apenas resistência específica ao cloranfenicol foi relatada.

Vale ressaltar as diferenças sutis detectadas no quantitativo desses genes de resistência entre os isolados do presente estudo, mesmo sendo clones pela ERIC-PCR e terem sido coletados no mesmo hospital e período. Sabe-se que cópias adicionais do gene podem afetar o seu nível de expressão (PELEG *et al.*, 2005). Então a detecção de cópias extras de

mecanismos de resistência a aminoglicosídeos, sistema de efluxo ABC, além de SST4 no isolado de colonização pode resultar na expressão aumentada desses genes quando comparada ao isolado de infecção.

Também é interessante frisar que genes de resistência a beta-lactâmicos, estreptomicina e sulfonamida também foram detectados no DNA plasmidial dos isolados deste estudo. Resistência plasmidial simultânea a essas classes de antimicrobianos também já foi relatada em *E. aerogenes* por outros autores (MACHADO *et al.*, 2007; DIENE *et al.*, 2012). Enterobactérias geralmente são possuidoras de diversos plasmídeos de alto peso molecular. Nos isolados do estudo foi possível detectar 2 plasmídeos fechados, além de DNA plasmidial restante, com os quais não foi possível fechar outros plasmídeos. Esse quantitativo de plasmídeos foi similar ao detectado genomicamente por Diene *et al.* (2012), por outro lado, plasmídeos não foram detectados na cepa KCTC 2190, nem na cepa estudada por Eevers *et al.* (2015). Porém, através de outras técnicas genéticas, é comum a detecção de plasmídeos em *E. aerogenes* (PERILLI *et al.*, 2008; TAVARES *et al.*, 2015).

Dos grupos de incompatibilidade plasmidial detectados nos isolados Ea5A e Ea7A, *incA/C* já foi relatado anteriormente em plasmídeos de *E. aerogenes* no Brasil por outros autores (MACHADO *et al.*, 2007; DIENE *et al.*, 2012), da mesma forma *incL/M* (BOGAERTS *et al.*, 2007; MARKOVSKA *et al.*, 2014). Plasmídeos de *incX* e *incF* também já foram relatados nesta espécie (BURMOLLE *et al.*, 2008; NORMAN *et al.*, 2008; PARK *et al.*, 2009). Isto confirma a variedade de grupos *inc* atualmente descritos, sendo os tipos *incN*, *incL/M* e *incF* os mais frequentemente relatados em enterobactérias do Brasil (CUZON *et al.*, 2010; ANDRADE *et al.*, 2011; PEREIRA *et al.*, 2015), o que reforça o achado de *incL/M* no presente estudo.

Em relação aos sistemas de efluxo a multidrogas, nos isolados analisados nesse estudo, apenas diferenças sutis foram detectadas no sistema de transporte ABC (186 versus 185, em Ea5A e Ea7A, respectivamente) e na superfamília MFS (29 versus 31, em Ea5A e Ea7A, respectivamente). Sistemas do tipo RND, ABC, MFS e DMT também já foram relatados em *E. aerogenes* (DIENE *et al.*, 2012). Quantitativamente a diferença mais expressiva entre os isolados Ea5A e Ea7A versus EA1509E, reside no sistema de transporte ABC (186 genes em Ea5A, 185 genes em Ea7A e 87 genes em EA1509E), abrindo margem para uma análise posterior dos sistemas de transporte ABC detectados em Ea5A e Ea7A com o objetivo de confirmar se de fato, todos correspondem a sistemas de transporte de multidrogas.

A secreção extracelular de proteínas é considerada um dos principais mecanismos de

virulência de uma infecção bacteriana (SANDKVIST, 2001). Em relação aos sistemas de secreção detectados SST1, SST4 e SST6, observou-se que o isolado de colonização (Ea5A) apresentou cinco genes de SST4 a mais que Ea7A. É sabido que muitos genomas bacterianos são continuamente bombardeados com elementos integrativos conjugativos que frequentemente carregam o loci para SST4 (WOZNIAK; WALDOR, 2010). SST4, comparado aos outros sistemas de secreção, apresenta funções extremamente diversificadas (WALLDEN *et al.*, 2010; VOTH *et al.*, 2012), consequentemente há um limitado entendimento de como múltiplos e distintos SST4 agem para executar corretamente suas funções específicas, apesar de ser citado como um dos principais responsáveis pela diversidade bacteriana (GILLESPIE *et al.*, 2016).

Dentre as adesinas fimbriais, a detecção de fímbrias do tipo I (*fim*) reforça o achado de que esse tipo de fímbria é um dos mais frequentemente relatados em enterobactérias (BURMOLLE *et al.*, 2008; STRUVE *et al.*, 2009; DE CÁSSIA ANDRADE MELO *et al.*, 2014). Por outro lado, não houve detecção de fímbrias do tipo III (*mrk*), achado semelhante para KCTC 2190. Esse resultado contraria a maioria dos dados da literatura, para os quais esse tipo de fímbria também constitui um dos mais detectados em enterobactérias (BURMOLLE *et al.*, 2008; STRUVE *et al.*, 2009; DE CÁSSIA ANDRADE MELO *et al.*, 2014).

Com relação aos sideróforos, ambos os isolados apresentaram enterobactina e aerobactina, tipos mais frequentemente detectados em enterobactérias, inclusive em espécies de *Enterobacter* (MOKRACKA *et al.*, 2003; 2004), além de outros sideróforos mais relatados após advento do sequenciamento genômico (yersiniabactina, TonB, bacterioferritina). É importante ressaltar a localização cromossômica dos fatores de virulência de adesinas fimbriais e sideróforos apresentados por Ea5A e Ea7A, corroborando a maioria dos achados da literatura (LOPER *et al.*, 1993; MOKRACKA *et al.*, 2004), entretanto, menos frequentemente, genes plasmidiais para fímbrias e sideróforos também têm sido relatada em *E. aerogenes* (WATERS; CROSA, 1988; BURMOLLE *et al.*, 2008; NORMAN *et al.*, 2008).

Considerando a análise comparativa através do Mauve, foi possível verificar a sintonia entre os isolados Ea5A e Ea7A. Podemos detectar a conservação estrutural e colinearidade entre o cromossomo dos isolados, mas também é possível verificar a ocorrência de inversão de LCBs. É sabido que inversão cromossômica é um dos principais eventos de rearranjos genômicos em bactérias (KITICHOTIRAT *et al.*, 2010; RAMOS *et al.*, 2014).

Ainda em relação às análises comparativas, através do diagrama de Venn, foi possível

observar que a quantidade de genes compartilhados por Ea5A e Ea7A corresponde a 90% do genoma de Ea5A e a 92% do genoma de Ea7A, o que pode explicar a resistência e virulência semelhante detectada nos isolados. Quando comparados os isolados de *E. aerogenes* desse estudo e as cepas de referência já sequenciadas anteriormente em outros estudos (KCTC 2190 e EA1509_E), pode-se observar que Ea5A e Ea7A são ligeiramente mais similares a EA1509_E (patógeno humano) do que a KCTC 2190. Ao nosso conhecimento, essa é a primeira análise comparativa entre genomas de *E. aerogenes* realizada, o que evidenciou a similaridade entre as cepas do presente estudo (Ea5A e Ea7A), entre as cepas de referência utilizadas (KCTC 2190 e EA1509_E), como também entre as 4 cepas comparadas, mesmo sendo provenientes de diferentes origens e localização geográfica.

A análise comparativa realizada entre os isolados do estudo Ea5A e Ea7A, mostrou alta similaridade cromossômica e plasmidial tanto em relação a um contexto geral quanto às características pontuais do estudo: genes de beta-lactamases, genes de resistência a outras classes de antimicrobianos, genes de virulência, sistemas de efluxo e sistemas de secreção. Entretanto, mesmo diante das semelhanças (relação clonal pela ERIC-PCR, mesmo hospital de procedência, mesmo setor e data de coleta) não devemos esquecer as particularidades detectadas para cada isolado, especialmente em relação ao quantitativo de genes totais, quantitativo de sistemas de efluxo e secreção, além dos genes que são exclusivos de cada isolado. Serão conduzidos estudos adicionais para anotação das proteínas obtidas como hipotéticas.

Diante do exposto, pode-se concluir que os isolados Ea5A e Ea7A provenientes de colonização e infecção, respectivamente, possuem um amplo arsenal de determinantes de resistência e virulência. Esses resultados devem alertar as autoridades médicas quanto à problemática de pacientes colonizados por *E. aerogenes*, pois apesar de não estar causando infecção, o isolado de *E. aerogenes* Ea5A, proveniente de colonização, apresentou genes de virulência potenciais para estabelecer a infecção, além de elementos genéticos móveis capazes de transmitir diversos genes para outras bactérias presentes na microbiota entérica do paciente. Aliado a isso, o vasto arsenal de determinantes de resistência aos antimicrobianos mais utilizados na prática clínica, encontrados nesse estudo, dificulta o tratamento das infecções causadas por essas bactérias.

Tabela 1. Características genômicas dos isolados de *Enterobacter aerogenes* Ea5A e Ea7A analisados nesse estudo e das cepas KCTC 2190 e EA1509E, utilizadas para as análises comparativas.

	Ea5A	Ea7A	KCTC 2190	EA1509E
Característica ressaltada	Colonização humana	Infecção humana	produtor de 2-3-butanediol	Patógeno humano
Referência	Este estudo	Este estudo	Shin et al. (2012)	Diene et al. (2012)
Cromossomo ^(a)	5.571.633pb	5.423.282pb	5.280.350pb	5.419.609pb
Conteúdo GC	55.56%	55.73%	54.8%	55%
CDS cromossômicas ^(b)	5571	5351	4.912	5.260
Proteínas preditas	4517	4402	3.824	3.415
Proteínas hipotéticas	1054	949	1088	1845
RNAr	5	9	25	8
RNAr	75	90	84	87
Plasmídeos ^(c)	Ea5A_pA: 5.436pb	Ea7A_pA: 5.534pb	ausentes	pEA1509_A: 162,202
	Ea5A_pB: 72.262pb	Ea7A_pB: 72.492pb		bp
	DNA plasmidial	DNA plasmidial		pEA1509_B:
	restante: 241.370pb	restante: 427.902pb		9,294 bp
Grupos inc	L/M e A/C	L/M e A/C	ausente	ND
CDS plasmidiais ^(b)	438	630	ausente	239
Proteínas preditas	153	297	ausente	134
Proteínas hipotéticas	285	333	ausente	105

(a) tamanho do cromossomo em pares de bases, (b) CDS, sequências codificantes, (c) plasmídeos detectados e respectivos tamanhos em pares de bases

Tabela 2. Caracterização quantitativa e qualitativa dos isolados de *Enterobacter aerogenes* Ea5A e Ea7A quanto aos genes de resistência a antimicrobianos, genes de virulência, sistemas de efluxo e sistemas de secreção identificados através do Rast ou Resfinder (beta-lactamases)

	Ea5A		Ea7A	
	DNA cromossômico	DNA plasmidial	DNA cromossômico	DNA plasmidial
Beta-lactamases	11 genes: Anotados genericamente pelo Rast. Anotados pelo Resfinder: <i>bla</i> _{TEM-1} (S2.CDS.5550) e <i>bla</i> _{KPC-2} (S2.CDS.5428)	1 gene: Anotado genericamente pelo Rast	11 genes: Anotados genericamente pelo Rast. Anotados pelo Resfinder: <i>bla</i> _{TEM-1} (S3.CDS.5307) e <i>bla</i> _{KPC-2} (S3.CDS.5254)	1 gene: Anotado genericamente pelo Rast
Genes de resistência a outras classes de antimicrobianos	20 genes: <i>acc(3)-III</i> (1), <i>rmt</i> (2), <i>ant(9)</i> (2), <i>tmrB</i> (1), <i>cat</i> (1), <i>sulII</i> (1), <i>dhfr</i> (4), <i>macA</i> (1), <i>macB</i> (1), <i>fosA</i> (1), <i>pmr</i> (3), <i>arn</i> (2)	2 genes: <i>ant(9)</i> (1) e <i>sulII</i> (1)	21 genes: <i>acc(3)-III</i> (1), <i>rmt</i> (2), <i>ant(9)</i> (1), <i>tmrB</i> (1), <i>cat</i> (1), <i>sulII</i> (3), <i>dhfr</i> (4), <i>macA</i> (1), <i>macB</i> (1), <i>fosA</i> (1), <i>pmr</i> (3), <i>arn</i> (2)	2 genes: <i>ant(9)</i> (1) e <i>sulII</i> (1)
Sistemas de efluxo	244 genes: RND (15), ABC (186), MFS (29), MATE (1), DMT (13)	-	245 genes: RND (15), ABC (185), MFS (31), MATE (1), DMT (13)	-
Sideróforos	30 genes: enterobactina (<i>ent</i>) (13), aerobactina (1), yersiniabactina (<i>irp</i>)(7), <i>tonB</i> (7), bacterioferritina (2)	-	30 genes: Enterobactina (<i>ent</i>) (13), aerobactina (1), yersiniabactina (<i>irp</i>) (7), <i>tonB</i> (7), bacterioferritina (2)	-
Fímbrias	58 genes: fímbrias do tipo I (<i>fim</i>) (18), <i>csg</i> (1), fímbrias do tipo IV (<i>pil</i>) (5), <i>sfm</i> (3), sigma-fímbria (5), alfa-fímbria (3) e CFA/I (6), tipo não especificado (17)	-	58 genes: fímbrias do tipo I (<i>fim</i>) (18), <i>csg</i> (1), fímbrias do tipo IV (<i>pil</i>) (5), <i>sfm</i> (3), sigma-fímbria (5), alfa-fímbria (3) e CFA/I (6), tipo não especificado (17)	-
Biofilme	14 genes: <i>pga</i> (4), <i>bssR</i> (1), <i>cid</i> (3), <i>yjg</i> (6)	-	14 genes: <i>pga</i> (4), <i>bssR</i> (1), <i>cid</i> (3), <i>yjg</i> (6)	-
Cápsula	9 genes <i>rsc</i> (5), <i>yegH</i> (1), <i>cps</i> (3)	-	9 genes <i>rsc</i> (5), <i>yegH</i> (1), <i>cps</i> (3)	-
Sistemas de secreção	35 genes: SST4 (<i>imp</i> , <i>vas</i> e <i>vir</i>) (29), SST1 (<i>lap</i> , <i>lss</i> e <i>hly</i>) (4), SST6 (2)	-	30 genes: SST4 (<i>imp</i> , <i>vas</i> e <i>vir</i>) (24), SST1 (<i>lap</i> , <i>lss</i> e <i>hly</i>) (4), SST6 (2)	-

Tabela 3. Proteínas exclusivas relacionadas à resistência, virulência, sistemas de efluxo, e sistemas de secreção dos isolados de *Enterobacter aerogenes* Ea5A (colonização) e Ea7A (infecção) identificadas através do Rast.

	Ea5A		Ea7A	
	DNA cromossômico	DNA plasmidial	DNA cromossômico	DNA plasmidial
Proteínas exclusivas/ Grupos de ortólogos	448	145	110	144
Proteínas hipotéticas	124	105	74	103
Proteínas associadas à resistência	“Beta-lactamase class C and other penicillin binding proteins” * “Streptomycin 3-O-adenylyltransferase EC 2.7.7.47/@ Spectinomycin 9-O-adenylyltransferase” *	-	“Dihydropteroate synthase type-2 EC 2.5.1.15 @ Sulfonamide resistance protein” (2 cópias) *	-
Proteínas associadas à virulência	TonB (1), Rcs (3), YegH (1)	-	-	-
Sistemas de efluxo	ABC (14), MFS (5), DMT (3), RND (2)	-	-	-
Sistemas de secreção	SST4 (9) e SST1 (2)	-	-	-

* Anotação genérica obtida através do Rast

Tabela 4. Beta-lactamases e grupos de ortólogos/parálogos (correspondentes a beta-lactamases) exclusivos ou compartilhados pelos isolados de *Enterobacter aerogenes* Ea5A (colonização) e Ea7A (infecção) comparados.

Ortólogo/ parólogo	Proteína ^(a)	Proteína ^(b)	Ea5A	Ea7A	KCTC 2190	EA1509E
nulo	“Beta-lactamase class C and other penicillin binding proteins”	ND	+	-	-	-
nulo	Beta-lactamase	ND	-	-	-	+
1399	“Metal-dependent hydrolases of the beta-lactamase superfamily I; PhnP protein”	ND	+	+	++	+
1619	Beta-lactamase EC 3.5.2.6/beta-lactamaseD-alanine carboxypeptidase	ND	+	+	+	+
178	Beta-lactamase	ND	-	-	+	+
3033	Beta-lactamase EC 3.5.2.6	<i>bla</i> _{TEM-1}	+	+	-	-
		<i>bla</i> _{KPC-2}	+	+	-	-
3110	“Beta-lactamase class C and other penicillin binding proteins”	ND	-	+	+	+
4023	Beta-lactamase EC 3.5.2.6	ND	+	+	+	+
4211	“beta-lactamase domain-containing protein”	ND	+	+	+	++
522	“Predicted hydrolase of the metallo-beta-lactamase superfamily, clustered with KDO2-Lipid A biosynthesis genes”	ND	+	+	++	+
710	“beta-lactamase-like protein”	ND	+	+	+	++
830	“Metallo-beta-lactamase superfamily protein PA0057”	ND	+	+	+	+

(a) Anotação genérica obtida através do Rast, (b) Anotação acurada obtida através do Resfinder-Beta-lactamase,

* outra anotação para a proteína

Referências

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ, Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v.215, p.403-410, 1990.

Andrade LN, Curiao T, Ferreira JC, Longo JM, Clímaco EC, Martinez R, Bellissimo-Rodrigues F, Basile-Filho A, Evaristo MA, Del Peloso PF, Ribeiro VB, Barth AL, Paula MC, Baquero F, Cantón R, Darini AL, Coque TM. 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 (7), p. 3579-3583, 2011.

Blom J, Albaum SP, Doppmeier D, Pühler A, Vorhölter FJ, Zakrzewski M, Goesmann A. EDGAR: a software framework for the comparative analysis of prokaryotic genomes. **BMC Bioinformatics**, v.10, p.154, 2009.

Bogaerts P, Galimand M, Bauraing C, Deplano A, Vanhoof R, De Mendonca R,

Rodriguez-Villalobos H, Struelens M, Glupczynski Y. Emergence of ArmA and RmtB aminoglycoside resistance 16S rRNA methylases in Belgium. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.59, p.459-464, 2007.

Burmolle M, Bahl MI, Jensen LB, Sorensen SJ, Hansen LH. Type 3 fimbriae, encoded by the conjugative plasmid pOLA52, enhance biofilm formation and transfer frequencies in Enterobacteriaceae strains. **Microbiology**, v.154, p.187-195, 2008.

Cuzon G, Naas T, Truong H, Villegas M-V, Wisell KT, Carmeli Y, Gales AC, Navon-Venezia S, Quinn JP, Nordmann P. Worldwide Diversity of *Klebsiella pneumoniae* That Produces β -Lactamase blaKPC-2 Gene. **Emerging Infectious Diseases**, v.16(9), p.1349-1356, 2010.

Bullen JJ, Rogers HJ, Spalding PB, Ward CG. Iron and infection: the heart of the matter. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.43, p.325-330, 2005.

Cabral AB, Melo RCA, MacielMAV, Lopes ACS. Multidrug resistance genes, including bla_{KPC} and bla_{CTX-M-2}, among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45(5), p.572-578, 2012.

Calfee D, Jenkins SG. Use of active surveillance cultures to detect asymptomatic colonization with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in intensive care unit patients. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v.29, p.966-968, 2008.

Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. **Journal of Microbiological Methods**, v.63, p.219-228, 2005.

Darling AE, Tritt A, Eisen JA, Facciotti MT. Mauve assembly metrics. **Bioinformatics**, v.27(19), p.2756-2757, 2011.

Davin-Regli A, Pagès J-M. *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. **Frontiers in Microbiology**, v.6, p.392, 2015.

de Cássia Andrade Melo R, de Barros EM, Loureiro NG, de Melo HR, Maciel MA, Souza Lopes AC. Presence of fimH, mrkD, and irp2 virulence genes in KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Recife-PE, Brazil. **Current Microbiology**, v.69(6), p.824-831, 2014.

Diene SM, Merhej V, Henry M, Filali AE, Roux V, Robert C, Azza S, Gavory F, Barbe V, La Scola B, Raoult D, Rolain JM. The Rhizome of the Multidrug-Resistant *Enterobacter aerogenes* Genome Reveals How New “Killer Bugs” Are Created because of a Sympatric Lifestyle. **Molecular Biology and Evolution**, v.30(2), p.369-383, 2012.

Duan H, Chai T, Liu J, Zhang X, Qi C, Gao J, Wang Y, Cai Y, Miao Z, Yao M, Schlenker G. Source identification of airborne *Escherichia coli* of swine house surroundings using ERIC-PCR and REP-PCR. **Environmental Research**, v.109, p.511-517, 2009.

Eevers N, Van Hamme JD, Bottos EM, Weyens N, Vangronsveld J. Draft genome

sequence of *Enterobacter aerogenes*, a DDE-degrading and plant growthpromoting strain isolated from *Cucurbita pepo*. **Genome Announcements** v.3(2):e00317-15, 2015.

Gillespie JJ, Phan IQH, Scheib H, Subramanian S, Edwards TE, Lehman SS, Piitulainen H, Sayeedur Rahman M, Rennoll-Bankert KE, Staker BL, Taira S, Stacy R, Myler PJ, Azad AF, Pulliainen AT. Structural insight into how bacteria prevent interference between multiple divergent type IV secretion systems. **mBio**, v.6(6), p.e01867-15, 2015.

Jaskulski MR, Medeiros BC, Borges JV, Zalewsky R, Fonseca MEC, Marinowic DR, Rocha MP, Nodari P, Machado DC. Assessment of extended-spectrum β -lactamase, KPC carbapenemase and porin resistance mechanisms in clinical samples of *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter* spp. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.42, p. 76-79, 2013.

Juhász E, Jánvári L, Tóth A, Damjanova I, Nobilis A, Kristóf K. Emergence of VIM-4- and SHV-12-producing *Enterobacter cloacae* in a neonatal intensive care unit. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 302(6), p.257-260, 2012.

Kittichotirat W, Bumgarner R, Chen C. Markedly different genome arrangements between serotype a strains and serotypes b or c strains of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. **BMC Genomics**, v.11, p.489, 2010.

Kuai S, Shao H, Huang L, Pei H, Lu Z, Wang W, Liu, J. KPC-2 carbapenemase and DHA-1 AmpC determinants carried on the same plasmid in *Enterobacter aerogenes*. **Journal of Medical Microbiology**, v.63, p.367-370, 2014.

Lee CC, Lee NY, Yan JJ, Lee HC, Chen PL, Chang CM, Wu CJ, Ko NY, Wang LR, Chi CH, Ko, WC. Bacteremia due to Extended-Spectrum- β -Lactamase-producing *Enterobacter cloacae*: Role of Carbapenem Therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.54 (9), p.3551-3556, 2010.

Li L, Stoeckert CJ Jr, Roos DS. OrthoMCL: identification of ortholog groups for eukaryotic genomes. **Genome Research**, v.13(9), p.2178-2189, 2003.

Liu W-Y, Wong C-F, Chung KM-K, Jiang J-W, Leung FC-C. Comparative Genome Analysis of *Enterobacter cloacae*. **PLoS ONE**, v.8(9): e74487, 2013.

Loper JE, Ishimaru CA, Carnegie SR, Vanavichit A. Cloning and Characterization of Aerobactin Biosynthesis Genes of the Biological Control Agent *Enterobacter cloacae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59(12), p.4189-4197, 1993.

Luo Y, Yang J, Ye L, Guo L, Zhao Q, Chen R, Chen Y, Han X, Zhao J, Tian S, Han L. Characterization of KPC-2-producing *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, and *Klebsiella oxytoca* isolates from a Chinese Hospital. **Microbial Drug Resistance**, v.20(4), p.264-269, 2014.

Machado E, Coque TM, Cantón R, Novais A, Sousa JC, Baquero F, Peixe L. High diversity of extended-spectrum β -lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae from Portugal. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.60, p.1370-1374, 2007.

Markovska RD, Stoeva TJ, Bojkova KD, Mitov IG. Epidemiology and molecular

characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacter*spp., *Pantoea agglomerans*, and *Serratia marcescens* isolates from a Bulgarian hospital. **Microbial Drug Resistance**, v.20(2), p.131-137, 2014.

Mokracka J, Kaznowski A, Szarata M, Kaczmarek E. Siderophore-mediated strategies of iron acquisition by extraintestinal isolates of *Enterobacter* spp. **Acta Microbiologica Polonica**, v.52(1), p.81-86, 2003.

Mokracka J, Koczura R, Kaznowski A. Yersiniabactin and other siderophores produced by clinical isolates of *Enterobacter* spp. and *Citrobacter* spp. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.40, p. 51-55, 2004.

Nogueira KD, Paganini MC, Conte A, Cogo LL, Taborda de Messias Reason I, da Silva MJ, Dalla-Costa LM. Emergence of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacter* spp. in patients with bacteremia in a tertiary hospital in southern Brazil. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v.32(2), p.87-92, 2014.

Norman A, Hansen LH, She Q, Sorensen SJ. Nucleotide sequence of pOLA52: A conjugative IncX1 plasmid from *Escherichia coli* which enables biofilm formation and multidrug efflux. **Plasmid**, v.60, p.59-74, 2008.

Patel JB, Rasheed JK, Kitchel B. Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: Activity, Epidemiology, and Laboratory Detection. **Clinical Microbiology Newsletter**, v.31, n.8, 2009.

Park Y-J, Yu JK, Kim S-I, Lee K, Arakawa Y. Accumulation of Plasmid-Mediated Fluoroquinolone Resistance Genes, *qepA* and *qnrS1*, in *Enterobacter aerogenes* Co-producing RmtB and Class A β -lactamase LAP-1. **Annals of Clinical & Laboratory Science**, v.39(1), p.55-59, 2009.

Peleg AY, Franklin C, Bell JM, Spelman DW. Dissemination of the metallo- β -lactamases Gene *blaIMP-4* among Gram-negative pathogens in a clinical setting in Australia. **Clinical Infectious Diseases**, v.41, p.1549-1556, 2005.

Pereira PS, Borghi M, Albano RM, Lopes JCO, Silveira MC, Marques EA, Oliveira JCR, Asensi MD, Carvalho-Assef APD'A. Coproduction of NDM-1 and KPC-2 in *Enterobacter hormaechei* from Brazil. **Microbial Drug Resistance**, v.21(2), p.234-236, 2015.

Perilli M, Celenza G, De Santis F, Pellegrini C, Forcella C, Rossolini GM, Stefani S, Amicosante G. E240V Substitution Increases Catalytic Efficiency toward Ceftazidime in a New Natural TEM-Type Extended-Spectrum β -Lactamase, TEM-149, from *Enterobacter aerogenes* and *Serratia marcescens* Clinical Isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.52(3), p. 915-919, 2008.

Quiles MG, Rocchetti TT, Fehlberg LC, Kusano EJ, Chebabo A, Pereira RM, Gales AC, Pignatari AC. Unusual association of NDM-1 with KPC-2 and *armA* among Brazilian *Enterobacteriaceae* isolates. **Brazilian Journal of Medical and Biology Research**, v.48(2), p.174-177, 2015.

Ramos PIP, Picão RC, de Almeida LGP1, Lima NCB, Girardello R, Vivan ACP, Xavier DE, Barcellos FG, Pelisson M, Vespero EC, Médigue C, de Vasconcelos ATR, Gales AC, Nicolás MF. Comparative analysis of the complete genome of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* Kp13 reveals remarkable genome plasticity and a wide repertoire of virulence and resistance mechanisms. **BMC Genomics**, v.15, p.54, 2014.

Sandkvist M. Type II Secretion and Pathogenesis. **Infection and Immunity**, v.69(6), p.3523-3535, 2001.

Schechner V, Kotlovsky T, Kazma M, Mishali H, Schwartz D, Navon-Venezia S, Schwaber MJ, Carmeli Y. Asymptomatic rectal carriage of blaKPC producing carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: who is prone to become clinically infected? **Clinical Microbiology and Infection**, v.19, p. 451-456, 2013.

Struve C, Bojer M, Krogfelt KA. Identification of a Conserved Chromosomal Region Encoding *Klebsiella pneumoniae* Type 1 and Type 3 Fimbriae and Assessment of the Role of Fimbriae in Pathogenicity. **Infection and Immunity**, v. 77 (11), p. 5016–5024, 2009.

Taghavi S, Wu X, Ouyang L, Zhang YB, Stadler A, McCorkle S, Zhu W, Maslov S, van der Lelie D. Transcriptional Responses to Sucrose Mimic the Plant-Associated Life Style of the Plant Growth Promoting Endophyte *Enterobacter* sp. 638. **PLoS ONE**, v.10(1), p. e0115455, 2015.

Tavares CP, Pereira PS, de Andrade Marques E, Faria Jr. C, de Souza MPAH, de Almeida R, Alves CFM, Asensi MD, D'Alincourt Carvalho-Assef AP. Molecular epidemiology of KPC-2-producing Enterobacteriaceae (non-*Klebsiella pneumoniae*) isolated from Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.82, p.326-330, 2015.

Shin SH, Kim S, Kim JY, Lee S, Um Y, Oh MK, Kim YR, Lee J, Yang KS. Complete Genome Sequence of *Enterobacter aerogenes* KCTC 2190. **Journal of Bacteriology**, v. 194(9), p. 2373-2374, 2012.

Tuon FF, Scharf C, Rocha JL, Cieslinsk J, Becker GN, Arend LN. KPC-producing *Enterobacter aerogenes* infection, **The Brazilian Journal of Infectious diseases**, v.19(3), p. 324-327, 2015.

Voth DE, Broederdorf LJ, Graham JG. Bacterial type IV secretion systems: versatile virulence machines. **Future Microbiology**, v.7, p.241-257, 2012.

Wallden K, Rivera-Calzada A, Waksman G. Type IV secretion systems: versatility and diversity in function. **Cellular Microbiology**, v.12, p.1203-1212, 2010.

Waters VL, Crosa JH. Divergence of the aerobactin iron uptake systems encoded by plasmids pCoIV-K30 in *Escherichia coli* K-12 and pSMN1 in *Aerobacter aerogenes* 62-1. **Journal of Bacteriology**, v.170, p.5153-5160, 1988.

Wozniak RAF, Waldor MK. Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. **Nature Reviews Microbiology**, v.8, p.552-563, 2010.

Zerbino DR, Birney E. Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. **Genome Research**. v.18, p.821-829, 2008.

5.3. Análise genômica de isolados de *Enterobacter cloacae* portadores de *bla*_{CTX-M-15} provenientes de infecções de pacientes de UTI neonatal: diversidade de genes de resistência e de virulência (Artigo 3)

Introdução

Enterobacter é um gênero extremamente diversificado da família *Enterobacteriaceae* podendo ser encontrado no solo, em plantas e na microbiota de humanos (LIU *et al.*, 2012). Dentre as espécies do gênero, destacam-se *Enterobacter aerogenes* e *Enterobacter cloacae* como patógenos para o homem.

Análises recentes do genoma demonstram que o gênero *Enterobacter* possui uma série de genes de resistência a antimicrobianos e sistemas de efluxo multidrogas (DIENE *et al.*, 2012), sendo esses mecanismos também observados em *E. cloacae* (LIU *et al.*, 2013).

Enterobacter cloacae é um emergente patógeno, causador de Infecções relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS), envolvido em bacteremia, endocardite, artrite séptica, osteomielite, infecções de pele e tecidos moles, infecções do trato respiratório baixo, trato urinário e intra-abdominal (DAVIN-REGLI; PAGES, 2015). Diversos surtos em unidades neonatais têm sido atribuídos a uma variedade de fontes como medicações contaminadas, água destilada em ventiladores mecânicos e soluções usadas para nutrição parenteral (STOESSER *et al.*, 2015).

Devido a emergente resistência, *E. cloacae* vem se destacando entre isolados multidroga resistentes (MDR) (LEVERSTEIN-VAN *et al.*, 2006). Até o momento já foram descritas cinco famílias de sistema de efluxo: “Resistance Nodulation-cell division” (RND), “Adenosine triphosphate-binding cassette superfamily” (ABC), “Major Facilitator superfamily” (MFS), “Multidrug and toxic compound extrusion family” (MATE) e “Drug/metabolite transporter superfamily” (DMT), nessa espécie bacteriana (POOLE *et al.*, 2005).

Para determinar o sucesso da infecção por bactérias patogênicas, a adesão e a colonização do hospedeiro são fatores-chave, destacando as adesinas fimbriais (LIU *et al.*, 2013). Mecanismo de absorção de ferro de alta afinidade também é outro fator de virulência necessário para as bactérias proliferarem com sucesso no organismo hospedeiro. As bactérias desenvolveram várias estratégias, como os sideróforos, para sequestrar ferro de tecidos infectados (MOKRACKA *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2013; TAGHAVI *et al.*, 2015). Adicionalmente, a secreção extracelular de proteínas é considerada um dos principais mecanismos de virulência de uma infecção bacteriana. Várias vias de secreção altamente

especializadas têm evoluído, até o momento foram identificadas seis sistemas de secreção (SST): SST1, SST3 e SST4 (secretam proteínas em uma única etapa), SST2 e SST5 (secretam proteínas em duas etapas) e SST6 (anteriormente relatado como SST4) (SANDKVIST, 2001; FILLOUX *et al.*, 2008; GILLESPIE *et al.*, 2016).

Os plasmídeos aumentam a diversidade genética bacteriana, podendo ser transferido horizontalmente entre populações bacterianas por conjugação ou transformação (FRANCIA *et al.*, 2004). Eles contêm genes para iniciação e controle da replicação e genes acessórios que podem ser úteis ao hospedeiro bacteriano, conferindo resistência antimicrobiana e/ou virulência (BERGSTROM *et al.*, 2000; CARATOLLI *et al.*, 2005).

Onze genomas completos de *Enterobacter* têm sido reportados ao NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/1219>). O sequenciamento genômico de dois isolados de *E. cloacae* patogênicos humanos, no presente estudo, permitirá um maior entendimento a cerca desta espécie, uma vez que, dentre os projetos de sequenciamento genômico de *E. cloacae*, apenas a cepa ATCC 13047 (patógeno humano) teve aspectos de virulência e resistência abordados, mesmo que superficialmente (REN *et al.*, 2010). Os demais, estudaram patógenos de plantas, enfatizando principalmente o potencial para o uso de *Enterobacter* em aplicações industriais (TAGHAVI *et al.*, 2010; DEANGELIS *et al.*, 2011; HUMANN *et al.*, 2011; LIU *et al.*, 2012; 2013; XU *et al.*, 2012). Portanto este estudo tem como objetivo caracterizar genomicamente os isolados Ec2A e Ec7A quanto à resistência, virulência e sistemas de efluxo e secreção, além de permitir verificar diferenças ou similaridades entre o grupo diversificado que compreende o complexo *E. cloacae*, através de análise genômica comparativa.

Materiais e métodos:

Isolados bacterianos

Foram analisados dois isolados de *E. cloacae* (Ec2A e Ec7A), com relação clonal pela técnica de tipagem ERIC-PCR e ambos multirresistentes. Os isolados apresentaram mesmo perfil de resistência, exceto em relação à piperacilina/tazobactam, pois Ec2A apresentou resistência intermediária, enquanto Ec7A foi resistente a este antimicrobiano. Ambos isolados foram positivos para *bla*_{CTX-M2}, sendo um recuperado de secreção ocular (Ec2A) e o outro recuperado de hemocultura (Ec7A), coletados em 25 de novembro de 2011 e 02 de julho de 2012, respectivamente, ambas provenientes de pacientes distintos internados em unidade de tratamento intensivo neonatal (UTI neo) de um hospital público de Recife-PE, Brasil. A identificação bioquímica e teste de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados foram

realizados utilizando o equipamento automatizado BD Phoenix TM (Franklin Lakes, New Jersey, USA). Os isolados foram mantidos em estoque congelado à -20°C com glicerol à 15%.

Extração de DNA e ERIC-PCR

O DNA foi extraído utilizando o Kit Wizard genomic DNA purification kit (Promega). O DNA foi quantificado através do equipamento Nano Drop. O perfil de ERIC-PCR foi obtido através de amplificação por PCR conforme primers de Duan *et al.* (2009) e metodologia de Cabral *et al.* (2012). O produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose à 1,5% (ERIC-PCR), em seguida fotografado. A análise do padrão de bandas geradas pela ERIC-PCR foi analisada utilizando o software DARVIN 5.0.

Sequenciamento genômico

Com os DNAs das amostras extraídos, os mesmos foram quantificados novamente utilizando a plataforma fluorimétrica Qubit da ThermoFisher Scientific. Posteriormente à dosagem, os materiais biológicos foram utilizados para montagem das bibliotecas de DNA utilizando o kit Nextera XT da Illumina (Ec7A) e kit TruSeq DNA PCR Free Kit da Illumina (Ec2A). A quantificação das bibliotecas foi realizada pela técnica da PCR em Tempo Real através do kit Library Quantification – Illumina/Universal da empresa Kapa Biosystems e o equipamento 7500 da Applied BioSystems. O sequenciamento genômico foi realizado utilizando o sistema de bibliotecas *pair-end* e o equipamento MiSeq (Illumina) com o cartucho MiSeq Kit V3 de 600 ciclos.

Montagem e Anotação dos Genomas

Primeiramente, para avaliação da qualidade dos fragmentos gerados conforme descrito anteriormente, a ferramenta FASTQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) foi utilizada. Parâmetros tais como qualidade de sequenciamento por base, qualidade de sequenciamento média por leitura, distribuição do tamanho das leituras, quantidade de leituras produzidas e distribuição do conteúdo de nucleotídeos foram avaliados. Após esta avaliação, estes valores produzidos foram utilizados para configurar a execução da ferramenta Trimmomatic (<http://www.usadellab.org/cms/index.php?page=trimmomatic>) que tem como finalidade a limpeza das informações com baixa qualidade presentes no dado inicial. Posteriormente a esta limpeza, os programas velveth e velvetg do pacote Velvet (ZERBINO; BIRNEY, 2008) foram utilizados para montagem dos contigs. Importante

ressaltar que os parâmetros de ambas ferramentas foram configurados com o auxílio da ferramenta Velvetoptimiser (<http://bioinformatics.net.au/software/velvetoptimiser.shtml>) que encapsula os programas velveth e velvetg. Os programas blastall (ALTSCHUL *et al.*, 1990) e Mauve (DARLING *et al.*, 2011) foram utilizados para o alinhamento e ordenamento dos contigs em relação às sequências de referência para cromossomo e plasmídeos. Para predição e anotação gênica as ferramentas RASTtk (<http://rast.nmpdr.org/>) e Resfinder-beta-lactamases (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>) foram utilizadas. Foi realizada ainda uma predição de grupos de ortólogos para os genes encontrados utilizando o programa Orthomcl (LI; STOECKERT; ROOS, 2003). Todas as informações relativas à montagem, predição e anotação gênica e relação de ortologia foram armazenadas em um banco de dados relacional utilizando como ferramenta de gerenciamento o MySQL (<https://www.mysql.com/>).

Pesquisa dos grupos de incompatibilidade (inc)

Os grupos de inc presentes nos isolados foram pesquisados alinhando as sequências dos primers descritos por Carattoli *et al.* (2005), contra o DNA plasmidial e cromossômico através da ferramenta blastall. Alinhamento de 100% das sequências forward e reverse implica dizer que o isolado contém a sequência compreendida entre ambos os primers, ou seja, o grupo de inc pesquisado.

Genomas para análises comparativas

Para realizar as análises comparativas com as amostras sequenciadas neste estudo, seis genomas completos de *E. cloacae* foram carregados a partir da base de dados do GenBank. As cepas utilizadas foram: *Enterobacter cloacae* ATCC 13047 uid48363 (NC_014121), *Enterobacter cloacae* ENHKU01 uid172463 (NC_018405), *Enterobacter cloacae* EcWSU1 uid80739 (NC_016514), *Enterobacter cloacae* NCTC 9394 uid197202 (NC_21046), *Enterobacter cloacae* lignolyticus SCF1 uid59969 (NC_014618), *Enterobacter cloacae* dissolvens SDM uid168997 (NC_018079). Não foram incluídos na pesquisa, depósitos que não especificavam a espécie de *Enterobacter* sp. ou de outras espécies. Características genômicas das cepas utilizadas para as análises comparativas estão descritas na tabela 1.

Resultados

Análise pela ERIC-PCR

Os isolados Ec7A e Ec2A apresentaram relação clonal através da tipagem molecular por ERIC-PCR, mostrando 100% de similaridade.

Montagem de contigs

Considerando a isolado Ec7A, foram obtidos um total de 196 contigs destes 17 foram considerados contigs plasmidiais, o que permitiu a identificação dos plasmídeos Ec7A_pA (união de 8 contigs) semelhante ao plasmídeo de referência NC_024983.1, Ec7A_pB (união de 3 contigs) semelhante ao plasmídeo de referência NZ_CP009855.1, com os demais contigs (6) não foi possível montar outros plasmídeos. A partir de 179 contigs cromossômicos foi montado um scaffold cromossômico baseando-se na referência *ecloacae_ecnih2*.

Considerando a isolado Ec2A, do total de 180 contigs, 19 foram considerados contigs plasmidiais, o restante (161) foi considerado contigs cromossômicos, a partir dos quais foi montado um scaffold cromossômico baseando-se na referência *ecloacae_ecnih2*. Análise manual dos contigs plasmidiais permitiu a identificação dos plasmídeos Ec2A_pA (único contig) semelhante ao plasmídeo de referência NZ_CP008900.1, Ec2A_pB (único contig) semelhante ao plasmídeo de referência NZ_AUPS01000027.1, Ec2A_pC (união de 8 contigs) semelhante ao plasmídeo de referência NC_024983.1, com os demais contigs (9) não foi possível montar outros plasmídeos.

Identificação de genes

Através da ferramenta RASTtk, foram identificadas sequências codificantes (CDS) com função predita ou hipotética, além de RNAt e RNAr (Tabela 1).

Grupos de incompatibilidade plasmidial (inc)

De todos os grupos inc pesquisados, foi detectado o grupo inc HI-2 no DNA plasmidial de ambos isolados. Não houve alinhamento dos primers testados com o DNA cromossômico.

Genes de resistência aos beta-lactâmicos: beta-lactamases.

Considerando DNA cromossômico e plasmidial, foram anotados genericamente dez e nove genes de beta-lactamases em Ec7A e Ec2A, respectivamente, utilizando o Rast. Através das anotações mais acuradas utilizando o Resfinder-beta-lactamases, foram detectados: *bla*_{TEM-1}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{OXA-1} com 100% de similaridade com sequências desses genes depositadas anteriormente (Tabela 2).

Outros genes de resistência a antimicrobianos

Nos isolados Ec7A e Ec2A, foram detectados genes de resistência a macrolídeos (*mac*), quinolonas (*qnr*), tetraciclina (*tetA*), cloranfenicol (*cat*), aminoglicosídeos [*acc*(3)-III, *acc*(6)-I, *ant*(9), *sat*, *aph*(3)-II], fosfomicina (*fosA*), polimixina (*pmr*, *arn*) e sulfonamida (*sulIII*) (Tabela 2).

Sistemas de efluxo

Considerando ambos os isolados, foram detectados os genes relacionados aos sistemas de efluxo de multidrogas de diferentes famílias: RND, ABC, MFS, MATE e DMT (Tabela 2).

Genes de virulência

Em ambos os isolados, no DNA cromossômico foram detectados (a) genes relacionados a sideróforos, (b) genes relacionados a fímbrias, (c) genes relacionados a síntese, modificação, transporte, regulação do biofilme, e (d) genes relacionados à biossíntese, regulação e transporte do ácido colânico capsular. Os genes específicos detectados estão descritos na tabela 2. Nenhum dos genes foi detectado no DNA plasmidial.

Sistema de secreção

Considerando DNA cromossômico de ambos os isolados, houve detecção de SST1, SST2, SST4 e SST6 (Tabela 2). Nenhum dos genes foi detectado no DNA plasmidial.

Análises comparativas entre os dois isolados

Diferenças e semelhanças a nível de genes de resistência, virulência, sistemas de efluxo e secreção estão expostas na tabela 2. Foram detectadas diferenças sutis no quantitativo de todos esses genes alvo, da mesma forma que diferenças qualitativas (genes *acc*(6)-I e *fosA* presentes apenas na amostra Ec2A).

Análises comparativas entre os dois isolados analisados nesse estudo e as cepas depositadas anteriormente no GenBank

A quantidade de proteínas exclusivas dos genomas dos isolados Ec7A, Ec2A, NC_014121, NC_014618, NC_016514, NC_018079, NC_018405 e NC_021046 foram 128, 416, 455, 569, 392, 174, 190 e 188, respectivamente. Considerando o DNA plasmidial o

isolado Ec7A apresentou 192 proteínas exclusivas versus 334 em Ec2A.

Para uma análise comparativa mais aprofundada, dentre as cepas depositadas anteriormente no GenBank, foi selecionada a ATCC 13047 (NC_14121), por também ser um patógeno humano. Para comparação entre os isolados e a cepa de referência ATCC 13047 foi gerado o diagrama de Venn (Figura 1), através do qual é possível pontuar os seguintes dados: 3498 genes foram compartilhados pelos três isolados patogênicos, considerando apenas Ec7A e Ec2A, percebe-se que ambos apresentam 4178 genes em comum, que corresponde a 91% do genoma de Ec7A e 90,28% do genoma de Ec2A. Comparando-os com ATCC 13047, é possível detectar que Ec7A compartilha 3777 genes com a cepa de referência (que corresponde a 82,37% do seu genoma), enquanto Ec2A apresenta 3532 comuns à cepa de referência (que corresponde a 76,32%), logo dentre os isolados, Ec7A é mais similar a ATCC 13047.

Grupos de ortólogos e parálogos que correspondem a genes de beta-lactamases exclusivos dos isolados (Ec7A e Ec2A) e compartilhados com as cepas de referência. Em relação aos grupos de ortólogos/parálogos que correspondem a beta-lactamases, pode-se verificar que alguns (por exemplo: 3033 e 6343) foram exclusivos dos isolados e outros (do ortólogo 1619 ao 533) foram compartilhados entre os isolados e todas as cepas de referência (Tabela 3).

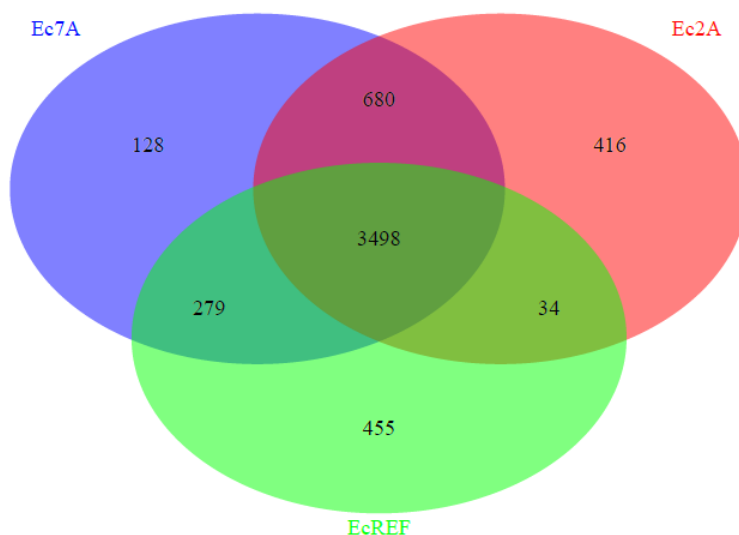


Figura 1. Comparação do DNA cromossômico de Ec7A, Ec2A e ATCC 13047 (EcREF) através do diagrama de Venn. O diagrama de Venn mostra o DNA cromossômico de Ec7A, Ec2A e ATCC 13047 (EcREF) gerado através do EDGAR (BLOM *et al.*, 2009). Regiões sobrepostas representam regiões codificantes comuns compartilhadas entre os genomas. Número fora das regiões sobrepostas indica o número de regiões codificantes

em cada genoma sem homologia a outro genoma sequenciado.

Discussão

Sendo os beta-lactâmicos, uma das principais opções terapêuticas para infecções por enterobactérias, o achado de 9 a 10 genes de beta-lactamases nos isolados é relevante, uma vez que pode tornar esses fármacos ineficazes na prática clínica. Outros autores, através de sequenciamento genômico também têm detectado vários genes de beta-lactamases em *E. cloacae* (REN *et al.*, 2010). Dentre as beta-lactamases detectadas, destacam-se as enzimas *bla*_{TEM-1}, *bla*_{OXA-1} e *bla*_{CTX-M-15}. Desses genes, o de maior importância é o *bla*_{CTX-M-15}, pois codifica uma ESBL, que são enzimas que conferem resistência às cefalosporinas de 3^a e 4^a geração e monobactâmicos (MANZUR *et al.*, 2007; LAGO *et al.*, 2010). Merece ser ressaltada também a localização plasmidial de *bla*_{CTX-M-15}, corroborando a detecção desse determinante de resistência em elementos genéticos móveis o que facilita sua manutenção e disseminação em bactérias gram-negativas (VILLA *et al.*, 2010; QUIROGA *et al.*, 2013; DROPA *et al.*, 2015). *bla*_{TEM-1}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{OXA-1} também já foram relatadas em espécies de *E. cloacae* no Brasil através de PCR (JASKULSKI *et al.*, 2013; NOGUEIRA *et al.*, 2014; PEREIRA *et al.*, 2015; TAVARES *et al.*, 2015).

A corresponsabilidade a outros agentes antimicrobianos além de beta-lactâmicos, como a detectada no presente estudo, também tem sido relatada por outros autores (JASKULSKI *et al.*, 2013; RIBEIRO *et al.*, 2013; QUILES *et al.*, 2015; TAVARES *et al.*, 2015). Isso é particularmente importante porque impõe uma restrição severa nas opções terapêuticas para pacientes com tais infecções. Devemos ressaltar a detecção de genes de resistência à polimixina (*pmr*, *arn*), uma das poucas opções disponíveis atualmente para tratamento de infecções por micro-organismos MDR, entretanto além da positividade para o gene, há a necessidade de presença de mutações para conferir o fenótipo de resistência (DIENE *et al.*, 2012). Estudos posteriores serão conduzidos com o objetivo de analisar a presença de tais mutações e verificar a expressão de resistência. Resistência à polimixina em isolados de *E. aerogenes* e *E. cloacae*, têm sido recentemente detectadas no Brasil (TAVARES *et al.*, 2015).

Dentre os sistemas de efluxo, o mais frequentemente detectado nesse estudo foi o tipo ABC, achado semelhante foi relatado por Xu *et al.* (2012). O número de genes relacionados ao sistema DMT foi semelhante ao detectado por Liu *et al.* (2013), em *E. cloacae* sequenciados genomicamente. É sabido que sistemas de efluxo desempenham papel importante não somente no acúmulo de solutos e substratos desejáveis, mas também,

excretando produtos indesejáveis (POOLMAN, 2002). No entanto, as bombas de efluxo associadas à resistência aos antimicrobianos de importância clínica, geralmente pertencem às famílias RND e MFS (POOLE *et al.*, 2005), também foram detectadas nos isolados do presente estudo, mas não foram relatadas nas outras cepas comparativas (REN *et al.*, 2010; DEANGELIS *et al.*, 2011; HUMANN *et al.*, 2011; XU *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2013). Dentre esses sistemas de efluxo, o tipo RND (Acr-A/acr-B) já foi detectado em *E. cloacae* do Brasil (MOREIRA *et al.*, 2009).

De todos os inc pesquisados, foi detectado o inc HI-2 no DNA plasmidial de ambos os isolados. Esse inc já foi relatado anteriormente por Kremer e Hoffmann (2012), em isolados de *E. cloacae* causador de septicemia em neonatos da Espanha e por Stoesser *et al.* (2015), em isolados de *E. cloacae* recuperados de infecções sanguíneas de neonatos sequenciados genomicamente no Nepal. Um fato que merece ser pontuado é que os isolados patogênicos humanos (Ec7A, Ec2A e ATCC13047) albergaram DNA extracromossômico (plasmídeos), o que reforça a importância desses elementos móveis em isolados patogênicos humanos, porém um plasmídeo de 63Kb também foi detectado em um isolado de *E. cloacae* patógeno de planta (HUMANN *et al.*, 2011).

Além dos fatores de resistência, os fatores de virulência são muito importantes para o estabelecimento da infecção. A presença de múltiplos genes fimbriais em *E. cloacae* reflete a capacidade de colonizar uma ampla variedade de hospedeiros, sítios ou ambientes, além de contribuir para a diversidade das espécies. Ambos isolados analisados no presente estudo apresentaram múltiplos genes fimbriais [fimbrías do tipo I (*fim*), *csg*, fimbrías do tipo IV (*pil*), *Sfm*, sigma-fimbria, beta-sigma, CFA/I e *yad*]. Essa variedade de fímbrias também tem sido relatada em isolados de *E. cloacae* sequenciados por outros autores (REN *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2014).

Dentre outros fatores de virulência, destacam-se os sideróforos para o sucesso da infecção. Estes já foram detectados em *E. cloacae* por diversos autores (LIU *et al.*, 2013; GUPTA *et al.*, 2014; MADHAIYAN *et al.*, 2015). Ec7A e Ec2A apresentaram uma diversidade de genes relacionados a sideróforos, dentre estes enterobactina e aerobactina, que são os sistemas de sideróforos mais prevalentes em enterobactérias (LAWLOR *et al.*, 2007). Em ambos os isolados, enterobactina foi o sideróforo mais frequentemente detectado, reforçando dados da literatura (PODSCHUN *et al.*, 2000; LIU *et al.*, 2013).

Genes de virulência de bactérias patogênicas são frequentemente associados com ilhas de patogenicidade que codifica SST3 ou SST4 adquiridos por transferência horizontal de genes

[DOBRINDT *et al.*, 2004; JUHAS *et al.*, 2009]. Dentre os sistemas de secreção, houve predomínio do SST4 em ambos isolados, este sistema de secreção também foi detectado genomicamente no patógeno humano *E. cloacae* ATCC13047 (LIU *et al.*, 2013), não sendo relatado nas demais cepas comparativas (provenientes de ambiente), porém já detectado em *E. cloacae* de origem ambiental por Wilson *et al.* (2014). SST4 é associado com patogênese de mamíferos e plantas, além de contribuir com a plasticidade genômica das bactérias (CHRISTIE; VOGEL, 2000; CHRISTIE; CASCALES, 2005; CHRISTIE *et al.*, 2005; LIU *et al.*, 2013). Devem ser ressaltado que todos os fatores relacionados com virulência (fímbrias, sideróforos, biofilmes, cápsula e SST) foram detectados no DNA cromossômico dos isolados, resultados semelhantes para *E. cloacae* foram obtidos por Ren *et al.* (2010) e Liu *et al.* (2013).

Em relação às análises comparativas, merece destaque que mesmo os isolados sendo clones pela ERIC-PCR e provenientes do mesmo setor hospitalar apresentaram diferenças quantitativas e qualitativas em relação aos genes alvo da pesquisa. O isolado proveniente de hemocultura (Ec7A) mostrou-se mais resistente (beta-lactamases e sistemas de efluxo) que o isolado proveniente de secreção ocular, o que pode dificultar o tratamento e consequentemente favorecer a evolução para estágios mais severos como sepse e choque séptico.

Podemos concluir que os isolados Ec7A e Ec2A recuperados a partir de infecções em neonatos internados em UTI neonatal apresentaram um vasto arsenal de genes relacionados à resistência a antimicrobianos, à virulência, a diferentes sistemas de efluxo e de secreção o que pode facilitar o estabelecimento da infecção e dificultar o tratamento da mesma. A informação genômica obtida aumenta o conhecimento sobre o patógeno, visto que na literatura predominam dados sobre sequenciamento genômico de *E. cloacae* endófitos ou patogênicos para plantas. Adicionalmente, a análise comparativa dos genomas dos isolados Ec7A e Ec2A e das cepas de *E. cloacae* depositadas anteriormente em banco de dados públicos (GenBank) permite confirmar a diversidade genética entre os componentes do complexo *E. cloacae*, o que explica a facilidade de ser patógeno para diferentes organismos e diferentes sítios corpóreos.

Tabela 1. Características genômicas dos isolados de *Enterobacter cloacae* Ec7A e Ec2A e das cepas de referência utilizadas para as análises comparativas.

	Ec7A(a)	Ec2A(a)	ATCC 13047(b)	ENHKU01(c)	EcWSU1(d)	NCTC 9394(e)	SCF1(f)	SDM(g)
hospedeiro	humano	humano	humano	planta	planta	ND	solo	solo
Característica importante	patógeno hospitalar (sangue)	patógeno hospitalar (secreção ocular)	Patógeno oportunista	endófito	Atividade antagônica contra patógenos de plantas	ND	Potencial industrial	Potencial industrial
Tamanho do cromossomo	4.81Mpb	4.89Mpb	5,31Mpb	4.73Mpb	4,79Mpb	ND	4.81Mpb	4.92Mpb
Conteúdo GC% cromossomo	56.47	56.39	54.79%	55.1%	54.54%	ND	57.02%	55.1%
Quantidade de genes cromossômicos	4733	4804	5166	4445	4632	ND	4449	4539
Genes cromossômicos com função predita	4161	4124	ND	4338	4122	ND	3909	ND
Nº de rRNA	1	3	8	8	8	ND	7	3
Nº de tRNA	24	66	24	82	83	ND	100	53
Plasmídeos	2 plasmídeos:	3 plasmídeos:	2 plasmídeos:	0	1 plasmídeo: 63.653pb	ND	0	ND
	Ec7A_pA: 232.726pb	Ec2A_pA: 60.406pb	pECL_A 200.370 pb					
	Ec7A_pB: 53.323pb	Ec2A_pB: 5436pb	pECL_B, 85.650 pb					
	DNA plasmidial restante: 56.392pb	Ec2A_pC: 241.284pb DNA plasmidial restante: 114.413pb						
Quantidade de genes plasmidiais	416	512	278 e 124	0	ND	ND	0	ND
Genes plasmidiais com função predita	202	244	ND	0	ND	ND	0	ND

(a) Dados deste estudo, (b) Ren *et al.* (2010), (c) Liu *et al.* (2013), (d) Humann *et al.* (2011), (e) dados não publicados, mas disponíveis para download, (f) DeAngelis *et al.* (2011), (g) Xu *et al.* (2012), ND, não determinado

Tabela 2. Caracterização quantitativa e qualitativa dos isolados de *Enterobacter cloacae* Ec7A e Ec2A quanto aos genes de resistência a antimicrobianos, genes de virulência, sistemas de efluxo e sistemas de secreção identificados através do Rast ou Resfinder (beta-lactamases)

	Ec7A		Ec2A	
	cromossomo	plasmídeo	cromossomo	plasmídeo
Genes de beta-lactamases	8 genes (Rast) ^(a) 2 genes (Resfinder) ^(b) : <i>bla</i> _{ACT-7} (ecI05330) e <i>bla</i> _{OXA-1} (ecI46160)	2 genes (Resfinder) ^(b) : <i>bla</i> _{TEM-1} (1ecI00000.CDS.373) <i>bla</i> _{CTX-M-15} (1ecI00000.CDS.369)	7 genes (Rast) ^(a) 2 genes (Resfinder) ^(b) : <i>bla</i> _{ACT-7} (S1.CDS.443) e <i>bla</i> _{OXA-1} (S1.CDS.4772)	2 genes (Resfinder) ^(b) : <i>bla</i> _{TEM-1} (S1.CDS.291) <i>bla</i> _{CTX-M-15} (S1.CDS.295)
Genes de resistência a outras classes de antimicrobianos	16 genes: Mac (4 cópias), Qnr (1 cópia), tetA (1 cópia), cat (1 cópia), acc(3)-III (1 cópia), <i>ant</i> (9) (1 cópia), sat (1 cópia), pmr (3 cópias), arn (2 cópias), <i>sulI</i> (1 cópia)	1 gene: <i>aph</i> (3)-II (2 cópias)	22 genes: Mac (4 cópias), Qnr (1 cópia), tetA (1 cópia), cat (3 cópias), acc(3)-III (1 cópia), <i>ant</i> (9) (2 cópias), sat (2 cópias), pmr (4 cópias), arn (1 cópia), <i>sulI</i> (1 cópia), acc(6)-I (1 cópia), <i>fosA</i> (1 cópia)	1 gene: <i>aph</i> (3)-II (2 cópias)
Sistemas de efluxo	205 genes: ABC (167), RND (18), DMT (10), MFS (9), MATE (1)	2 genes: RND (1), DMT (1)	186 genes: ABC (156), RND (15), DMT (9), MFS (5), MATE (1)	-
Genes de virulência: sideróforos	33 genes: Sideróforo (7), Enterobactina (15), Aerobactina (6), TonB (3), bacterioferritina (2)	-	34 genes: Sideróforo (7), Enterobactina (15), Aerobactina (6), TonB (4), bacterioferritina (2),	-
Genes de virulência: fimbrias	66 genes: Fimbrias (10), (<i>fim</i>) (25), csg (7), pil (6), sfm (6), sigma-fimbria (5), beta-sigma (3), CFA/I (4)	-	65 genes: Fimbrias (10), (<i>fim</i>) (22), csg (6), pil (8), sfm (7), sigma-fimbria (5), beta-sigma (3), CFA/I (4)	-
Genes de virulência: Biofilme e cápsula	15 genes: Yad (4), pga (4), bssR (1), Rcs (5), YegH (1)	-	16 genes: Yad (4), pga (4), bssR (1), Rcs (5), YegH (1), YjgK (1)	-
Sistemas de secreção	35 genes: Secreção geral (11), SST4 (imp e vas) (15), SST1 (Lap, Lss e TolC) (7), SST2 (1), SST6 (icmF) (1)	-	38 genes: Secreção geral (11), SST4 (imp e vas) (20), SST1 (Lap, Lss e TolC) (5), SST2 (1), SST6 (icmF) (1)	-

(a) genes anotados genericamente através do Rast; (b) genes anotados acuradamente através do Resfinder-beta-lactamase

Tabela 3. Grupos de ortólogos e parálogos que correspondem a genes de beta-lactamases exclusivos dos isolados de *Enterobacter cloacae* Ec7A e Ec2A e compartilhados com as cepas de referência

Ortólogo/ parálogo	Proteína*	Ec7A	Ec2A	NC_ 014121	NC_ 014618	NC_ 016514	NC_ 018079	NC_ 018405	NC_ 021046
1619	ampC	+	+	+	+	+	+	+	+
1399	“Metal-dependent hydrolases of the beta-lactamase superfamily I; PhnP protein”	+	+	+	+	+	+	+	+
710	“beta-lactamase-like protein”	+	+	+	+	+	+	+	+
830	“Metallo-beta-lactamase superfamily protein PA0057”	+	+	+	+	+	+	+	+
1732	1.”beta-lactamase-like protein” 2.”L-ascorbate-6-phosphate lactonase”	+	+	+	+	+	+	+	+
178	1.”Zn-dependent hydrolases” 2.”organophosphate pesticide hydrolase” 3.beta-lactamase	+	+	+	+	+	+	+	+
241	1.”Outer membrane protein” 2.”beta-lactamase domain-containing protein”	+	+	+	+	+	+	+	+
533	1. “Hypothetical metal-binding enzyme, YcbL homolog” 2. “beta-lactamase-like protein”	+	+	+	+	+	+	+	+
3110	“Beta-lactamase class C and other penicillin binding proteins”	+	+	+	-	+	+	+	+
4532	beta-lactamase	+	+	-	+	-	-	-	+
4023	beta-lactamase	-	-	-	+	+	-	-	+
3033	<i>bla</i> _{TEM-1}	+	+	-	-	-	-	-	-
	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	+	+	-	-	-	-	-	-
6343	<i>bla</i> _{OXA-1}	+	+	-	-	-	-	-	-

* Anotada genericamente através do Rast ou acuradamente através do Resfinder

Referências

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v.215, p.403-410, 1990.

Bergstrom CT, Lipsitch M, Levin BR. Natural selection, infectious transfer and the existence conditions for bacterial plasmids. **Genetics**, v.155, p.1505-1519, 2000.

Blom J, Albaum SP, Doppmeier D, Pühler A, Vorhölter FJ, Zakrzewski M, Goesmann A. EDGAR: a software framework for the comparative analysis of prokaryotic genomes. **BMC Bioinformatics**, v.10, p.154, 2009.

Cabral AB, Melo RCA, Maciel MAV, Lopes ACS. Multidrug resistance genes, including *bla*_{KPC} and *bla*_{CTX-M-2}, among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45(5), p.572-578, 2012.

Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. **Journal of Microbiological Methods**, v.63, p.219-228, 2005.

Christie PJ, Vogel JP. Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. **Trends in Microbiology**, v.8, p.354-360, 2000.

Christie PJ, Cascales E. Structural and dynamic properties of bacterial type IV secretion systems (review). **Molecular Membrane Biology**, v.22, p.51-61, 2005.

Christie PJ, Atmakuri K, Krishnamoorthy V, Jakubowski S, Cascales E. Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems. **Annual Review of Microbiology**, v.59, p.451-485, 2005.

Darling AE, Tritt A, Eisen JA, Facciotti MT. Mauve assembly metrics. **Bioinformatics**, v.27(19), p.2756-2757, 2011.

Davin-Regli A, Pagès J-M. *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. **Frontiers in Microbiology**, v.6, p.392, 2015.

DeAngelis KM, D'Haeseleer P, Chivian D, Fortney JL, Khudyakov J, Simmons B, Woo H, Arkin AP, Davenport KW, Goodwin V, Chen A, Ivanova N, Kyrpides NC, Mavromatis K, Woyke T, Hazen TC. Complete genome sequence of “*Enterobacter lignolyticus*” SCF1. **Standards in Genomic Sciences**, v.5, p.69-85, 2011.

Diene SM, Merhej V, Henry M, Filali AE, Roux V, Robert C, Azza S, Gavory F, Barbe V, La Scola B, Raoult D, Rolain JM. The Rhizome of the Multidrug-Resistant *Enterobacter aerogenes* Genome Reveals How New “Killer Bugs” Are Created because of a Sympatric Lifestyle. **Molecular Biology and Evolution**, v.30(2), p.369-383, 2012.

Dobrindt U, Hochhut B, Hentschel U, Hacker J. Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. **Nature Reviews Microbiology**, v.2, p. 414-424, 2004.

Dropa M, Balsalobre LC, Lincopan L, Matté GR, Matté MH. Complex class 1 integrons harboring CTX-M-2-encoding genes in clinical *Enterobacteriaceae* from a hospital in Brazil. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v.9(8), p.890-897, 2015.

Duan H, Chai T, Liu J, Zhang X, Qi C, Gao J, Wang Y, Cai Y, Miao Z, Yao M, Schlenker G. Source identification of airborne *Escherichia coli* of swine house surroundings using ERIC-PCR and REP-PCR. **Environmental Research**, v.109, p.511-517, 2009.

Filloux A, Hachani A, Bleves S. The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes. **Microbiology**, v.154, p.1570-1583, 2008.

Francia MV, Varsaki A, Garcillan-Barcia MP, Latorre A, Drainas C, de la Cruz FA. Classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids. **FEMS Microbiology Reviews**, v.28, p.79-100, 2004.

Gillespie JJ, Phan IQH, Scheib H, Subramanian S, Edwards TE, Lehman SS, Piitulainen H, Sayeedur Rahman M, Rennoll-Bankert KE, Staker BL, Taira S, Stacy R, Myler PJ, Azad AF, Pulliainen AT. Structural insight into how bacteria prevent interference between multiple divergent type IV secretion systems. **mBio**, v.6(6), p.e01867-15, 2015.

Gupta A, Gopal M, Thomas GV, Manikandan V, Gajewski J, Thomas G, Seshagiri S, Schuster SC, Rajesh P, Gupta R. Whole Genome Sequencing and Analysis of Plant Growth Promoting Bacteria Isolated from the Rhizosphere of Plantation Crops Coconut, Cocoa and

Arecanut. **PLoS ONE**, v.9(8): e104259, 2014.

Humann JL, Wildung M, Cheng C-H, Lee T, Stewart JE, Drew JC, Triplett EW, Main D, Schroeder BK. Complete genome of the onion pathogen *Enterobacter cloacae* EcWSU1. **Standards in Genomic Sciences**, v.5. p.279-286, 2011.

Jaskulski MR, Medeiros BC, Borges JV, Zalewsky R, Fonseca MEC, Marinowic DR, Rocha MP, Nodari P, Machado DC. Assessment of extended-spectrum β -lactamase, KPC carbapenemase and porin resistance mechanisms in clinical samples of *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter* spp. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.42, p. 76-79, 2013.

Juhas M, van der Meer JR, Gaillard M, Harding RM, Hood DW, Crook DW. Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. **FEMS Microbiology Reviews**, v.33, p. 376-393, 2009.

Kremer NA, Hoffmann H. Subtractive Hybridization Yields a Silver Resistance Determinant Unique to Nosocomial Pathogens in the *Enterobacter cloacae* Complex. **Journal of Clinical Microbiology**, v.50(10), p.3249-3257, 2012.

Lago A, Fuentefria SR, Fuentefria DB. Enterobactérias produtoras de ESBL em Passo Fundo, Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43 (4), p.430-434, 2010.

Lawlor MS, O'Connor C, Miller VL. Yersiniabactin is a virulence factor for *Klebsiella pneumoniae* during pulmonary infections. **Infections and Immunity**, v.75(3), p.1463-1472, 2007.

Leverstein-van Hall MA, Blok HE, Paauw A, Fluit AC, Troelstra A, Mascini EM, Bonten MJ, Verhoef J. Extensive hospital-wide spread of a multidrug-resistant *Enterobacter cloacae* clone, with late detection due to a variable antibiogram and frequent patient transfer. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p.518-524, 2006.

Li L, Stoeckert CJ Jr, Roos DS. OrthoMCL: identification of ortholog groups for eukaryotic genomes. **Genome Research**, v.13(9), p.2178-89, 2003.

Liu WY, Chung KM, Wong CF, Jiang JW, Hui RK, Leung FC. Complete genome sequence of the endophytic *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* strain ENHKU01. **Journal of Bacteriology**, v.194, p. 5965, 2012.

Liu W-Y, Wong C-F, Chung KM-K, Jiang J-W, Leung FC-C. Comparative Genome Analysis of *Enterobacter cloacae*. **PLoS ONE**, v.8(9): e74487, 2013.

Madhaiyan M, Peng N, Ji L. Complete genome sequence of *Enterobacter* sp. strain R4-368, an endophytic N-fixing gammaproteobacterium isolated from surface-sterilized roots of *Jatropha curcas* L. **Genome Announcements**, v.1(4), p:e00544-13, 2013.

Manzur A, Tubau F, Pujol M, Calatayud L, Dominguez MA, Pena C, Sora M, Gudiol F, Ariza J. Nosocomial Outbreak Due to Extended-Spectrum-Beta-Lactamase- Producing *Enterobacter cloacae* in a ardiothoracic Intensive Care Unit. **Journal of clinical microbiology**, v. 45 (8), p. 2365–2369, 2007.

Mokracka J, Koczura R, Kaznowski A. Yersiniabactin and other siderophores produced by clinical isolates of *Enterobacter* spp. and *Citrobacter* spp. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.40, p. 51-55, 2004.

Moreira MAS, Rodrigues PPCF, Tomaz RS, de Moraes CA. Multidrug efflux systems in *Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae* obtained from wholesome broiler carcasses. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, p.241-247, 2009.

Nogueira KD, Paganini MC, Conte A, Cogo LL, Taborda de Messias Reason I, da Silva MJ, Dalla-Costa LM. Emergence of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacter* spp. in patients with bacteremia in a tertiary hospital in southern Brazil. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v.32(2), p.87-92, 2014.

Pereira PS, Borghi M, Albano RM, Lopes JCO, Silveira MC, Marques EA, Oliveira JCR, Asensi MD, Carvalho-Assef APD'A. Coproduction of NDM-1 and KPC-2 in *Enterobacter hormaechei* from Brazil. **Microbial Drug Resistance**, v.21(2), p.234-236, 2015.

Podschun R, Fischer A, Ullman U. Expression of putative virulence factors by clinical isolates of *Klebsiella planticola*. **Journal of Medical Microbiology**, v.49(2), p.115-119, 2000.

Poole K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.56, p.20-51, 2005.

Poolman B. Transporters and their roles in LAB cell physiology. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v.82, p.147-164, 2002.

Quiles MG, Rocchetti TT, Fehlberg LC, Kusano EJ, Chebabo A, Pereira RM, Gales AC, Pignatari AC. Unusual association of NDM-1 with KPC-2 and armA among Brazilian Enterobacteriaceae isolates. **Brazilian Journal of Medical and Biology Research**, v.48(2), p.174-7, 2015.

Quiroga MP, Arduino SM, Merkier AK, Quiroga C, Petroni A, Argentinian Integron Study Group, Roy PH, Centrón D. Distribution and functional identification of complex class 1 integrons. *Infection*, **Genetics and Evolution**, v.19, p. 88-96, 2013.

Ren Y, Ren Y, Zhou Z, Guo X, Li Y, Feng L, Wang L. Complete Genome Sequence of *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* Type Strain ATCC 13047. **Journal of Bacteriology**, v.192(9), p. 2463-2464, 2010.

Ribeiro VB, Andrade LN, Linhares AR, Barin J, Darini ALC, Zavascki AP, Barth AL. Molecular characterization of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing isolates in southern Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, p.1721-1727, 2013.

Sandkvist M. Type II Secretion and Pathogenesis. **Infection and Immunity**, v.69(6), p.3523-3535, 2001.

Stoesser N, Sheppard AE, Shakya M, Sthapit B, Thorson S, Giess A, Kelly D, Pollard AJ, Peto TEA, Walker AS, Crook DW. Dynamics of MDR *Enterobacter cloacae* outbreaks in

a neonatal unit in Nepal: insights using wider sampling frames and next-generation sequencing. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.70, p.1008-1015, 2015.

Taghavi S, Wu X, Ouyang L, Zhang YB, Stadler A, McCorkle S, Zhu W, Maslov S, van der Lelie D. Transcriptional Responses to Sucrose Mimic the Plant-Associated Life Style of the Plant Growth Promoting Endophyte *Enterobacter* sp. 638. **PLoS ONE**, v.10(1), p. e0115455, 2015.

Tavares CP, Pereira PS, de Andrade Marques E, Faria Jr. C, de Souza MPAH, de Almeida R, Alves CFM, Asensi MD, D'Alincourt Carvalho-Assef AP. Molecular epidemiology of KPC-2-producing Enterobacteriaceae (non-Klebsiella pneumoniae) isolated from Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, V.82, P.326-330, 2015.

Villa L, García-Fernandez A, Fortini D, Carattoli A. Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.65, p.2518-2529, 2010.

Wang D, Han CS, Dichosa AEK, Gleasner CD, Johnson SL, Daligault HE, Davenport KW, Li P-E, Pierson EA, Pierson LS, III. Draft genome sequence of *Enterobacter cloacae* strain S611. **Genome Announcements**, v.2(6), p.00710-14, 2014.

Wilson JG, French WT, Lipzen A, Martin J, Schackwitz W, Woyke T, Shapiro N, Bullard JW, Champlin FR, Donaldson JR. Draft genome sequence of *Enterobacter cloacae* strain JD6301. **Genome Announcements**, v.2(3):e00381-14, 2014.

Xu Y, Wang A, Tao F, Su F, Tang H, Ma C, Xua P. Genome Sequence of *Enterobacter cloacae* subsp. *dissolvens* SDM, an Efficient Biomass-Utilizing Producer of Platform Chemical 2,3-Butanediol. **Journal of Bacteriology**, v.194(4), p.897-898, 2012.

Zerbino DR, Birney E. Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. **Genome Research**. v.18, p.821-829, 2008.

6. CONCLUSÕES

- Os isolados de *E. aerogenes* e *E. cloacae* analisados, provenientes de infecção e colonização de pacientes de um hospital público de Recife-PE, apresentaram altas taxas de positividade para o gene *bla*_{CTX-M}, codificante de ESBL, como também para o gene *bla*_{KPC}, que codifica carbapenemase. As altas taxas para ESBL e carbapenemases detectadas no presente estudo podem ser justificadas pela disseminação clonal apresentada pelos isolados de ambas as espécies.
- A detecção de *bla*_{CTX-M-15} em ambas as espécies corrobora a emergência dessa variante de CTX-M no Brasil e sua localização plasmidial em *E. cloacae* pode facilitar a manutenção e disseminação desse gene em bactérias gram-negativas.
- A detecção de *bla*_{KPC-2} em *E. aerogenes* e *E. cloacae*, reforça a variante mais frequente de KPC no Brasil, e sua localização cromossômica em *E. aerogenes*, mesmo não sendo frequentemente relatada, sugere que o transposon associado ao gene *bla*_{KPC}, por se tratar de elemento móvel, pode estar inserido tanto em plasmídeos como no cromossomo dessa espécie.
- Foi verificada disseminação clonal dos isolados de *E. aerogenes* e *E. cloacae* no hospital analisado. Apesar dos isolados apresentarem relação clonal pela ERIC-PCR, apresentaram diferentes perfis plasmidiais, diferentes perfis de resistência e diferentes conteúdos de genes de resistência. Também foi detectado mesmo perfil plasmidial com diferentes perfis de resistência, isso pode ocorrer porque um mesmo plasmídeo pode ser portador de vários genes ou não apresentar genes de resistência. Sendo detectado também, mesmo perfil de resistência com diferentes perfis plasmidiais, isso pode ocorrer devido à disseminação de genes de resistência associados a elementos móveis. A persistência do clone de *E. aerogenes*, positivo para *bla*_{KPC}, como também, de *E. cloacae*, positivo para *bla*_{CTX-M} no ano seguinte, no mesmo hospital, reforça a necessidade de instituir rigorosos métodos de detecção e consequentemente controle da disseminação de isolados MDR em ambiente hospitalar.
- O sequenciamento genômico mostrou a presença de 9 a 12 genes de beta-lactamases

em *Enterobacter* spp. o que pode tornar os beta-lactâmicos ineficazes na prática clínica. Adicionalmente, a detecção adicional de genes que conferem resistência a outras classes de antimicrobianos (aminoglicosídeos, tetraciclinas, cloranfenicol, quinolônicos, sulfonamidas, trimetoprim e polimixina) frequentemente utilizados na prática clínica, impõe uma restrição severa nas opções terapêuticas para pacientes com tais infecções.

- Com relação aos determinantes de virulência, foi detectada a presença de múltiplos e variados genes fimbriais em *Enterobacter* spp., refletindo a capacidade das espécies colonizarem uma ampla variedade de hospedeiros, sítios ou ambientes, além de contribuir para a diversidade dessas espécies. Da mesma forma, foram detectados, múltiplos sistemas de sideróforos nos isolados, podendo beneficiar a bactéria, uma vez que podem funcionar em diferentes ambientes no hospedeiro. A detecção principalmente do sideróforo enterobactina, da adesina fimbrial do tipo I, além do sistema de secreção tipo 4 e do sistema de efluxo ABC reforça dados da literatura de serem estes os tipos mais comuns dentre sideróforos, adesinas fimbriais, sistemas de secreção e sistemas de efluxo. Adicionalmente, a localização cromossômica, detectada no presente estudo, desses fatores de virulência era esperada, uma vez que, fatores de virulência são comumente associados ao cromossomo.
- Em relação às análises comparativas, merece destaque que mesmo os isolados de *E. aerogenes* (Ea5A e Ea7A) e *E. cloacae* (Ec2A e Ec7A) sendo clones pela ERIC-PCR e provenientes do mesmo setor hospitalar, apresentaram diferenças quantitativas e qualitativas em relação aos genes alvo da pesquisa, mostrando que não são idênticos geneticamente.
- Dentre os isolados de *E. aerogenes*, o isolado de colonização (Ea5A) apresentou cópias extras de mecanismos de resistência a aminoglicosídeos, sistema de efluxo ABC, além de SST4. Cópias adicionais de genes podem resultar na expressão aumentada desses genes no isolado. Adicionalmente, foi visto que o isolado Ea5A, proveniente de colonização, apresentou também genes de virulência potenciais para estabelecer a infecção, além de elementos genéticos móveis capazes de transmitir diversos genes para outras bactérias presentes na microbiota entérica do paciente, o

que reforça a importância da colonização no contexto de IRAS.

- Dentre os isolados de *E. cloacae*, foi visto que o isolado Ec7A, proveniente de hemocultura, mostrou-se maior número de genes relacionados a resistência (beta-lactamases e sistemas de efluxo) que o isolado Ec2A, proveniente de secreção ocular, o que pode dificultar o tratamento e consequentemente favorecer a evolução para estágios mais severos como sepse e choque séptico.
- O vasto arsenal de genes de resistência e virulência albergados pelos isolados de *E. aerogenes* e *E. cloacae* pode facilitar o estabelecimento da infecção e dificultar o tratamento.

Biendo M, Canarelli B, Thomas D, Rousseau F, Hamdad F, Adjide C, Laurans G, Eb

F. Successive Emergence of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing and Carbapenemase-Producing *Enterobacter aerogenes* Isolates in a University Hospital. **Journal of clinical microbiology**, v. 46 (3), p. 1037-1044, 2008.

Bogaerts P, Galimand M, Bauraing C, Deplano A, Vanhoof R, De Mendonca R, Rodriguez-Villalobos H, Struelens M, Glupczynski Y. Emergence of ArmA and RmtB aminoglycoside resistance 16S rRNA methylases in Belgium. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.59, p.459-464, 2007.

Bonnet R, Dutor C, Sampaio JL, Chanal C, Sirot D, Labia R, De Champs C, Sirot J. Novel cefotaximase (CTX-M-16) with increased catalytic efficiency due to substitution Asp-240→Gly. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, p.2269-2275, 2001.

Bratu S, Landman D, Alam M, Tolentino E, Quale J. Detection of KPC Carbapenem-Hydrolyzing Enzymes in *Enterobacter* spp. from Brooklyn, New York. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49 (2), p. 776–778, 2005.

Brettin T, Davis JJ, Disz T, Edwards RA, Gerdes S, Olsen GJ, Olson R, Overbeek R, Parrello B, Pusch GD, Shukla M, Thomason JÁ, Stevens R, Vonstein V, Wattam AR, Xia F. RASTtk: A modular and extensible implementation of the RAST algorithm for building custom annotation pipelines and annotating batches of genomes. **Scientific Reports**, v.10(5), p.8365, 2015.

Bush K, Jacoby GA. Updated Functional Classification of β -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.54, p.969-976, 2010.

Cabral AB, Melo RCA, MacielMAV, Lopes ACS. Multidrug resistance genes, including *bla*_{KPC} and *bla*_{CTX-M-2}, among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45(5), p.572-578, 2012.

Cabral AB, Maciel MAV, Barros JF, Antunes MM, Lopes ACS. Detection of *bla*_{KPC-2} in *Proteus mirabilis* in Brazil, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.48(1), p.94-95, 2015.

Cantón R, Oliver A, Coque TM, Varela MC, Pérez-Díaz JC, Baquero F. Epidemiology of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Enterobacter* Isolates in a Spanish Hospital during a 12-Year Period. **Journal of clinical microbiology**, v. 40 (4), p. 1237–1243, 2002.

Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. **Journal of Microbiological Methods**, v.63, p.219-228, 2005.

Cassettari VC, Silveira IR, Balsamo AC, Franco F. Outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in an intermediate-risk neonatal unit linked to onychomycosis in a healthcare worker. **Jornal de Pediatria**, v.82, p.313-316, 2006.

Castanheira M, Toleman M, Jones RN, Schmidt FJ, Walsh TR. Molecular characterization of a β -lactamase gene, *bla*_{GIM-1}, encoding a new subclass of metallo- β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemoterapy**, v.48, p.4654-4661, 2004.

Castanheira M, Mendes RE, Walsh TR, Gales AC, Jones RN. Emergence of the Extended-Spectrum β -Lactamase GES-1 in a *Pseudomonas aeruginosa* Strain from Brazil: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48(6), p. 2344-2345, 2004b.

Castanheira M, Sader HS, Jones RN, Debbia E, Picão RC, Gales AC. In71, an *Enterobacter cloacae* bla_{VIM-1} carrying integron related to In70.2 from Italian *Pseudomonas aeruginosa* isolates: a SENTRY Antimicrobial Surveillance Program report. **Microbial Drug Resistance**, v. 13(2), p. 130-134, 2007.

Chagas TP, Seki LM, Cury JC, Oliveira JA, Dávila AM, Silva DM, Asensi MD. Multiresistance, beta-lactamase-encoding genes and bacterial diversity in hospital wastewater in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111(3), p.572-581, 2011.

Chen LR, Zhou HW, Cai JC, Zhang R, Chen GX. Detection of plasmid-mediated IMP-1 metallo- β -lactamase and quinolone resistance determinants in an ertapenem-resistant *Enterobacter cloacae* isolate. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 10(5), p.348-354, 2009.

Chmelnitsky I, Navon-Venezia S, Strahilevitz J, Carmeli Y. Plasmid-Mediated *qnrB2* and Carbapenemase Gene *bla*_{KPC-2} Carried on the Same Plasmid in Carbapenem-Resistant Ciprofloxacin-Susceptible *Enterobacter cloacae* Isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52 (8), p. 2962–2965, 2008.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. CLSI document M100-S23. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA., 2013.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-fifth informational supplement. CLSI document M100-S25. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA., 2015.

Darling AE, Tritt A, Eisen JA, Facciotti MT. Mauve assembly metrics. **Bioinformatics**, v.27(19), p.2756-2757, 2011.

Davin-Regli A, Pagès J-M. *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. **Frontiers in Microbiology**, v.6, p.392, 2015.

de Cássia Andrade Melo R, de Barros EM, Loureiro NG, de Melo HR, Maciel MA, Souza Lopes AC. Presence of fimH, mrkD, and irp2 virulence genes in KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Recife-PE, Brazil. **Current Microbiology**, v.69(6), p.824-831, 2014.

Diene SM, Merhej V, Henry M, Filali AE, Roux V, Robert C, Azza S, Gavory F, Barbe V, La Scola B, Raoult D, Rolain JM. The Rhizome of the Multidrug-Resistant *Enterobacter aerogenes* Genome Reveals How New “Killer Bugs” Are Created because of a Sympatric Lifestyle. **Molecular Biology and Evolution**, v.30(2), p.369-383, 2012.

Dobrindt U, Hochhut B, Hentschel U, Hacker J. Genomic islands in pathogenic and

environmental microorganisms. **Nature Reviews Microbiology**, v.2, p. 414-424, 2004.

Domenico P, Marx JL, Schoch PE, Cunha BA. Rapid plasmid DNA isolation from mucoid Gram-negative bacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, v.30, p.2859-2863, 1992.

Dong F, Xu Xi-wei, Song Wen-qi, Lü Ping, Yu Sang-jie, Yang Yong-hong, Shen Xu-zhuang. Characterization of multidrug-resistant and metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a paediatric clinic in China. **Chinese Medical Journal**, v.121, p.1611-1616, 2008.

Dropa M, Balsalobre LC, Lincopan N, Mamizuka EM, Murakami T, Cassettari VC, Franco F, Guida SM, Balabakis AJ, Passadore LF, Santos SR, Matté GR, Matté MH. Extended-spectrum beta-lactamases among *Enterobacteriaceae* isolated in a public hospital in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina tropical de São Paulo**, v.51, p.203-209, 2009.

Dropa M, Balsalobre LC, Lincopan N, Mamizuka EM, Cassettari VC, Matté GR, Matté MH. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carrying the novel extended-spectrum β -lactamase gene variants *bla*_{SHV-40}, *bla*_{TEM-116} and the class 1 integron-associated *bla*_{GES-7} in Brazil. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16(6), p. 630-632, 2010.

Duan H, Chai T, Liu J, Zhang X, Qi C, Gao J, Wang Y, Cai Y, Miao Z, Yao M, Schlenker G. Source identification of airborne *Escherichia coli* of swine house surroundings using ERIC-PCR and REP-PCR. **Environmental Research**, v.109, p.511-517, 2009.

Edwards DJ, Holt KE. Beginner's guide to comparative bacterial genome analysis using next-generation sequence data. **Microbial and Informatics Experimentation**. v.3, p.2, 2013.

Feizabadi MM, Farahani AS, Rahmati M, Asadi S. Phenotypic characterization and plasmid analysis of *Klebsiella pneumoniae* strains from Iranian patients R. Ci. méd. biol., Salvador, v.7, p.273-279, 2008.

Filloux A, Hachani A, Bleves S. The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes. **Microbiology**, v.154, p.1570-1583, 2008.

Gales AC, Menezes LC, Silbert S, Sader HS. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenêmicos-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- β -lactamase. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.52, p.699-702, 2003.

Giakkoupi P, Tzouvelekis LS, Tsakris A, Loukova V, Sofianou D, Tzelepi E. IBC-1, a novel integron-associated class A β -lactamase with extended-spectrum properties produced by an *Enterobacter cloacae* clinical strain. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.44, p. 2247-2253, 2000.

Gillespie JJ, Phan IQH, Scheib H, Subramanian S, Edwards TE, Lehman SS, Piitulainen H, Sayeedur Rahman M, Rennoll-Bankert KE, Staker BL, Taira S, Stacy R, Myler PJ, Azad AF, Pulliainen AT. Structural insight into how bacteria prevent interference between multiple divergent type IV secretion systems. **mBio**, v.6(6), p.e01867-15, 2015.

Gonçalves CR, Vaz TMI, Leite D, Pisani B, Simões M, Prandi MAM, Rocha MMM, Cesar PC, Trabasso P, Nowakowski AV, Irino K. Molecular epidemiology of a nosocomial

outbreak due to *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter agglomerans* in Campinas, São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 42 (1), p. 1-7, 2000.

González-Mejia EB, Valenzuela EM, Mantilla-Anaya JR, Leal-Castro AL, Saavedra-Trujillo CH, Eslava-Schmalbach J, Sierra-Rodríguez P. Resistencia a Cefepime en Aislamientos de *Enterobacter cloacae* provenientes de hospitales de Bogotá, Colombia, **Revista de Saúde pública**, v. 8 (2), p.191-199, 2006.

Goyal A, Prasad KN, Prasad A, Gupta S, Ghoshal U, Ayyagari A. Extended spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* & *Klebsiella pneumoniae* & associated risk factors. **Indian Journal of Medical Research**, v.129, p. 695-700, 2009.

Gupta V. Metallo beta lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v.17, p.131-143, 2008.

Gupta A, Gopal M, Thomas GV, Manikandan V, Gajewski J, Thomas G, Seshagiri S, Schuster SC, Rajesh P, Gupta R. Whole Genome Sequencing and Analysis of Plant Growth Promoting Bacteria Isolated from the Rhizosphere of Plantation Crops Coconut, Cocoa and Arecanut. **PLoS ONE**, v.9(8): e104259, 2014.

Heritage J, M'Zali FH, Gascoyne-Binzi D, Hawkey PM. Evolution and spread of SHV extended-spectrum β -lactamases in Gram negative bacteria. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, v.44, p.309-318, 1999.

Hirakata Y, Matsuda J, Miyazaki Y, Kamihira S, Kawakami S, Miyazawa Y, et al. Regional variation in the prevalence of extended-spectrum β -lactamase-producing clinical isolates in the Asia-Pacific region (SENTRY 1998-2002). **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v.52, p.323-329, 2005.

Hossain A, Ferraro MJ, Pino RM, Dew RB, Moland ES, Lockhart TJ, Thomson KS, Goering RV, Hanson ND. Plasmid-Mediated Carbapenem-Hydrolyzing Enzyme KPC-2 in an *Enterobacter* sp. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48 (11), p. 4438–4440, 2004.

Iabadene H, Messai Y, Ammari H, Ramdani-Bouguessa N, Lounes S, Bakour R, Arlet G. Dissemination of ESBL and Qnr determinants in *Enterobacter cloacae* in Algeria, **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, p. 133–136, 2008.

Iversen C, Lehner A, Mullane N, Bidlas E, Cleenwerck I, Marugg J, Fanning S, Stephan R, Joosten H. The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov. *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter genomospecies* 1. **BMC Evolutionary Biology**, v. 17, p.7-64, 2007.

Izdebski R, Baraniak A, Herda M, Fiett J, Bonten MJ, Carmeli Y, Goossens H, Hryniewicz W, Brun-Buisson C, Gniadkowski M, MOSAR WP2, WP3 and WP5 Study Groups. MLST reveals potentially high-risk international clones of *Enterobacter cloacae*. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, v.70(1), p.48-56, 2015.

Jácome PR, Alves LR, Cabral AB, Lopes AC, Maciel MA. Phenotypic and molecular characterization of antimicrobial resistance and virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Recife, State of Pernambuco, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.45(6), p. 707-712, 2012.

Jácome PR, Alves LR, Cabral AB, Lopes AC, Maciel MA. First report of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56(9), p. 4990, 2012.

Janda JM, Abbott SL. **The Enterobacteria**, 2nd ed. Washington D.C.: ASM press, 2006, 411p.

Jaskulski MR, Medeiros BC, Borges JV, Zalewsky R, Fonseca MEC, Marinowic DR, Rocha MP, Nodari P, Machado DC. Assessment of extended-spectrum β -lactamase, KPC carbapenemase and porin resistance mechanisms in clinical samples of *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter* spp. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.42, p. 76-79, 2013.

Jeong SH, Lee K, Chong Y, Yum JH, Lee SH, Choi HJ, Kim JM, Park KH, Han BH, Lee SW, Jeong TS. Characterization of a new integron containing VIM-2, a metallo- β -lactamase gene cassette, in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae*. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.51, p.397-400, 2003.

Jeong SH, Bae IK, Lee JH, Sohn SG, Kang GH, Jeon GJ, Kim YH. Molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamases produced by clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* from a Korean Nationwide survey. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, p.2902-2906, 2004.

Jones CH, Tuckman M, Keeney D, Ruzin A, Bradford PA. Characterization and sequence analysis of extended-spectrum- β -lactamase-encoding genes from *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* isolates collected during tigecycline phase 3 clinical trials. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.53, p.465-475, 2009.

Jones RN, Flonta M, Gurler N, Cepparulo M, Mendes RE, Castanheira M. Resistance surveillance program report for selected European nations. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v.78, p.429-436, 2014.

Juhas M, van der Meer JR, Gaillard M, Harding RM, Hood DW, Crook DW. Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. **FEMS Microbiology Reviews**, v.33, p. 376-393, 2009.

Kollef MH. Prevention of hospital-associated pneumonia and ventilator-associated pneumonia. **Critical Care Medicine**, v.32, p.1396-1405, 2004.

Lago A, Fuentefria SR, Fuentefria DB. Enterobactérias produtoras de ESBL em Passo Fundo, Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43 (4), p.430-434, 2010.

Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, Rossolini GM. Cloning and characterization of *bla*_{VIM}, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. **Antimicrobial Agents and**

Chemotherapy, v.43, p.1584-1590, 1999.

Lawlor MS, O'Connor C, Miller VL. Yersiniabactin is a virulence factor for *Klebsiella pneumoniae* during pulmonary infections. **Infections and Immunity**, v.75(3), p.1463-1472, 2007.

Leavitt A, Navon-Venezia S, Chmelnitsky I, Schwaber MJ, Carmeli Y. Emergence of KPC-2 and KPC-3 in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains in an Israeli hospital. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.51, p.3026-3029, 2007.

Lee HS, Jeong HS. Nomenclature of GES-Type Extended-Spectrum β -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49 (5), p. 2148–2150, 2005.

Lee K, Yum JH, Yong D, Lee HM, Kim HD, Docquier JD, Rossolini GM, Chong Y. Novel acquired metallo- β -lactamase gene, *bla*_{SIM-1}, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, p.4485-4491, 2005.

Lee CC, Lee NY, Yan JJ, Lee HC, Chen PL, Chang CM, Wu CJ, Ko NY, Wang LR, Chi CH, Ko, WC. Bacteremia due to Extended-Spectrum- β -Lactamase-producing *Enterobacter cloacae*: Role of Carbapenem Therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54 (9), p. 3551-3556, 2010.

Li L, Stoeckert CJ Jr, Roos DS. OrthoMCL: identification of ortholog groups for eukaryotic genomes. **Genome Research**, v.13(9), p.2178-89, 2003.

Liu G, Ling BD, Xie YE, Lin L, Zeng Y, Zhang X, Lei J. Characterization of CTX-M-22 and TEM-141 Encoded by a single plasmid from a clinical isolate of *Enterobacter cloacae* in China. **Japanese Journal of infection diseases**, v. 60(5), p.295-297, 2007.

Liu G, Ling BD, Zeng Y, Lin L, Xie YE, Lei J. Molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamases produced by clinical isolates of *Enterobacter cloacae* from a Teaching Hospital in China. **Japanese Journal of infection diseases**, v. 61(4), p. 286-289, 2008.

Liu W-Y, Wong C-F, Chung KM-K, Jiang J-W, Leung FC-C. Comparative Genome Analysis of *Enterobacter cloacae*. **PLoS ONE**, v.8(9): e74487, 2013.

Livermore DM, Oakton KJ, Carter MW, Warner M. Activity of ertapenem (MK-0826) versus *Enterobacteriaceae* with potent beta-lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, p.2831-2837, 2001.

Lopes ACS, Rodrigues JF, Clementino MBM, Miranda CAC, Nascimento APA, Morais Júnior MA. Application of PCR ribotyping and tDNA-PCR for *Klebsiella pneumoniae* identification. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.102, p.827-832, 2007.

Lopes ACS, Veras DL, Lima AMS, Melo RCA, Ayala J. *bla*_{CTX-M-2} and *bla*_{CTX-M-28} extended-spectrum β -lactamase genes and class 1 integrons in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.105, p.163-167, 2010.

Luzzaro F, Docquier JD, Colinson C, Endimiani A, Lombardi G, Amicosante G, Rossolini GM, Toniolo A. Emergence in *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* clinical isolates of the VIM-4 metallo- β -lactamase encoded by a conjugative plasmid. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.48(2), p.648-650, 2004.

Machado E, Coque TM, Cantón R, Novais A, Sousa JC, Baquero F, Peixe L. High diversity of extended-spectrum β -lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae from Portugal. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.60, p.1370-1374, 2007.

Madhaiyan M, Peng N, Ji L. Complete genome sequence of *Enterobacter* sp. strain R4-368, an endophytic N-fixing gammaproteobacterium isolated from surface-sterilized roots of *Jatropha curcas* L. **Genome Announcements**, v.1(4), p:e00544-13, 2013.

Mange JP, Stephan R, Borel N, Wild P, Kim KS, Pospischil A, Lehner A. Adhesive properties of *Enterobacter sakazakii* to human epithelial and brain microvascular endothelial cells. **BMC Microbiology**, v.6, p.58, 2006.

Manoharan A, Premalatha K, Chatterjee S, Mathai D, SARI Study Group. Correlation of TEM, SHV and CTX-M extended-spectrum β lactamases among *Enterobacteriaceae* with their *in vitro* antimicrobial susceptibility. **Indian Journal Medical Microbiology**, v. 29, p. 161-164, 2011.

Manzur A, Tubau F, Pujol M, Calatayud L, Dominguez MA, Pena C, Sora M, Gudiol F, Ariza J. Nosocomial Outbreak Due to Extended-Spectrum-Beta-Lactamase- Producing *Enterobacter cloacae* in a cardiothoracic Intensive Care Unit. **Journal of clinical microbiology**, v. 45 (8), p. 2365–2369, 2007.

Marchaim D, Navon-Venezia S, Schwaber MJ, Carmeli, Y. Isolation of Imipenem-Resistant *Enterobacter* Species: Emergence of KPC-2 Carbapenemase, Molecular Characterization, Epidemiology, and Outcomes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52 (4), p. 1413-1418, 2008.

Marchiaro P, Ballerini V, Spalding T, Cera G, Mussi MA, Moran-Barrio J, Vila AJ, Viale AM, Limansky ASA. Convenient microbiological assay employing cell-free extracts for the rapid characterization of Gram-negative carbapenemase producers. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.62, p.336-344, 2008.

Markovska RD, Stoeva TJ, Bojkova KD, Mitov IG. Epidemiology and molecular characterization of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacter* spp., *Pantoea agglomerans*, and *Serratia marcescens* isolates from a Bulgarian hospital. **Microbial Drug Resistance**, v.20(2), p.131-137, 2014.

Mendes C, Kiffer C, Segura A, Ribeiro J, Turner P. *Klebsiella pneumoniae* with multiple antimicrobial resistance. **The Brazilian Journal of infectious Diseases**, v.8, p.109-111, 2004a.

Mendes RE, Castanheira M, Pignatari ACC, Gales AC. Metallo- β -lactamases. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.42, p.103-113, 2006.

Miriagou V, Tzouvelekis LS, Rossiter S, Tzelepi E, Angulo FJ, Whichard JM. Imipenem Resistance in a *Salmonella* Clinical Strain Due to Plasmid-Mediated Class A Carbapenemase KPC-2. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, p.1297-1300, 2003.

Miró E, Segura C, Navarro F, Sorlí L, Coll P, Horcajada JP, Álvarez-Lerma F, Salvadó M. Spread of plasmids containing the bla_{VIM-1} and bla_{CTX-M} genes and the qnr determinant in *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, p. 661-665, 2010.

Mokracka J, Kaznowski A, Szarata M, Kaczmarek E. Siderophore-mediated strategies of iron acquisition by extraintestinal isolates of *Enterobacter* spp. **Acta Microbiologica Polonica**, v.52(1), p.81-86, 2003.

Mokracka J, Koczura R, Kaznowski A. Yersiniabactin and other siderophores produced by clinical isolates of *Enterobacter* spp. and *Citrobacter* spp. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.40, p. 51-55, 2004.

Monteiro J, Santos AF, Asensi MD, Peirano G, Gales AC. First Report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.53, p.333-334, 2009.

Naas T, Nordman P, Vedel G, Poyart C. Plasmid-mediated carbapenem hydrolyzing beta-lactamase KPC in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from France. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, p.4423-4424, 2005.

Naas T, Cuzon G, Villegas MV, Lartigue MF, Quinn JP, Nordmann P. Genetic structures at the origin of acquisition of the beta-lactamase bla_{KPC} gene. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, p.1257-1263, 2008.

Navarro-san francisco C, et al. Bacteraemia due to OXA-48-carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*: a major clinical challenge. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19(2), p.E72-79, 2013.

Nogueira KD, Paganini MC, Conte A, Cogo LL, Taborda de Messias Reason I, da Silva MJ, Dalla-Costa LM. Emergence of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacter* spp. in patients with bacteremia in a tertiary hospital in southern Brazil. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v.32(2), p.87-92, 2014.

Nogueira KS, Conte D, Maia FV, Dalla-Costa LM. Distribution of extended-spectrum β -lactamase types in a Brazilian tertiary hospital. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.48(2), p.162-169, 2015.

Olive DM, Bean P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, p.1661-1669, 1999.

Ozgumus OB, Tosun I, Aydin F, Kilic AO. Horizontal dissemination of TEM- and SHV-type beta-lactamase genes carrying resistance plasmids amongst clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, p.636-643, 2008.

Paauw A, Caspers MPM, Schuren, FHJ, Leverstein-van Hall MA, Deletoile A, Montijn RC, Verhoef J, Fluit AC. Genomic diversity within the *Enterobacter cloacae* complex. **PLoS One** 3, e3018, 2008.

Paauw A, Caspers MPM, Leverstein-van Hall MA, Schuren FHJ, Montijn RC, Verhoef J, Fluit AC. Identification of resistance and virulence factors in an epidemic *Enterobacter hormaechei* outbreak strain. **Microbiology**, v.155, p.1478-1488, 2009.

Panopoulou M, Alepopoulou E, Ikonomidis A, Grapsa A, Paspalidou E, Kartali-Ktenidou S. Emergence of VIM-12 in *Enterobacter cloacae*. **Journal of clinical microbiology**, v. 48 (9), p. 3414-3415, 2010.

Patel JB, Rasheed JK, Kitchel B. Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: Activity, Epidemiology, and Laboratory Detection. **Clinical Microbiology Newsletter**, v.1, n.8, 2009.

Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. **Clinical Microbiology Reviews**, v.18, p.657-686, 2005.

Peleg AY, Franklin C, Bell JM, Spelman DW. Dissemination of the Metallo- β -Lactamase Gene *bla*_{IMP-4} among Gram-Negative Pathogens in a Clinical Setting in Australia. **Clinical Infectious Diseases**, v. 41, p. 1549–1556, 2005.

Pellegrino FLPC, Netto-dos Santos KR, Riley LW, Moreira BM. *bla*_{GES} carrying *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a public hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian Journal of Infection Disease**, v.10(4), pp. 251-253, 2006.

Petrella, S, Ziental-Gelus, N, Mayer, C, Renard, M, Jarlier, V, Sougakoff, W. Genetic and structural insights into the dissemination potential of the extremely-broad-spectrum class A beta-lactamase (ESBL) KPC-2 identified in two strains of *Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae* isolated from the same patient in France. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.52, p.3725–3736, 2008.

Pfalleer MA, Acar J, Jones RN, Verhoef J, Turnidge J, Sader HS. Integration of molecular characterization of microorganisms in a global antimicrobial resistance surveillance program. **Clinical Infectious Disease**, v.32, p.156-167, 2001.

Pfeifer Y, Cullik A, Witte W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. **International Journal of Medical Microbiology**, v.300, p.371–379, 2010.

Picão RC, Santos AF, Nicoletti AG, Furtado GH, Gales AC. Detection of GES-5-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, v. 65, n. 4, p. 796-807, 2010.

Pitout JDD, Nordmann P, Laupland KB, Poirel L. Emergence of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in the community. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.56, p.52-59, 2005.

Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clinical Microbiology Reviews**,

v.11(4), p.589-603, 1998.

Podschun R, Fischer A, Ullman U. Characterization of *Klebsiella terrigena* strains from humans: haemagglutinins, serum resistance, siderophore synthesis, and serotypes. **Epidemiology and Infection**, v.125(1), p.71-78, 2000.

Podschun R, Fischer A, Ullman U. Expression of putative virulence factors by clinical isolates of *Klebsiella planticola*. **Journal of Medical Microbiology**, v.49(2), p.115-119, 2000.

Poirel L, Le Thomas I, Naas T, Karim A, Nordmann P. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum β -lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, p. 622-632, 2000.

Poirel L, Weldhagen GF, Naas T, De Champs C, Dove MG, Nordmann P. GES-2, a class A β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. **Antimicrob. Agents and Chemotherapy**, v.45, p. 2598–5603, 2001.

Poirel L, Nordmann P. Nomenclature of GES-Type Extended-Spectrum β -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49 (5), p. 2148–2150, 2005.

Poole K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.56, p.20-51, 2005.

Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v.20, p.440-458, 2007.

Quiles MG, Rocchetti TT, Fehlberg LC, Kusano EJ, Chebabo A, Pereira RM, Gales AC, Pignatari AC. Unusual association of NDM-1 with KPC-2 and armA among Brazilian Enterobacteriaceae isolates. **Brazilian Journal of Medical and Biology Research**, v.48(2), p.174-7, 2015.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ. **Farmacologia** 6^{ed.}, Elsevier, 2006, 920p.

Rasheed JK, Anderson GJ, Yigit H, Quennan AM, Doménech-Sánchez A, Swenson JM, Biddle JW, Ferraro MJ, Jacoby GA, Tenover FC. Characterization of the Extended-Spectrum β -lactamase Reference strain, *Klebsiella pneumoniae* K6 (ATCC 700603), which produces the novel enzyme SHV-18. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.44, p.2382-2388, 2000.

Ren Y, Ren Y, Zhou Z, Guo X, Li Y, Feng L, Wang L. Complete Genome Sequence of *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* Type Strain ATCC 13047. **Journal of Bacteriology**, v. 192(9), p. 2463-2464, 2010.

Ribeiro VB, Andrade LN, Linhares AR, Barin J, Darini ALC, Zavascki AP, Barth AL. Molecular characterization of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing isolates in southern Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, p.1721-1727, 2013.

Robin F, Delmas J, Chanal C, Sirot D, Sirot J, Bonnet R. TEM-109 (CMT-5), a

Natural Complex Mutant of TEM-1 β -lactamase Combining the Amino Acid Substitutions of TEM-6 and TEM-33 (IRT-5). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, p.4443–4447, 2005.

Rocha LA, Vilela CAP, Cezário RC, Almeida AB, Gontijo Filho P. Ventilator-Associated Pneumonia in an Adult Clinical-Surgical Intensive Care Unit of a Brazilian University Hospital: Incidence, Risk Factors, Etiology, and Antibiotic Resistance. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.12 (1), p.80-85, 2008.

Rosen DA, Pinkner JS, Walker JN, Elam JS, Jones JM, Hultgren SJ. Molecular variations in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* *fimH* affect function and pathogenesis in the urinary tract. **Infection and Immunity**, v.76 (7), p.3346-3356, 2008.

Sader HS, Flamm RK, Jones RN. Frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of Gram-negative bacteremia isolates in patients with urinary tract infection: results from United States and European hospitals (2009-2011). **Journal of Chemotherapy**, v.26, p.133-138, 2014.

Saladin M, Bao Cao VT, Lambert T, Donay J, Herrmann J, Ould-Hocine Z, Verdet C, Delisle F, Philippon A, Arlet G. Diversity of CTX-M β -lactamases and their promoter regions from *Enterobacteriaceae* isolated in three Parisian hospitals. **FEMS Microbiology Letters**, v.209, p.161-168, 2002.

Sandkvist M. Type II Secretion and Pathogenesis. **Infection and Immunity**, v.69(6), p.3523-3535, 2001.

Santos DF, Pimenta FC, Alves R, Montalvão ER, Santos DB, Carmo Filho JR. Extended-spectrum β -lactamases producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in two hospitals in Goiânia/Brazil: detection, prevalence, antimicrobial susceptibility and molecular typing. **Brazilian journal of microbiology**, v.39, p.608-612, 2008.

Schjorring S, Struve C, Krogfelt KA. Transfer of antimicrobial resistance plasmids from *Klebsiella pneumoniae* to *Escherichia coli* in the mouse intestine. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.62, p.1086-1093, 2008.

Seki LM, Pereira PS, Conceição MS, Souza MJ, Marques EA, Carballido JM, de Carvalho MES, Assef APDC, Asensi MD. Molecular epidemiology of CTX-M producing *Enterobacteriaceae* isolated from bloodstream infections in Rio de Janeiro, Brazil: emergence of CTX-M-15. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.17(6), p.640-646, 2013.

Shahid M, Malik A, Akram M, Agrawal LM, Khan AU, Agrawal M. Prevalent phenotypes and antibiotic resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* at an Indian tertiary care hospital: plasmid-mediated cefoxitin resistance. **International Journal of Infectious Diseases**, v.12, p.256-264, 2008.

Shankar-Sinha S, Valencia GA, Janes BK, Rosenberg JK, Whitfield C, Bender RA, Standiford TJ, Younger JG. The *Klebsiella pneumoniae* O antigen contributes to bacteremia and lethality during murine pneumonia. **Infection and Immunity**, v. 72, p.1423–1430, 2004.

Sharma J, Ray P, Sharma M. Plasmid profile of ESBLs producing-Gram-negative bacteria and correlation with susceptibility to β -lactam drugs. **Indian journal of pathology and microbiology**, v.53, no.1, 2010.

Shin SH, Kim S, Kim JY, Lee S, Um Y, Oh MK, Kim YR, Lee J, Yang KS. Complete Genome Sequence of *Enterobacter aerogenes* KCTC 2190. **Journal of Bacteriology**, v. 194(9), p. 2373-2374, 2012.

Souza Lopes AC, Rodrigues JF, Morais Júnior MA. Molecular typing of *Klebsiella pneumoniae* isolates from public hospitals in Recife, Brazil. **Microbiological Research**, v.160, p.37-46, 2005.

Stahlhut SG, Chattopadhyay S, Struve C, Weissman SJ, Aprikian P, Libby SJ, Fang FC, Krogfelt KA, Sokurenko EV. Population variability of the *fimH* type 1 fimbrial adhesin in *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Bacteriology**, v. 191(6), p.1941-1950, 2009.

Struve C, Bojer M, Krogfelt KA. Characterization of *Klebsiella pneumoniae* type 1 fimbriae by detection of phase variation during colonization and infection and impact on virulence. **Infection and Immunity**, v.76 (9), p. 4055-4065, 2008.

Struve C, Bojer M, Krogfelt KA. Identification of a Conserved Chromosomal Region Encoding *Klebsiella pneumoniae* Type 1 and Type 3 Fimbriae and Assessment of the Role of Fimbriae in Pathogenicity. **Infection and Immunity**, v. 77 (11), p. 5016-5024, 2009.

Stumpf AN, Roggenkamp A, Hoffmann H. Specificity of enterobacterial repetitive intergenic consensus and repetitive extragenic palindromic polymerase chain reaction for the detection of clonality within the *Enterobacter cloacae* complex. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 53(1), p.9-16, 2005.

Tavares CP, Pereira PS, de Andrade Marques E, Faria Jr. C, de Souza MPAH, de Almeida R, Alves CFM, Asensi MD, D'Alincourt Carvalho-Assef AP. Molecular epidemiology of KPC-2-producing Enterobacteriaceae (non-*Klebsiella pneumoniae*) isolated from Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, V.82, P.326-330, 2015.

Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Michelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, p.2233-2239, 1995.

Therrien C, Levesque RC. Molecular basis of antibiotic resistance and β -lactamase inhibition by mechanism-based inactivators: perspectives and future directions. **FEMS Microbiology Reviews**, v.24, p.251-262, 2000.

Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, Gales AC, Biedenbach DJ, Jones RN, Walsh TR. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.50, p.673-679, 2002.

Tortora, G.J.; Funke, B.R.; Case, C.L. **Microbiologia**. 8.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005, 894 p

Tosin I, Silbert S, Sader HS. The use of molecular typing to evaluate the dissemination of antimicrobial resistance among Gram-negative rods in Brazilian Hospitals. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.7, p.360-369, 2003.

Trabulsi LB, Alterthum F. **Microbiologia** 5ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 780 p.

Tsakris A, Kristo I, Poulou A, Themeli-Digalaki K, Ikonomidis A, Petropoulou D, Pournaras S, Sofianou D. Evaluation of Boronic Acid Disk Tests for Differentiating KPC-Possessing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the Clinical Laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, v.47, p.362-367, 2009.

Tumbarello M. et al. Predictors of mortality in bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: importance of combination therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 55(7), p. 943-950, 2012.

Tuon FF, Bianchet LC, Penteado-Filho, SR. Epidemiology of extended spectrum β -lactamase producing *Enterobacter* bacteremia in a Brazilian hospital. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43 (4), p. 452-454, 2010.

Tuon FF, Scharf C, Rocha JL, Cieslinski J, Becker GN, Arend LN. KPC-producing *Enterobacter aerogenes* infection, **The Brazilian Journal of Infectious diseases**, v.19(3), p. 324-327, 2015.

Tzelepi E, Giakkoupi P, Sofianou D, Loukova V, Kemeroglou A, Tsakris A. Detection of Extended-Spectrum β -Lactamases in Clinical Isolates of *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*, **Journal of clinical microbiology**, v. 38 (2), p. 542–546, 2000.

Verma A, Desai N, Shannon K, Philpott-Howard J, Hill RLR. Intra- and inter-generic plasmid-mediated spread of cephalosporin and aminoglycoside resistance amongst *Klebsiella aerogenes* K41 and other enterobacteria. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.17, p.123-129, 2001.

Villegas MV, Lolans K, Correa A, Kattan JN, Lopez JA, Quinn JP. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing β -lactamase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.51, p.1553-1555, 2007.

Wang C, Cai P, Chang D, Mi Z. A *Pseudomonas aeruginosa* isolate producing the GES-5 extended-spectrum β -lactamase. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v: 57(6), p. 1261-1262, 2006.

Wang D, Han CS, Dichosa AEK, Gleasner CD, Johnson SL, Daligault HE, Davenport KW, Li P-E, Pierson EA, Pierson LS, III. Draft genome sequence of *Enterobacter cloacae* strain S611. **Genome Announcements**, v.2(6), p.00710-14, 2014.

Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.35, p.147–151, 1991.

Wilson JG, French WT, Lipzen A, Martin J, Schackwitz W, Woyke T, Shapiro N, Bullard JW, Champlin FR, Donaldson JR. Draft genome sequence of *Enterobacter cloacae*

strain JD6301. **Genome Announcements**, v.2(3):e00381-14, 2014.

Woodford N, Fagan EJ, Ellington MJ. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum β -lactamases. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, v.57, p.154-155, 2005.

Woodford N, Zhang J, Warner M, Kaufmann ME, Matos J, Macdonald A, Brudney D, Sompolinsky D, Navon-Venezia S, Livermore DM. Arrival of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC carbapenemase in the United Kingdom. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.62, p.1261-1264, 2008.

Ye Y, Wu Q, Zhou Y, Dong X, Zhang J. Analysis of major band of *Enterobacter sakazakii* by ERIC-PCR and development of a species-specific PCR for detection of *E. sakazakii* in dry food samples. **Journal of Microbiological Methods**. v. 75(3), p. 392-397, 2008.

Ye Y, Wu Q, Xu X, Yang X, Dong X, Zhang J. The phenotypic and genotypic characterization of *Enterobacter sakazakii* strains from infant formula milk. **Journal of Dairy Science**. v. 93(6), p. 2315-2320, 2010.

Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, Alberti S, Bush K, Tenover FC. Novel Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, p.1151-1161, 2001.

Yigit H, Queenan AM, Rasheed JK, Biddle JW, Domenech-Sanchez A, Alberti S, Bush K, Tenover FC. Carbapenem-resistant strain of *Klebsiella oxytoca* harboring carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.47, p.3881-3889, 2003.

Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, Walsh TR. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, *bla*_{NDM-1}, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.53, p. 5046–5054, 2009.

Zavascki AP, Machado AB, de Oliveira KR, Superti SV, Pilger DA, Cantarelli VV, Pereira PR, Lieberkmecht AC, Barth AL. KPC-2-producing *Enterobacter cloacae* in two cities from Southern Brazil. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 34(3), p. 286-288, 2009.

Zeba B. Overview of β -lactamase incidence on bacterial drug resistance. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, p.1559-1562, 2005.

Zerbino DR, Birney E. Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. **Genome Research**. v.18, p.821-829, 2008.

Zhang R, Zhou HW, Cai JC, Chen GX. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolysing beta-lactamase KPC-2 in carbapenem resistant *Serratia marcescens* isolates from Hangzhou, China. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.59, p.574–576, 2007.

APÊNDICE A (Artigo submetido à Revista: Journal of Hospital Infection)

Title: Beta-lactam resistance determinants and characterization of *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae* isolates from infection and colonization in patients at a public hospital in Recife, Pernambuco, Brazil

Authors: Adriane Borges Cabral¹, Maria Amélia Vieira Maciel¹, Josineide Ferreira Barros², Marcelo Maranhão Antunes², Célia Maria Machado Barbosa de Castro¹, Ana Catarina de Souza Lopes¹

1 Universidade Federal de Pernambuco

2 Hospital Agamenon Magalhães

MSc. Adriane Borges Cabral * (*Corresponding author)

Departamento de Medicina Tropical

Universidade Federal de Pernambuco

Av. Prof. Moraes Rego, s/n. Recife, PE.

Brazil 50.732-970

e-mail: adrianeborgescabral@gmail.com

Tel.: +55 81 21268526

Fax: +55 81 21268528

Abstract

Enterobacter aerogenes and *E. cloacae* are the two species of this genus most involved in healthcare-associated infections (HAI), that are ESBL and carbapenemase producers. This study has characterized phenotypically and genotypically 51 isolates of *E. aerogenes* and *E. cloacae* as originated from infection or colonization in patients admitted to a public hospital in Recife, Pernambuco, Brazil, by antimicrobial susceptibility profile, analysis of β -lactamase genes (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{KPC}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} and *bla*_{SPM}), PCR and DNA sequencing, plasmid profile and ERIC-PCR. In both species, the genes *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} and *bla*_{KPC} were detected. The DNA sequencing confirmed the variants *bla*_{TEM-1}, *bla*_{CTX-M-15} and *bla*_{KPC-2} in isolates. It was observed more than one genes conferring resistance in the isolates, including the detection of the three previously cited genes in strains isolated from infection

sites. The detection of *bla*_{CTX-M} was more frequent in isolates from infection sites than from colonization. The *bla*_{KPC} predominated in *E. cloacae* isolates obtained from infections, however in *E. aerogenes* isolates it predominated in samples obtained from colonization. Clonal relationship among all of *E. aerogenes* isolates was detected by ERIC-PCR. The majority of *E. cloacae* isolates presented the same ERIC-PCR pattern. Despite the clonal relation that the isolates presented by ERIC-PCR, it was observed different plasmid and resistance profiles, and several resistance genes. The clonal dissemination and the resistance determinants to beta-lactamics antimicrobials accumulation presented by the isolates demonstrated the ability that *E. aerogenes* and *E. cloacae*, obtained from colonization and infection, to acquire and maintain different resistance genes.

Keywords: *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, beta-lactamases, ERIC-PCR, plasmid

Introduction

Enterobacter spp. are gram-negative bacilli belonging to the family Enterobacteriaceae, it can be found in soil, water, vegetables, and the intestinal flora of animals, including man. Among the members of the genus *Enterobacter*, the species most frequently associated with human illness are *E. aerogenes* and *E. cloacae* (GONÇALVES *et al.*, 2000). These two species are emerging as important pathogens causing a wide spectrum of healthcare associated infections (HAI), involving the urinary tract, lower respiratory tract, skin, soft tissues, wounds and central nervous system (Lee *et al.*, 2010; Davin-Regli; Pages, 2015). Most *Enterobacter* strains related to HAI are extended spectrum beta-lactamases producers (ESBLs) therefore the treatment of such infections is very challenging because the ESBLs are able to hydrolyze penicillins, all generations of cephalosporins and monobactams, which minimizes the therapeutic options (Lago *et al.*, 2010; Tuon *et al.*, 2015). The main type of ESBLs found in Enterobacteriaceae are SHV, TEM, CTX-M and GES.

Carbapenems are the most widely used antimicrobial agents to treat infections caused by ESBLs producing strains (Nogueira *et al.*, 2015). Recently, the emergence of carbapenemases-producing Enterobacteriaceae has been a challenge in antimicrobial therapy since it confers resistance to carbapenems (Tuon *et al.*, 2015). The main types of carbapenemases detected in Enterobacteriaceae are KPC, VIM, IMP, SPM and GES.

Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC) enzymes in Enterobacteriaceae have

become endemic worldwide. Since 2010, it has been observed a large dissemination of the *bla*_{KPC} gene in various hospitals in different Brazilian States and cities (Cabral *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2013; De Cássia Andrade Melo *et al.*, 2014; Cabral *et al.*, 2015). The emergence of KPC difficults the treatment of infections, since this enzyme confers high levels of resistance to all beta-lactams and different levels of resistance to carbapenems (Tuon *et al.*, 2015). Yet there are few studies on ESBL and carbapenemases-producing strains in Brazil.

The presence of resistance genes on mobile genetic elements such as transposons, plasmids and integrons facilitates the dissemination of resistance determinants in hospital environments. Several plasmids of different sizes were associated with positive *bla*_{KPC} from clinical isolates worldwide (Andrade *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2013; Ribeiro *et al.*, 2013), highlighting the successful dissemination of this resistance gene. The majority of the studies suggest that ESBLs-producing strains are polyclonal and that ESBLs are spread by plasmid transfer, however during outbreaks, clonal spread may occur (Minarini *et al.*, 2008; Chagas *et al.*, 2011; Tollentino *et al.*, 2011; Chang *et al.*, 2013; Nogueira *et al.*, 2015).

Considering the importance of *Enterobacter* causing HAI, the aims of this study were to investigate the frequency of the main genes of ESBLs and carbapenemases in *E. aerogenes* and *E. cloacae* isolates obtained from colonization and infection in patients of a public hospital in Recife PE, Brazil, between 2011-2013, and perform molecular typing by ERIC-PCR and plasmid profile, and phenotypic typing through the antimicrobial resistance profile.

Materials and methods

Bacterial isolates

Thirty-four *E. aerogenes* isolates and 17 *E. cloacae* isolates from infection or colonization sites in different patients were obtained from spontaneous demand of the laboratory of a public hospital in Recife, Pernambuco, Brazil, between 2011 and 2012. In 2013, new isolates were obtained at the same hospital to check the clonal isolates profiles. The isolates were maintained frozen stock at -20°C with 15% glycerol.

Antimicrobial susceptibility testing

The minimum inhibitory concentration (MIC) for antibiotics: amikacin (AMI), amoxicillin-clavulanic acid (AMC), ampicillin (AMP), cefazolin (CFZ), cefepime (CFP), cefotaxime (CFT), ceftiofur (CFX), ceftriaxone (CEFT), ciprofloxacin (CIP), ertapenem (ERT), gentamicin (GEN), imipenem (IMI), levofloxacin (LEV), meropenem (MER), piperacillin-tazobactam (PIPT), tobramycin (TOB), trimethoprim-sulfamethoxazole (TRIS) was

determined by automated equipment BD PhoenixTM (Franklin Lakes, NJ, USA).

DNA extraction, PCR and sequencing of resistance genes

Genomic DNA was extracted directly from a colony suspension in 200 µL of distilled water. The suspension was heated at 100°C for 10 minutes, centrifuged (5 min/ 15,000 rpm) and 100 µL of the supernatant containing the DNA was recovered and stored at -20°C. The DNA was quantified by Nano Drop device. PCR was performed to detect the resistance genes *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{KPC}, *bla*_{GES}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, and *bla*_{SPM}, using primers and the conditions according to Table 1. The PCR products were analysed by 1% agarose gel electrophoresis. Representative Amplicons tested positive for the resistance genes, previously identified by PCR, were subjected to DNA sequencing by the method of Sanger et al. (1977). Sequence data were analyzed using Chromas software (http://technelysium.com.au/?page_id=13) and to translate the nucleotide sequences of genes to amino acid sequences was used the software (<http://web.expasy.org/translate/>). The sequences were deposited in GenBank under accession numbers: KU680809, KU680810, KU680811, KU680812, KU680813, and KF561135.1.

Molecular typing techniques: plasmid profile and ERIC-PCR

Plasmid DNA was extracted using the UltraClean Endotoxin-Free Mini Plasmid Prep (Mo Bio Lab, USA). The ERIC-PCR was performed according to Duan et al. (2009) (Table 1). Plasmids extracted from the isolates and the ERIC-PCR products were analyzed by 0.7% and 1.5% agarose gel electrophoresis, respectively. The pattern of bands was analyzed according to Tenover et al. (1995) and Darwin 5.0 software was used to generate a dendrogram. Isolates collected in 2013 underwent ERIC-PCR in order to verify the clonal relationship after one-year interval between the collections. Also, it was searched the resistance genes *bla*_{KPC} and *bla*_{CTX-M} in these new isolates.

Results

Antimicrobial resistance profile

The antimicrobial resistance profile of *E. aerogenes* and *E. cloacae* isolates are shown in Tables 2 and 3. *E. aerogenes* isolates were grouped in different resistance profiles.

R1 (resistant to all antibiotics), 1a (differs from R1 by the intermediate resistance to AMI), 1b (differs from the profile R1 by the sensitivity to AMI), 1c (differs from the profile R1 by the sensitivity to TRIS), R2 [resistant to all antimicrobials except AMI (intermediate) and TRIS (sensitive)] 2a (differs from profile R2 by sensitivity to CFP), 2b (resistant to all but

the AMI, TRIS and CFP), R3 (resistant to all except AMI and carbapenems: IMP, MER and ERT), R4 (resistant to all but the GEN (sensitive) and TOB (intermediate) and 4a (differs from profile R4 by intermediate resistance to AMI). Regarding to the *E. cloacae*, the isolates were grouped into profiles R4a, R5 [resistant to all antibiotics except AMI (sensitive), carbapenems (sensitive), LEV (sensitive) and PIPT (intermediate)], 5a (differs from profile R5 by resistance to PIPT), 5b (differs from R5 by intermediate resistance to CFP), 5c (differs from profile R5 by intermediate resistance to CIP) and R6 (differs from profile R5 by resistance to PIPT and LEV).

Considering *E. aerogenes* isolates, the antimicrobials that had better activity were: AMI, TRIS, GEN and TOB. Regarding the isolates of *E. cloacae*, AMI and carbapenems showed better activity.

Among *E. aerogenes* isolates, only Ea14A and Ea17A were sensitive to CFP and Ea21A and Ea25A were sensitive to the three carbapenems evaluated. The remaining thirty isolates were resistant to all tested beta-lactams, except in cases of disparity between resistance rates to carbapenem presented by isolates Ea14A, Ea24A, Ea26A, Ea29A, Ea32A and Ea34A. Ertapenem was the most sensitive substrate for carbapenem resistance detection.

ERIC-PCR profile

The *E. aerogenes* isolates from all hospital sectors presented the same profile by ERIC-PCR, named E1, thus confirming clonal relation (Figure 1, Table 2). Among the *E. cloacae* isolates, all from the neonatal intensive care unit presented the E2 profile (Figure 2, Table 3), only Ec9A strain (sector: Coronary Unit, UCO1) showed a distinct profile (E3), though the clone E2 was also detected later on that unit. Through the new analysis of the isolates at the following year, it was found the persistence of the *E. aerogenes* clone (E1) and profile E2a related to the *E. cloacae* clone (E2) in the hospital.

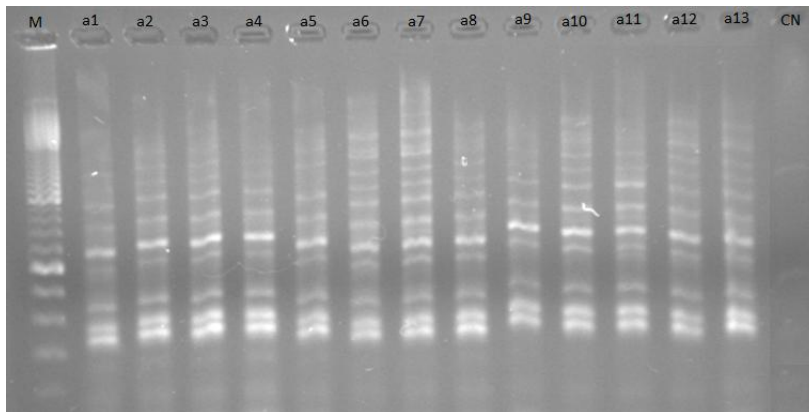


Figure 1. Electrophoresis on agarose gel at 1.5% of the ERIC-PCR product of representative isolates of *Enterobacter aerogenes*. Column 1: Molecular weight marker 100pb, columns 2-14: *E. aerogenes* isolates, column 15: negative control.

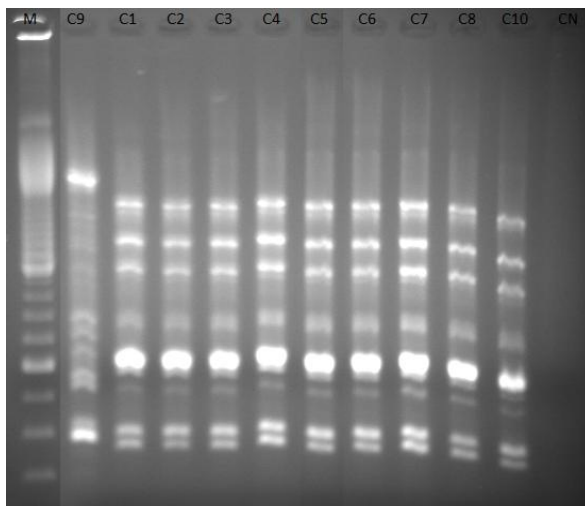


Figure 2. Electrophoresis on agarose gel at 1.5% of the ERIC-PCR product of representative isolates of *Enterobacter cloacae*. Column 1: Molecular weight marker 100pb, columns 2-11: *E. cloacae* isolates, column 12: negative control.

Plasmid profile

After verification of the clones by ERIC-PCR and the resistance profile, it was determined the plasmid profile of a representative from each clonal group. *E. aerogenes* strains presented the profiles: P1, P1a, P2 and P3 (Table 2). In relation to *E. cloacae* isolates, the following profiles were detected: P4, P4a and P5As (Table 3). *Enterobacter aerogenes* presented 4 to 10 plasmids of <12kb to ≥ 150 kb and *E. cloacae* showed 1 to 4 plasmids of 12kb to 90kb (Figure 3).

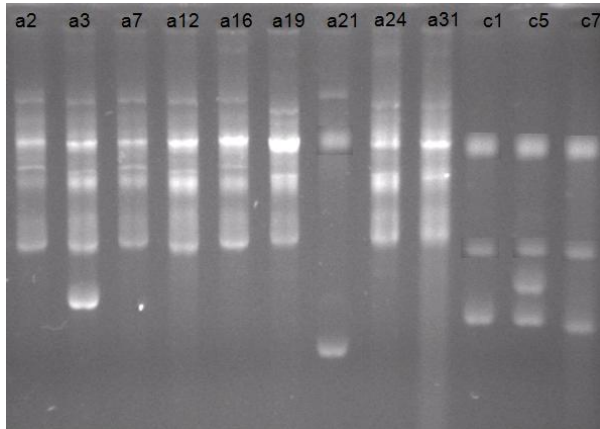


Figure 3. Electrophoresis on agarose gel at 0.7% of the representative plasmid extraction product from *E. aerogenes* (a) and *E. cloacae* (c). Column 1, 3-6, 8 and 9, P1 (plasmids with molecular weights of ≥ 150 pb, 150 bp, 130pb, 100pb, 85pb, 80pb, 65pb and 40pb); Column 2: P1a (≥ 150 pb, 150 bp, 130pb, 100pb, 85pb, 80pb, 65pb, 40pb and 15pb); Column 7: P3 (150 bp, 100pb and ≥ 12 pb); Column 10 and 12: P4 (90PB, 40pb and 15pb) and Column 11: P4a (90PB, 40pb, 20pb and 15pb).

Resistance genes

The genes *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} and *bla*_{KPC} were detected in 17 (50%), 4 (12%) and 30 (88%) *E. aerogenes* isolates, respectively. Considering only *E. cloacae* isolates, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} and *bla*_{KPC} were detected in 16 (94%), 17 (100%) and 3 (18%) isolates, respectively. The genes *bla*_{SHV}, *bla*_{GES}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} and *bla*_{SPM} were not detected in both species (Tables 4 and 5). The variants *bla*_{TEM-1}, *bla*_{CTX-M-15} and *bla*_{KPC-2} were confirmed in both species by sequencing the PCR product of the genes from representative isolates.

Among *E. aerogenes* isolates, simultaneous positivity of: (a) *bla*_{CTX-M} and *bla*_{KPC}, (b) *bla*_{TEM} and *bla*_{CTX-M}, (c) *bla*_{TEM} and *bla*_{KPC} were detected at 1, 2, 15 isolates, respectively. It is worth mentioning the accumulation of the three resistance determinants in the strain Ea26A, obtained from infection (positive for the genes *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} and *bla*_{KPC}). Regarding to the *E. cloacae* isolates, co-positivity to (a) *bla*_{TEM} and *bla*_{KPC}, (b) *bla*_{CTX-M} and *bla*_{KPC} (c) *bla*_{TEM} and *bla*_{CTX-M} were detected in the isolates 3, 3 and 16, respectively, highlighting that the isolates from infection sites EC2A, EC3A and Ec17A were positive for all the following genes: *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} and *bla*_{KPC}.

Comparative analysis according to the source of isolation: colonization or infection

Of the 34 *E. aerogenes* isolates, 18 were from colonization and 16 were obtained from infection (Table 4). Among the *E. cloacae* isolates, three were from colonization and 14 were isolated from infection (Table 5).

Taking into consideration isolates from infection and colonization, the ESBLs (*bla*_{CTX-M}) were distributed as follows: of the four *E. aerogenes* isolates positive for *bla*_{CTX-M}, three correspond to isolates obtained from infection sites (Ea21A, and Ea25A Ea26A) and of the 17 *E. cloacae* isolates positive to *bla*_{CTX-M}, 14 corresponds to isolates from infection sites. Since the distribution of *bla*_{KPC} occurred in isolates from infection and colonization, of the 30 *E. aerogenes* isolates positive to *bla*_{KPC}, 16 correspond to individual colonization, and all *E. cloacae* isolates positive for *bla*_{KPC} were obtained from infection.

Discussion

The prevalence of infections by *Enterobacter* sp. in clinical institutes has increased due to the introduction of extended-spectrum cephalosporins and carbapenems into antibiotic therapy (Anastay *et al.*, 2013; Davin-Regli; Pages, 2015). Isolates of *E. aerogenes* evaluated in this study were resistant to all beta-lactams tested, with rare exceptions. Since the last decade, *E. cloacae* has been repeatedly reported as causative pathogen of HAI in neonatal units and have been linked to several outbreaks of infection (Pestourie *et al.*, 2014; Davin-Regli; Pages, 2015). The majority of *E. cloacae* isolates analyzed in this study were sensitive to carbapenems, and only Ec17A was resistant.

In addition to the carbapenems resistance, the strains evaluated in this study also showed resistance to aminoglycosides, fluoroquinolones and folate inhibitors. Amikacin showed the best antimicrobial activity against both species analyzed. According to the literature, aminoglycosides, polymyxin B and tigecycline have also been reported as effective for treating infections caused by MDR *Enterobacter* spp. in Brazil (Jaskulski *et al.*, 2013; Ribeiro *et al.*, 2013; Quiles *et al.*, 2015; Tavares *et al.*, 2015). On the other hand, recently in Brazil, isolates of *E. aerogenes* and *E. cloacae* have been reported as resistant to polymyxin B and tigecycline (Tavares *et al.*, 2015). Resistance to other classes of antimicrobials may be due to the simultaneous transfer of resistance genes via plasmids, integrons and transposon (Seki *et al.*, 2011; 2013).

The ESBL rate in *E. aerogenes* detected was 12%, which corresponds to the *bla*_{CTX-M} positivity, since *bla*_{TEM-1} is a standard beta-lactamase, an non-ESBL (Lago *et al.*, 2010). All *E. cloacae* isolates were positive for ESBL. In other studies conducted in Brazil, Nogueira *et al.* (2014) found 20% ESBLs positive in *Enterobacter* spp., detecting the genes *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-59}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{SHV-12} and *bla*_{PER-2} in a lower rate when compared to the overall ESBL rate for *Enterobacter* spp. found in this study (41%). Regarding the *bla*_{KPC}, Tavares *et*

al. (2015) found this gene presented in 31.4% of *E. aerogenes* and 17% of *E. cloacae* isolates. The *bla*_{KPC} rates in this study were 18% for *E. cloacae* and 88% for *E. aerogenes*, showing the spread of these genes in the analyzed hospital, which is explained by the clonal isolates spread.

Considering the source of isolation, infection or colonization, there was a predominance of *bla*_{CTX-M} in isolates from infections sites. Moreover, the prevalence of *bla*_{KPC} was according to the species: *E. cloacae* (infection) and *E. aerogenes* (colonization). In accordance with the CDC (http://www.cdc.gov/hai/pdfs/labSettings/Klebsiella_or_Ecoli.pdf), patients colonized with Enterobacteria strains resistant to carbapenems are sources of transmission in healthcare environments (Calfee; Jenkins, 2008). Identify and isolate patients colonized with these strains may be an important step to prevent transmission (Siegel *et al.*, 2006).

In the present study, 41% of the *Enterobacter* spp. isolates were obtained from colonization and of these, 76% were positive for *bla*_{KPC}, reinforcing the need for surveillance cultures. According to Schechner *et al.* (2013), to be exclusively based on clinical cultures do not detect the majority of patients with carbapenem resistance, therefore the active surveillance of high-risk patients is strongly recommended. Surveillance cultures has been the subject of studies by several authors, in order to verify preventive measures to avoid that colonization episodes evolve to infection (Schechner *et al.*, 2013; Oren *et al.*, 2013; Hayden *et al.*, 2015).

There was no detection of *bla*_{SHV} gene in this work, supporting its low-frequency in *Enterobacter* spp. in Brazil (Jaskulski *et al.*, 2013; Nogueira *et al.*, 2014; Tavares *et al.*, 2015). There was also no detection of *bla*_{GES}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} and *bla*_{SPM}, corroborating to a previous study performed in Brazil (Ribeiro *et al.*, 2013).

Concomitant genes beta-lactamases were detected in isolates used in this study, highlighting the simultaneous detection of *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} and *bla*_{KPC} in isolates acquired from infections.

In Brazil, the resistance determinants accumulation in enterobacteria has been cited by others authors. Jaskulsky *et al.* (2013) also identified simultaneous positivity for *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} and *bla*_{KPC} in *E. cloacae* isolates, however, they did not detect *bla*_{CTX-M} in *E. aerogenes*. Tavares *et al.* (2015) investigated the association of ESBLs and KPC in isolates of *E. aerogenes* and *E. cloacae*. These associations are very common, since various beta-lactamase may be encoded on the same plasmid (Carattoli, 2009; Nogueira *et al.*, 2015).

ESBLs genes have been detected in different plasmids (Hammami *et al.*, 2012; Davin-Regli; Pages, 2015), similarly, various plasmids of different size were associated with producing KPC isolates worldwide (Andrade *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2013; Ribeiro *et al.*, 2013; Tavares *et al.*, 2015). The isolates analyzed in this study had different plasmids that can harbor different resistance genes.

The *in vitro* sensitivity to CPF presented by isolates Ea14A and Ea17A is a false sensitivity, since the isolates are positive for *bla*_{KPC}, which degrades all beta-lactams. The isolate Ea9A was resistant to carbapenems but negative for carbapenemases genes screened, and most likely present other resistance mechanisms, such as the association between CTX-M production and porins loss, which are also responsible for the reduced susceptibility to carbapenems, as previously reported (Yang *et al.*, 2009; Seki *et al.*, 2013).

Among the *E. cloacae* isolates, we highlight the false *in vitro* susceptibility to carbapenems by EC2A and EC3A, since they were positive for *bla*_{KPC} gene. The carbapenemases genes acquisition is not always associated with high levels of resistance to carbapenems (Poirel *et al.*, 2007). This varied susceptibility can be explained by other factors such as: (i) co-presence of other resistance mechanisms (Livermore, 2002), (ii) genetic deletion that leads to a silent gene or (III) gene dosage is dependent on the number of plasmid copies (Peleg *et al.*, 2005).

DNA sequencing has confirmed the variants: *bla*_{TEM-1}, *bla*_{CTX-M-15} and *bla*_{KPC-2}. The *bla*_{TEM-1} gene encodes a classic beta-lactamase that inactivates penicillin and some cephalosporins, being inactive against oximino-cephalosporins such as ceftazidime (Bush; Jacoby, 2010). Extensive sequencing of genes in Enterobacteriaceae during the last 15 years has revealed that there are currently seven subtypes of *bla*_{TEM} (*bla*_{TEM-1A} to *bla*_{TEM-1G}). These are defined by modifications at the nucleotides 32, 141, 162 or 175, which can produce one of three different promoters (Pr3, Pr4 and Pr5) and a variety of silent mutations in the coding region of the gene (Tristram *et al.*, 2005). Variants from TEM-3 that corresponds to ESBLs are not common in Brazil. Nogueira *et al.* (2015) identified the IS-136 in two *E. cloacae* strains. Previous to this report, TEM-116 had only been detected in Brazil in enterobacteria (Dropa *et al.*, 2010).

CTX-M was first identified in South America and is the prevalent ESBL in Brazil, as well as in other regions of the world (Nogueira *et al.*, 2015). CTX-M-2 is the most common subtype in Brazil and is found in several species of Enterobacteriaceae (Lopes *et al.*, 2010; Cantón *et al.*, 2012; Gales *et al.*, 2012). However, recent studies have reported an increase in

the number of isolates producing CTX-M-15 (variant belonging to group 1 CTX-M) (Nogueira *et al.*, 2015). CTX-M-15 in *E. cloacae* has been described since 2004 (Paterson; Bonomo, 2005). Similar to this study, *bla*_{CTX-M-15} has been detected in *Enterobacter* species in Brazil by other authors (Seki *et al.* 2013; Nogueira *et al.* 2015). In this study, we highlight the predominance of *bla*_{CTX-M} in isolates from infections.

Carbapenemases KPC-type have been the main resistance determinant in Enterobacteriaceae, and *bla*_{KPC-2} is the most frequently detected variant (Tzouveleakis *et al.*, 2012; Tavares *et al.*, 2015). After the first report of KPC in Brazil in 2006 (Monteiro *et al.*, 2009), its incidence has increased significantly in this country. In Brazil, KPC enzymes in *E. cloacae* isolates have been detected in the South, Southeast, Midwest and Northeast (Zavascki *et al.*, 2009; Andrade *et al.*, 2011; Jaskulski *et al.*, 2013; Ribeiro *et al.*, 2013; Tavares *et al.*, 2015). In *E. aerogenes* isolates, *bla*_{KPC-2} was detected in the South, Midwest and Northeast (Zavascki *et al.*, 2009; Andrade *et al.*, 2011; Jaskulski *et al.*, 2013; Ribeiro *et al.*, 2013; Tavares *et al.*, 2015). In this study, we highlight the prevalence of *bla*_{KPC} in *E. aerogenes* isolates obtained from colonization.

A clonal outbreak in different hospital Departments was found by ERIC-PCR. Isolates with clonal relation but with different plasmid and resistance profiles and presenting several resistance genes have been cited in the literature (Cabral *et al.*, 2012; Ramos *et al.*, 2014). In this study, we also detected the same plasmid profile with different resistance profiles, this may occur because a single plasmid may carry multiple genes or may not have resistance genes (Carattoli, 2009). It was as well detected the same resistance profile with different plasmid profiles, which it could be due to the resistance genes spread associated with genetic mobile elements (Ochman *et al.*, 2000).

In this study, isolates of *E. aerogenes* and *E. cloacae* showed monoclonal spread. According to the literature, polyclonal infections have been reported mainly due to *E. cloacae* (Cantón *et al.*, 2002; Seki *et al.*, 2013; Nogueira *et al.*, 2014; 2015; Davin-Regli; Pages, 2015; Stoesser *et al.*, 2015; Tavares *et al.*, 2015; Quiles *et al.*, 2015). Furthermore, studies have demonstrated that infections due to *E. aerogenes* presented monoclonal spread (Bossi *et al.*, 1999; Nogueira *et al.*, 2014; 2015; Davin-Regli; Pages, 2015; Tuon *et al.*, 2015). As well as detected in this study, other authors also have shown the same profile with different clonal plasmid profiles and resistance genes (Ribeiro *et al.*, 2013; Nogueira *et al.*, 2014; Ramos *et al.*, 2015).

Infections caused by clones of *E. aerogenes* and *E. cloacae* have been associated with

surgical devices colonization, cleaning solutions, refillable soap dispenser and sinks (Davin-Regli; Pages, 2015; Stoesser *et al.*, 2015). The potential sources of micro-organisms includes cases where the soap was appointed as a source of transmission, becoming unfeasible hand-washing as a procedure of infection control practice (Stoesser *et al.*, 2015). In the present study is alarming the persistence of clones of *E. aerogenes* positives for *bla*_{KPC}, as well as *E. cloacae* positive for *bla*_{CTX-M} in the following year in the same hospital. These results should alert medical authorities to institute rigorous methods of detection and thus reducing the spread of MDR isolates in the hospital.

We conclude that the clonal spread and accumulation of resistance determinants displayed by isolates demonstrate the ability of *E. aerogenes* and *E. cloacae*, from colonization and infection, to acquire and maintain different resistance genes. This is alarming because the antimicrobial options available to treat these infections are increasingly reduced. It is extremely important to control the use of antimicrobials and also to perform phenotypic and genotypic identification of early genetic resistance mechanisms in isolates not only from infections sites but also from colonization, in order to prevent the spread of these MDR isolates, which may present different resistance genes.

Table 1. Primers used in PCR and DNA sequencing for detection of β -lactamase genes.

Gene	Primer name	Primer Sequence (5'-3')	temp. ^(a)	Reference
<i>bla</i> _{SHV}	SHV.FoR SHV.ReR	GGGTIATTCTTATTTGTCGC AGCGCGAGAAGCATCCTG	62°C	Rasheed <i>et al.</i> (2000)
<i>bla</i> _{TEM}	T1F T2R	ATAAAATTCTTGAAGACGAAA GACAGTTACCAATGCTTAATC	57°C	Rasheed <i>et al.</i> (2000)
<i>bla</i> _{CTX-M}	CTX-MA1 CTX-MA2	SCSATGTGCAGYACCAGTAA CCGCRATATGRTTGGTGGTG	61°C	Saladin <i>et al.</i> (2002)
<i>bla</i> _{CTX-M-1}	CTX-M13U CTX-M13L	GGTTAAAAAATCACTGCGTC TTGGTGACGATTTTAGCCGC	60°C	Saladin <i>et al.</i> (2002)
<i>bla</i> _{CTX-M-2}	CTX-M25U CTX-M25L	ATGATGACTCAGAGCATTCG TGGGTACGATTTTCGCCGC	62°C	Saladin <i>et al.</i> (2002)
<i>bla</i> _{KPC}	KPC-1a KPC-1b	TGTCACGTGTATCGCCGTC CTCAGTGCTCTACAGAAAACC	63°C	Yigit <i>et al.</i> (2001)
<i>bla</i> _{VIM}	VIM-DIA F VIM-DIA R	CAGATTGCCGATGGTGTGTTGG AGGTGGGCCATTCAGCCAGA	62°C	Dong <i>et al.</i> (2008)
<i>bla</i> _{IMP}	IMP-DIA F IMP-DIA R	GGAATAGAGTGGCTTAATTCTC GTGATGCGTCYCCAAYTTCAC	60°C	Dong <i>et al.</i> (2008)
<i>bla</i> _{SPM}	SPM-DIA F SPM-DIA R	CCTACAATCTAACGGCGACC TCGCCGTGTCCAGGTATAAC	60°	Gales <i>et al.</i> (2003)
	ERIC-1 ERIC-2	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAAC AAGTAAGTGAAGTGGGTGAGCG	36°C	Duan <i>et al.</i> , (2009)

(a)Temp: annealing temperature. All primer names were described according the respective references F (and For, 1, U, a): sequence forward; R (and Rev, 2, L, b): sequence reverse.

Table 2. Characterization of *Enterobacter aerogenes* isolates regarding to antimicrobial resistance profile, plasmid profile and ERIC-PCR profile

Isolate	Hospital sector	Antimicrobial resistance profile	PR	PP	PE
Ea1A	UTI	AMI (sens), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN, IMI, LEV, MER, PIPT, TOB, TRIS	R1b	P1	E1
Ea2A	UCO1	AMI, AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN, IMI, LEV, MER, PIPT, TIG (sens), TOB, TRIS	R1	P1	E1
Ea3A	UCO2	AMI, AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN (sens), IMI, LEV, MER, PIPT, TIG (sens), TOB (int), TRIS	R4	P1a	E1
Ea4A	Cardio	AMI, AMC*, AMP, AMPS, CFZ, CFP, CFT*, CFX, CEFT, CEFU, CIP, ERT*, GEN (sens), IMI, LEV, MER, PIPT, TOB (int), TRIS	R4	P1a	E1
Ea5A	UTI	AMI (int), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN, IMI, LEV, MER, PIPT, TOB, TRIS	R1a	P1	E1
Ea6A	UTI	AMI (int), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN, IMI, LEV, MER, PIPT, TOB, TRIS	R1a	P1	E1
Ea7A	UTI	AMI (sens), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN, IMI, LEV, MER, PIPT, TIG (sens), TOB, TRIS	R1b	P1	E1
Ea8A	UTI	AMI (sens), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN, IMI, LEV, MER, PIPT, TOB, TRIS	R1b	P1	E1
Ea9A	UTI	AMI (sens), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN, IMI, LEV, MER, PIPT, TOB, TRIS	R1b	P1	E1
Ea10A	Cardio	NAL, AMI (int), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN (sens), IMI, LEV, MER, NIT (int), NOR, PIPT, TIG (sens), TOB (int), TRIS	R4a	P1	E1
Ea11A	Clin Med.	AMI (int), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN, IMI, LEV, MER, NIT (sens), PIPT, POLI (sens), TOB, TRIS	R1a	P1	E1
Ea12A	UTI	AMI (int), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN, IMI, LEV, MER, PIPT, TIG (sens), TOB, TRIS	R1a	P1	E1
Ea13A	UCO	AMI (int), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN (sens), IMI, LEV, MER, PIPT, TOB (int), TRIS	R4a	P1	E1
Ea14A	UCO	AMI (sens), AMC, AMP, CFZ, CFP (sens), CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN, IMI (int), LEV, MER (int), PIPT, TOB, TRIS (sens)	R2b	P2	E1
Ea15A	UTI	AMI (sens), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN, IMI, LEV, MER, PIPT, TIG (sens), TOB, TRIS	R1b	P1	E1
Ea16A	UCO1	AMI, AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN, IMI, LEV, MER, PIPT, TOB, TRIS (sens)	R1c	P1	E1
Ea17A	UCO1	AMI (int), AMC, AMP, CFZ, CFP (sens), CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN, IMI, LEV, MER, PIPT, TOB, TRIS (sens)	R2a	P1	E1
Ea18A	UTI	AMI, AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN, IMI, LEV, MER, PIPT, TIG (sens), TOB, TRIS	R1	P1	E1
Ea19A	UTI	AMI (int), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN (sens), IMI, LEV, MER, PIPT, TIG (sens), TOB (int), TRIS	R4a	P1	E1
Ea20A	UCO1	AMI, AMC*, AMP, AMPS, CFZ, CFP, CFT*, CFX, CEFT, CEFU, CIP, ERT*, GEN, IMI, LEV, MER, PIPT, TOB, TRIS (sens)	R1c	P1	E1
Ea21A	Clin Med	AMI (sens), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT (sens), GEN, IMI(sens), LEV, MER(sens), NIT (sens), NOR, PIPT, TOB, TRIS	R3	P3	E1
Ea22A	UCO1	AMI (sens), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN, IMI, LEV, MER, PIPT, TOB, TRIS	R1b	P1	E1
Ea23A	UCO1	AMI, AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN (sens), IMI, LEV, MER, PIPT, TOB (int), TRIS	R4	P1a	E1
Ea24A	UTI	AMI (sens), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN, IMI(int), LEV, MER(int), PIPT, TOB, TRIS	R1b	P1	E1
Ea25A	Clin Med	NAL, AMI (sens), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT(sens), GEN, IMI(sens), LEV, MER(sens), NIT (sens), NOR, PIPT, TOB, TRIS	R3	P3	E1
Ea26A	Cardio	NAL, AMI (int), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN, IMI(sens), LEV, MER(int), NIT (int), NOR, PIPT, TOB, TRIS	R1a	P1	E1
Ea27A	UCO1	AMI, AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN, IMI, LEV, MER, PIPT, TIG(sens), TOB, TRIS(sens)	R1c	P1	E1
Ea28A	UTI	AMI (int), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN(sens), IMI, LEV, MER, PIPT, TIG(sens), TOB (int), TRIS	R4a	P1	E1
Ea29A	UCO1	AMI, AMC*, AMP, AMPS, CFZ, CFP, CFT*, CFX, CEFT, CEFU, CIP, ERT*, GEN(sens), IMI(int), LEV, MER, PIPT, TOB(int), TRIS	R4	P1a	E1
Ea30A	UTI	AMI, AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN(sens), IMI, LEV, MER, PIPT, TIG(sens), TOB (int), TRIS	R4	P1a	E1
Ea31A	Cardio	AMI (int), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN, IMI, LEV, MER, PIPT, TOB, TRIS(sens)	R2	P1	E1
Ea32A	UCO1	AMI (int), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN(sens), IMI(int), LEV, MER, PIPT, TIG(sens), TOB(int), TRIS	R4a	P1	E1
Ea33A	UTI	AMI, AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN(sens), IMI, LEV, MER, PIPT, TIG(sens), TOB(int), TRIS	R4	P1a	E1
Ea34A	UTI	AMI (int), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN(sens), IMI(sens), LEV, MER, PIPT, TIG(sens), TOB(int), TRIS	R4a	P1	E1

Ea, *Enterobacter aerogenes*; PR, antimicrobial resistance profile; PP, plasmid profile; PE, ERIC-PCR profile; UTI, intensive care unit; UCO, Coronary Unit; Cardio, cardiology; Clin. Med, medical clinic; AMI, amikacin; AMC, amoxicillin-clavulanic acid; AMP, ampicillin; CFZ, cefazolin; CFP, cefepime; CFT, cefotaxime ; CFX, cefoxitin; CEFT, ceftriaxone; CIP, ciprofloxacin; ERT, ertapenem ; GEN, gentamicin; IMI, imipenem; LEV, levofloxacin; MER, meropenem ; PIPT, piperacillin-tazobactam; TOB, tobramycin; TRIS, trimethoprim-sulfamethoxazole; sens, sensitivity; int, intermediate.

Table 3. Characterization of *Enterobacter cloacae* isolates regarding to antimicrobial resistance profile, plasmid profile and ERIC-PCR profile

Isolate	Hospital sector	Antimicrobial resistance profile	PR	PP	PE
Ec1A	UTI NEO	AMI (sens), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT (sens), GEN, IMI (sens), LEV(sens), MER(sens), PIPT (int), TIG (sens),TOB, TRIS	R5	P4	E2
Ec2A	UTI NEO	AMI (sens), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT (sens), GEN, IMI (sens), LEV(sens), MER(sens), PIPT (int), TIG (sens),TOB, TRIS	R5	P4	E2
Ec3A	UTI NEO	AMI (sens), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT (sens), GEN, IMI (sens), LEV(sens), MER(sens), PIPT (int), TIG (sens),TOB, TRIS	R5	P4	E2
Ec4A	UTI NEO	AMI (sens), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT (sens), GEN, IMI (sens), LEV(sens), MER(sens), PIPT (int), TIG (sens),TOB, TRIS	R5	P4	E2
Ec5A	UTI NEO	AMI (sens), AMC, AMP, CFZ, CFP(int), CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT (sens), GEN, IMI (sens), LEV(sens), MER(sens), PIPT (int), TOB, TRIS	R5b	P4a	E2
Ec6A	UTI NEO	AMI (sens), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT (sens), GEN, IMI (sens), LEV(sens), MER(sens), PIPT (int), TOB, TRIS	R5	P4	E2
Ec7A	UTI NEO	AMI (sens), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT (sens), GEN, IMI (sens), LEV(sens), MER(sens), PIPT , TOB, TRIS	R5a	P4	E2
Ec8A	UTI NEO	AMI (sens), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT (sens), GEN, IMI (sens), LEV, MER(sens), PIPT , TIG(sens),TOB, TRIS	R6	P4	E2
Ec9A	UCO1	AMI (sens), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT (sens), GEN, IMI (sens), LEV(sens), MER(sens), PIPT , TOB, TRIS	R5a	P5	E3
Ec10A	UTI NEO	AMI (sens), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT (sens), GEN, IMI (sens), LEV(sens), MER(sens), PIPT , TOB, TRIS	R5a	P4	E2
Ec11A	UTI NEO	AMI (sens), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT (sens), GEN, IMI (sens), LEV(sens), MER(sens), PIPT (int), TIG (sens),TOB, TRIS	R5	P4	E2
Ec12A	UTI NEO	AMI (sens), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT (sens), GEN, IMI (sens), LEV(sens), MER(sens), PIPT (int), TIG (sens),TOB, TRIS	R5	P4	E2
Ec13A	UTI NEO	AMI (sens), AMC*, AMP, AMPS, CFZ, CFP, CFT*, CFX, CEFT, CEFU, CIP, ERT*, GEN, IMI (sens), LEV(sens), MER(sens), PIPT, TIG (sens),TOB, TRIS	R5a	P4	E2
Ec14A	UTI NEO	AMI (sens), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT (sens), GEN, IMI (sens), LEV(sens), MER(sens), PIPT, TIG (sens),TOB, TRIS	R5a	P4	E2
Ec15A	UTI NEO	AMI (sens), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT (sens), GEN, IMI (sens), LEV(sens), MER(sens), PIPT, TIG (sens),TOB, TRIS	R5a	P4	E2
Ec16A	UTI NEO	AMI (sens), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP(int), ERT (sens), GEN, IMI (sens), LEV(sens), MER(sens), PIPT(int), TIG (sens),TOB, TRIS	R5c	P4	E2
Ec17A	UCO1	AMI (int), AMC*, AMP, AMPS, CFZ, CFP, CFT*, CFX, CEFT, CEFU, CIP, ERT*, GEN, IMI, LEV, MER, PIPT, TIG(sens), TOB, TRIS	R1a	P1	E2

Ec: *Enterobacter cloacae*; PR, antimicrobial resistance profile; PP, plasmid profile; PE, ERIC-PCR profile; UTI, intensive care unit; UCO, Coronary Unit; Cardio, cardiology; Clin. Med, medical clinic; AMI, amikacin; AMC, amoxicillin-clavulanic acid; AMP, ampicillin; CFZ, cefazolin; CFP, cefepime; CFT, cefotaxime ; CFX, cefoxitin; CEFT, ceftriaxone; CIP, ciprofloxacin; ERT, ertapenem ; GEN, gentamicin; IMI, imipenem; LEV, levofloxacin; MER, meropenem ; PIPT, piperacillin-tazobactam; TOB, tobramycin; TRIS, trimethoprim-sulfamethoxazole; sens, sensitivity; int, intermediate.

Table 4. Characterization of *Enterobacter aerogenes* strains as the source of primary isolation (colonization or infection) and beta-lactamase genes

ISOLATE	SOURCE OF PRIMARY ISOLATION	<i>bla</i>	<i>bla</i>	<i>bla</i>	<i>bla</i>	<i>bla</i>	<i>bla</i>	<i>bla</i>	<i>bla</i>
		SHV	TEM	CTX-M	VIM	IMP	SPM	GES	KPC
Ea1A	NASAL SWAB	-	+	-	-	-	-	-	+
Ea2A	RECTAL SWAB	-	+	-	-	-	-	-	+
Ea3A	RECTAL SWAB	-	-	-	-	-	-	-	+
Ea4A	RECTAL SWAB	-	-	-	-	-	-	-	+
Ea5A	RECTAL SWAB	-	+	-	-	-	-	-	+
Ea6A	RECTAL SWAB	-	+	-	-	-	-	-	+
Ea7A	BLOOD	-	-	-	-	-	-	-	+
Ea8A	RECTAL SWAB	-	+	-	-	-	-	-	+
Ea9A	RECTAL SWAB	-	+	-	-	-	-	-	-
Ea10A	URINE	-	-	-	-	-	-	-	+
Ea11A	URINE	-	+	-	-	-	-	-	+
Ea12A	CATHETER	-	+	-	-	-	-	-	+
Ea13A	RECTAL SWAB	-	-	-	-	-	-	-	+
Ea14A	RECTAL SWAB	-	+	-	-	-	-	-	+
Ea15A	TRACHEAL SECRETION	-	+	-	-	-	-	-	+
Ea16A	RECTAL SWAB	-	+	-	-	-	-	-	+
Ea17A	RECTAL SWAB	-	+	-	-	-	-	-	+
Ea18A	BLOOD	-	-	-	-	-	-	-	+
Ea19A	TRACHEAL SECRETION	-	-	-	-	-	-	-	+
Ea20A	SWAB RETAL	-	-	-	-	-	-	-	+
Ea21A	URINE	-	-	+	-	-	-	-	-
Ea22A	RECTAL SWAB	-	+	+	-	-	-	-	-
Ea23A	RECTAL SWAB	-	-	-	-	-	-	-	+
Ea24A	RECTAL SWAB	-	+	-	-	-	-	-	+
Ea25A	URINE	-	-	+	-	-	-	-	-
Ea26A	URINE	-	+	+	-	-	-	-	+
Ea27A	BLOOD	-	+	-	-	-	-	-	+
Ea28A	BLOOD	-	-	-	-	-	-	-	+
Ea29A	RECTAL SWAB	-	-	-	-	-	-	-	+
Ea30A	ASCITIC FLUID	-	-	-	-	-	-	-	+
Ea31A	RECTAL SWAB	-	+	-	-	-	-	-	+
Ea32A	BLOOD	-	-	-	-	-	-	-	+
Ea33A	BLOOD	-	-	-	-	-	-	-	+
Ea34A	BLOOD	-	-	-	-	-	-	-	+

Ea, *Enterobacter aerogenes*; +, presence of the gene; -, ausence of the gene

Table 5. Characterization of *Enterobacter cloacae* strains as the source of primary isolation (colonization or infection) and beta-lactamase genes

Ec,

ISOLATE	SOURCE OF PRIMARY ISOLATION	<i>bla</i>	<i>bla</i>	<i>bla</i>	<i>bla</i>	<i>bla</i>	<i>bla</i>	<i>bla</i>	<i>bla</i>
		SHV	TEM	CTX-M	VIM	IMP	SPM	GES	KPC
Ec1A	OCULAR SECRETION	-	-	+	-	-	-	-	-
Ec2A	OCULAR SECRETION	-	+	+	-	-	-	-	+
Ec3A	OCULAR SECRETION	-	+	+	-	-	-	-	+
Ec4A	OCULAR SECRETION	-	+	+	-	-	-	-	-
Ec5A	BLOOD	-	+	+	-	-	-	-	-
Ec6A	RECTAL SWAB	-	+	+	-	-	-	-	-
Ec7A	BLOOD	-	+	+	-	-	-	-	-
Ec8A	BLOOD	-	+	+	-	-	-	-	-
Ec9A	RECTAL SWAB	-	+	+	-	-	-	-	-
Ec10A	RECTAL SWAB	-	+	+	-	-	-	-	-
Ec11A	CEREBROSPINAL FLUID	-	+	+	-	-	-	-	-
Ec12A	BLOOD	-	+	+	-	-	-	-	-
Ec13A	BLOOD	-	+	+	-	-	-	-	-
Ec14A	BLOOD	-	+	+	-	-	-	-	-
Ec15A	BLOOD	-	+	+	-	-	-	-	-
Ec16A	BLOOD	-	+	+	-	-	-	-	-
Ec17A	BLOOD	-	+	+	-	-	-	-	+

Enterobacter cloacae; +, presence of the gene; -, ausência do gene

References

Anastay M, Lagier E, Blanc V, Chardon, H. Epidémiologie des beta-lactamases à spectre étendu (BLSE) chez les entérobactéries dans un hôpital Du sud de la France, 1997-2007. *Pathol Biol* 2013; 61:38-43.

Andrade LN, Curiao T, Ferreira JC, Longo JM, Clímaco EC, Martinez R, Bellissimo-Rodrigues F, Basile-Filho A, Evaristo MA, Del Peloso PF, Ribeiro VB, Barth AL, Paula MC, Baquero F, Cantón R, Darini AL, Coque TM. Dissemination of *bla*_{KPC-2} by the spread of *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 258 clones (ST258, ST11, ST437) and plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among *Enterobacteriaceae* species in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55:3579-83.

Bosi C, Davin-regli A, Bornet C, Mallea M, Pages J-M, Bollet C. Most *Enterobacter aerogenes* Strains in France Belong to a Prevalent Clone. *J Clin Microbiol* 1999; 37:2165-9.

Bush K, Jacoby GA. Updated Functional Classification of β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54:969-76.

Cabral AB, Melo RCA, Maciel MAV, Lopes ACS. Multidrug resistance genes, including *bla*_{KPC} and *bla*_{CTX-M-2}, among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2012; 45:572-8.

Cabral AB, Maciel MAV, Barros JF, Antunes MM, Lopes ACS. Detection of *bla*_{KPC-2} in *Proteus mirabilis* in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2015; 48:94-5.

Calfee D, Jenkins SG. Use of active surveillance cultures to detect asymptomatic colonization with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in intensive care unit patients. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2008; 29:966-8.

Cantón R, Oliver A, Coque TM, Varela MC, Pérez-Díaz JC, Baquero F. Epidemiology of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Enterobacter* Isolates in a Spanish Hospital during a 12-Year Period. *J Clin Microbiol* 2002; 40:1237-43.

Cantón R, González-Alba JM, Galán JC. CTX-M enzymes: origin and diffusion. *Front Microbiol* 2012; 3:110.

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

CDC, Center for diseases control and prevention, Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR): Detection of *Enterobacteriaceae* Isolates Carrying Metallo-Beta-Lactamase, United States, 2010; 59:750.

Chagas TP, Alves RM, Vallim DC, Seki LM, Campos LC, Asensi MD. Diversity of genotypes in CTX-M-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in different hospitals in Brazil. *Braz J Infec Dis* 2011; 15:420-5.

Chang CL, Su LH, Lu CM, Tai FT, Huang YC, Chang KK. Outbreak of ertapenem-resistant *Enterobacter cloacae* urinary tract infections due to a contaminated ureterscope. *J Hosp Infec* 2013; 85:118-24.

Davin-Regli A, Pagès J-M. *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. *Front Microbiol* 2015; 6:392.

de Cássia Andrade Melo R, de Barros EM, Loureiro NG, de Melo HR, Maciel MA, Souza Lopes AC. Presence of fimH, mrkD, and irp2 virulence genes in KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Recife-PE, Brazil. *Curr Microbiol* 2014; 69:824-31.

Dong F, Xu Xi-wei, Song Wen-qi, Lü Ping, Yu Sang-jie, Yang Yong-hong, Shen Xu-zhuang. Characterization of multidrug-resistant and metallo-betalactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a paediatric clinic in China. *Chin Med J* 2008; 121:1611-6.

Dropa M, Balsalobre LC, Lincopan N, Mamizuka EM, Cassettari VC, Matté GR, Matté MH. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carrying the novel extended-spectrum β -lactamase gene variants *bla*_{SHV-40}, *bla*_{TEM-116} and the class 1 integron-associated *bla*_{GES-7} in Brazil. *Clin Microbiol Infec* 2010; 16:630-2.

Duan H, Chai T, Liu J, Zhang X, Qi C, Gao J, Wang Y, Cai Y, Miao Z, Yao M, Schlenker G. Source identification of airborne *Escherichia coli* of swine house surroundings using ERIC-PCR and REP-PCR. *Environ Res* 2009; 109:511-7.

Gales AC, Menezes LC, Silbert S, Sader HS. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenêmicos-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- β -lactamase. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52:699-702.

Gales AC, Castanheira M, Jones RN, Sader HS. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial

Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). *Diagn Microbiol Infec Dis* 2012; 73:354-60.

Gonçalves CR, Vaz TMI, Leite D, Pisani B, Simões M, Prandi MAM, Rocha MMM, Cesar PC, Trabasso P, Nowakonski AV, Irino K. Molecular epidemiology of a nosocomial outbreak due to *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter agglomerans* in Campinas, São Paulo, Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2000; 42: 1-7.

Hammami S, Boutiba-BenBoubaker I, Saidani M, Lakhal E, BenHassen A, Kamoun A, Ghazzi R, Slim A, Ben Redjeb S. Characterization and molecular epidemiology of extended spectrum beta-lactamase producing *Enterobacter cloacae* isolated from a Tunisian hospital. *Microb Drug Resist* 2012; 18: 59-65.

Hayden MK, Lin MY, Lolans K, Weiner S, Blom D, Moore NM, Fogg L, Henry D, Lyles R, Thurlow C, Sikka M, Hines D, Weinstein RA. Prevention of colonization and infection by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing enterobacteriaceae in long-term acute-care hospitals. *Clin Infec Dis* 2015; 60:1153-61.

Jaskulski MR, Medeiros BC, Borges JV, Zalewsky R, Fonseca MEC, Marinowicz DR, Rocha MP, Nodari P, Machado DC. Assessment of extended-spectrum β -lactamase, KPC carbapenemase and porin resistance mechanisms in clinical samples of *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents* 2013; 42: 76-9.

Lago A, Fuentefria SR, Fuentefria DB. Enterobactérias produtoras de ESBL em Passo Fundo, Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2010; 43:430-4.

Livermore DM. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infec Dis* 2002; 34: 634-40.

Lee CC, Lee NY, Yan JJ, Lee HC, Chen PL, Chang CM, Wu CJ, Ko NY, Wang LR, Chi CH, Ko, WC. Bacteremia due to Extended-Spectrum- β -Lactamase-producing *Enterobacter cloacae*: Role of Carbapenem Therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54:3551-6.

Lopes ACS, Veras DL, Lima AMS, Melo RCA, Ayala J. *bla*_{CTX-M-2} and *bla*_{CTX-M-28} extended-spectrum β -lactamase genes and class 1 integrons in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2010; 105: 163-7.

Minarini LA, Clímaco EC, Guimarães DB, Ferreira JC, Palazzo IC, Martinez R, Darini AL. Clonal transmission of ESBL-producing *Klebsiella* spp. at a university hospital in Brazil. *Curr Microbiol* 2008; 56:587-91.

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

Nogueira KD, Paganini MC, Conte A, Cogo LL, Taborda de Messias Reason I, da Silva MJ, Dalla-Costa LM. Emergence of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacter* spp. in patients with bacteremia in a tertiary hospital in southern Brazil. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2014; 32:87-92.

Nogueira KS, Conte D, Maia FV, Dalla-Costa LM. Distribution of extended-spectrum β -lactamase types in a Brazilian tertiary hospital. *Rev Soc Bras Med Trop* 2015; 48:162-9.

Ochman H, Lawrence JG, Groisman EA. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* 2000; 405:299-304.

Oren I, Sprecher H, Finkelstein R, Hadad S, Neuberger A, Hussein K, Raz-Pasteur A, Lavi N, Saad E, Henig I, Horowitz N, Avivi I, Benyamini N, Fineman R, Ofra Y, Haddad N, Rowe JM, Zuckerman T. Eradication of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae gastrointestinal colonization with nonabsorbable oral antibiotic treatment: A prospective controlled trial. *Am J Infect Control* 2013; 41:1167-72.

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

Peleg AY, Franklin C, Bell JM, Spelman DW. Dissemination of the metallo- β -lactamases Gene *bla*IMP-4 among Gram-negative pathogens in a clinical setting in Australia. *Clin Infect Dis* 2005; 41:1549-56.

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

Poirel L, Pitout JD, Nordmann P. Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. *Future Microbiol* 2007; 2:501-12.

Pestourie N, Garnier F, Barraud O, Bedu A, Ploy MC, Mounier M. Outbreak of AmpC β -lactamase-hyper-producing *Enterobacter cloacae* in a neonatal intensive care unit in a French teaching hospital. *Am J Infect Control* 2014; 42, 456-8.

Quiles MG, Rocchetti TT, Fehlberg LC, Kusano EJ, Chebabo A, Pereira RM, Gales AC, Pignatari AC. Unusual association of NDM-1 with KPC-2 and *armA* among Brazilian Enterobacteriaceae isolates. *Braz J Med Biol Res* 2015; 48:174-7.

Ramos PIP, Picão RC, de Almeida LGP1, Lima NCB, Girardello R, Vivan ACP, Xavier DE, Barcellos FG, Pelisson M, Vespero EC, Médigue C, de Vasconcelos ATR, Gales AC, Nicolás MF. Comparative analysis of the complete genome of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* Kp13 reveals remarkable genome plasticity and a wide repertoire of virulence and resistance mechanisms. *BMC Genomics* 2014; 15:54.

Rasheed JK, Anderson GJ, Yigit H, Quennan AM, Doménech-Sánchez A, Swenson JM, Biddle JW, Ferraro MJ, Jacoby GA, Tenover FC. Characterization of the Extended-Spectrum β -lactamase Reference strain, *Klebsiella pneumoniae* K6 (ATCC 700603), which produces the novel enzyme SHV-18. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:2382-8.

Ribeiro VB, Andrade LN, Linhares AR, Barin J, Darini ALC, Zavascki AP, Barth AL. Molecular characterization of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing isolates in southern Brazil. *J Med Microbiol* 2013; 62:1721-7.

Saladin M, Bao Cao VT, Lambert T, Donay J, Herrmann J, Ould-Hocine Z, Verdet C, Delisle F, Philippon A, Arlet G. Diversity of CTX-M β -lactamases and their promoter regions from *Enterobacteriaceae* isolated in three Parisian hospitals. *FEMS Microbiol Lett* 2002; 209: 161-8.

Seki LM, Pereira PS, De Souza MPAH, Conceição Mde S, Marques EA, Porto CO, Colnago EM, Alves Cde F, Gomes D, Assef AP, Samuelsen O, Asensi MD. Molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Brazil: the predominance of sequence type 437. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; 70: 274-7.

Seki LM, Pereira PS, Conceição MS, Souza MJ, Marques EA, Carballido JM, de Carvalho MES, Assef APDC, Asensi MD. Molecular epidemiology of CTX-M producing *Enterobacteriaceae* isolated from bloodstream infections in Rio de Janeiro, Brazil: emergence of CTX-M-15. *Braz J Infect Dis* 2013; 17:640-6.

Siegel JD, Rhinehart E, Jackson M, Chiarello L, HICPAC. Management of Multidrug-Resistant Organisms in Healthcare Settings 2006. *Am J Infect Control* 2007; 35:165-93.

Schechner V, Kotlovsky T, Kzama M, Mishali H, Schwartz D, Navon-Venezia S, Schwaber MJ, Carmeli Y. Asymptomatic rectal carriage of blaKPC producing carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: who is prone to become clinically infected? *Clin Microbiol Infect* 2013; 19:451-6.

Stoesser N, Sheppard AE, Shakya M, Sthapit B, Thorson S, Giess A, Kelly D, Pollard AJ, Peto TEA, Walker AS, Crook DW. Dynamics of MDR *Enterobacter cloacae* outbreaks in a neonatal unit in Nepal: insights using wider sampling frames and next-generation sequencing. *J Antimicrob Chemother* 2015; 70:1008-15.

Tavares CP, Pereira PS, de Andrade Marques E, Faria Jr. C, de Souza MPAH, de Almeida R, Alves CFM, Asensi MD, D'Alincourt Carvalho-Assef AP. Molecular epidemiology of KPC-2-producing *Enterobacteriaceae* (non-*Klebsiella pneumoniae*) isolated from Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2015; 82:326-30.

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

Tristram SG, Hawes R, Souprounov J. Variation in selected regions of blaTEM genes and promoters in *Haemophilus influenzae*. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56:481-4.

Tuon FF, Scharf C, Rocha JL, Cieslinski J, Becker GN, Arend LN. KPC-producing *Enterobacter aerogenes* infection. *Braz J Infect Dis* 2015; 19:324-7.

Tzouvelekis LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, Tassios PT, Daikos GL. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae*: an evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol Rev* 2012; 25:682-707.

Wang C, Cai P, Chang D, Mi Z. A *Pseudomonas aeruginosa* isolate producing the GES-5 extended-spectrum β -lactamase. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57:1261-2.

Yang D, Guo Y, Zhang Z. Combined porin loss and extended spectrum beta-lactamase production is associated with an increasing imipenem minimal inhibitory concentration in clinical *Klebsiella pneumoniae* strains. *Curr Microbiol* 2009; 58:366-70.

Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, Alberti S, Bush K, Tenover FC. Novel Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45:1151-61.

Zavascki AP, Machado AB, de Oliveira KR, Superti SV, Pilger DA, Cantarelli VV, Pereira PR, Lieberknecht AC, Barth AL. KPC-2-producing *Enterobacter cloacae* in two cities from Southern Brazil. *Int J Antimicrob Agents* 2009; 34:286-8.

Submission Confirmation for Beta-lactam resistance determinants and characterization of *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae* isolates from infection and colonization in patients at a public hospital in Recife, Pernambuco, Brazil



Entrada x



Journal of Hospital Infection <em@editorialmanager.com>

10 de fev (Há 1 dia)



para mim



inglês



português

Traduzir mensagem

Desativar para: inglês x

Dear Mrs. cabral,

Your submission entitled "Beta-lactam resistance determinants and characterization of *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae* isolates from infection and colonization in patients at a public hospital in Recife, Pernambuco, Brazil" has been received by the Editorial Office of the Journal of Hospital Infection

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author at <http://jhi.edmgr.com/>.

Papers that are submitted without all Author's hand signed signatures or with references or other features that do not comply with the instructions to authors will be returned to their authors and will not be considered for publication until they have been corrected and resubmitted.

Your manuscript will be given a reference number only once it contains the required signatures and complies with the instructions to authors.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

APÊNDICE B (Artigo submetido à Revista: International Journal of Medical Microbiology)

Title: Genomic analysis on *Enterobacter aerogenes* isolates positive for *bla*_{KPC-2} from colonization and infection among ICU patients: diversity of resistance and virulence genes

Authors: Adriane Borges Cabral¹, Antônio Mauro Rezende², Rodrigo S. Galhardo³, Ingrid Reale Alves³, Célia Maria Machado Barbosa de Castro¹, Ana Catarina Souza Lopes¹.

1 Universidade Federal de Pernambuco

2 Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães Fiocruz-Pernambuco

3 Universidade Estadual de São Paulo

MSc. Adriane Borges Cabral * (*Corresponding author)

Departamento de Medicina Tropical

Universidade Federal de Pernambuco

Av. Prof. Moraes Rego, s/n. Recife, PE.

Brazil 50.732-970

e-mail: adrianeborgescabral@gmail.com

Tel.: +55 81 21268526

Fax: +55 81 21268528

Abstract

Enterobacter aerogenes is an important nosocomial pathogen and can present various virulence and antimicrobial resistance genes. In the present study, the first genomic sequencing of two *E. aerogenes* isolates positive for *bla*_{KPC-2} was performed. These came from colonization (Ea5A) and infection (Ea7A) among patients in the intensive care unit (ICU) of a single hospital. The objective was to detect antimicrobial resistance genes, virulence genes, drug efflux systems and secretion systems. Additionally, a comparative analysis was performed on two strains of *E. aerogenes* that had previously been sequenced. Among the beta-lactamase genes, *bla*_{TEM-1} and *bla*_{KPC-2} stood out, along with genes for resistance to other classes of antimicrobials [*acc(3)-III*, *rmt*, *ant(9)*, *tmrB*, *cat*, *sulIII*, *dhfr*, *macA*, *macB* and *fosA*], including polymyxin (*pmr* and *arn*). A wide repertoire of genes relating to enterobactin, yersiniabactin, type I and type IV fimbrial adhesins and genes

relating to the capsule and biofilm were detected in the isolates. Five types of efflux systems (RND, ABC, MFS, DMT and MATE) and three types of secretion systems (SST1, SST4 and SST6) were also detected. Comparative analysis on the two bacterial isolates of this study showed that they shared between 90 and 92% of the genome. Both samples were similar to *E. aerogenes*, a human pathogen from France: EA1509_E [78.6% (Ea5A) and 84.7% (Ea7A)]. It could be concluded that, regardless of the source of isolation, colonization or infection, the isolates Ea5A and Ea7A presented high chromosome and plasmid similarity, both regarding the entire gene arsenal harbored by the strains and regarding the specific characteristics of the study. On the other hand, although they are clones according to ERIC-PCR, from the same hospital sector, they presented subtle differences in the total quantity of genes, resistance genes, efflux systems and secretion systems, as well as exclusive characteristics for each isolate. It is also important to highlight that one isolate of *E. aerogenes* that had colonized an ICU patient presented potential virulence genes for establishing the infection, along with mobile genetic elements capable of transmitting various genes to other bacteria present in the patient's enteric microbiota. This raises awareness of the risk of colonization by this bacterial species.

Keywords: *Enterobacter aerogenes*, Genomic sequencing, resistance, virulence, beta-lactamases

Introduction

Over the course of the past decade, *Enterobacter aerogenes* has become an important multidrug-resistant pathogen (MRP). It is responsible for healthcare associated infections (HAI) that include respiratory and urinary tract infections, septicemia and meningitis (Lee *et al.*, 2010; Diene *et al.*, 2012; Davin-Regli, 2015). For infections caused by extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *E. aerogenes*, use of carbapenems is recommended, although increased use of this antibiotic has led to development of resistance, especially with regard to the enzyme *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) (Tuon *et al.*, 2015). Schechner *et al.* (2013) highlighted the importance of surveillance cultures in relation to reduction of the dissemination of these microorganisms in hospital environments. The importance of colonized patients lies mainly in their potential as sources of transmission within healthcare environments (Calfee; Jenkins, 2008). Thereby, active microbiological surveillance as well as molecular epidemiology are important to the infection control (Juhász

et al., 2012).

Virulence factors are important in relation to colonization and establishment of infection. For colonization to be successful and protected against the host's defense systems, presence of a capsule and factors relating to formation of a biofilm are important (Taghavi *et al.*, 2015). Fixation of enterobacteria in host cells is measured through various types of fimbriae. *Enterobacter* spp. is known to produce fimbriae of types 1 and 3 (Liu *et al.*, 2013). Another virulence factor that acts towards successful infection is the presence of siderophores. These contribute to the ability of the microorganism to survive in the host's tissue, since they enable acquisition of iron, usually as a complex with carrier molecules (hemoglobin, lactoferrin and transferrin), given that the availability of free iron in the human body is low (Bullen *et al.*, 2005).

While the external membrane provides a natural barrier and acts together with multidrug pumps to protect gram-negative cells from hazardous agents (detergents, disinfectants, stains, antibiotics and toxins), it also represents a challenge regarding nutrient absorption and byproduct excretion. For such purposes, the external membrane has various pathways for selective transportation of molecules into and out of the cell: efflux systems (relating to resistance) and secretion systems (relating to virulence) (Sandkvist, 2001).

Horizontal acquisition of genes through mobile elements such as plasmids, transposon, integron and phages can result in various different genomic repertoires (the mobilome), which produce alternative or atypical phenotypes that are better adapted to their environment. *E. aerogenes* presents translation mechanisms that have developed with high capacity to translate exogenous sequences, as well as having greater propensity to acquire these sequences from various ecological sources and disseminate them, thereby enabling high levels of mosaicism and, consequently, creation of new genomic repertoires. This explains the plasticity presented by this bacterial species (Diene *et al.*, 2013).

The advent of the post-genomic era has allowed better comprehension regarding bacterial species. *E. aerogenes* has been genomically sequenced in a few studies. Shin *et al.* (2012) were responsible for the first genomic sequencing of a strain of *E. aerogenes* (KCTC 2190). Likewise, Eevers *et al.* (2015) addressed the genome of this species superficially. Both authors demonstrated the presence of genes relating to the bioindustrial potential of *E. aerogenes*. Shin *et al.* (2012) also explored characteristics of the strain KCTC 2190, which was subsequently renamed the reference strain for *E. aerogenes*: ATCC 13048. Regarding the genomic sequencing of forms of *E. aerogenes* that are pathogenic towards humans, Diene *et*

al. (2012) analyzed the genetic relationships of *E. aerogenes* and other enterobacteria.

Given the scarcity of reports in the literature, genomic sequencing of the strains Ea5a and Ea7A MDR (which are positive for *bla*_{KPC-2}), using samples from colonization and infection of ICU patients, will enable better understanding of this pathogen. Additionally, comparative analysis between the isolates studied and the previously sequenced strains will enable better understanding of the similarities and particularities presented by this species.

Material and methods

Bacterial isolates

The present study consisted of an analysis on two isolates of *E. aerogenes* MDR (Ea5A and Ea7A), which are positive for *bla*_{KPC}. They had the same resistance profile, except regarding amikacin (Ea5A presented intermediate resistance, while Ea7A presented sensitivity to this antimicrobial agent). One was recovered from colonization (Ea5A, rectal swab) and the other, from infection (bacteremia) (Ea7A, blood). They were both collected in November 14, 2011, from different patients hospitalized in an intensive care unit (ICU) in a public hospital in the municipality of Recife, Pernambuco, Brazil. The biochemical identification and susceptibility profile of the isolates in relation to antimicrobials were determined using the automated BD PhoenixTM equipment (Franklin Lakes, New Jersey, USA). The isolates were frozen and stored at -20 °C with 15% glycerol.

DNA extraction and ERIC-PCR

DNA was extracted using the Wizard genomic DNA purification kit (Promega). The DNA was quantified through the Nano Drop equipment. The ERIC-PCR profile was obtained through amplification by PCR in accordance with the primers of Duan *et al.* (2009) and methodology of Cabral *et al.* (2012). The PCR product was subjected to electrophoresis on 1.5% agarose gel (ERIC-PCR), and was then photographed. The analysis on the band pattern produced by the ERIC-PCR was done using the DARVIN 5.0 software.

Genomic sequencing

From the extracted DNA, DNA libraries were assembled using the TruSeq DNA PCR free kit (Illumina). The libraries were quantified using the Kappa Biosystems kit, in accordance with the manufacturer's recommendations, and the genomic sequencing was performed using the MiSeq equipment (Illumina). Extremities of 300 bp were sequenced to produce an amplicon

of 1100 bp in length.

In silico analysis tools used

Various free tools were used for analyzing the fragments produced. For the sequencing quality analysis: fastqc (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>); for removing interferences: Trimmomatic (<http://www.usadellab.org/cms/index.php?page=trimmomatic>); for assembling contigs: Velvet (Zerbino; Birney, 2008); for alignment and ordering of contigs to reference sequences for chromosomes and plasmids: blastall (Altschul *et al.*, 1990) and Mauve (Darling *et al.*, 2011); for genic prediction and annotation: RASTtk (<http://rast.nmpdr.org/>) and Resfinder-beta-lactamases (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>); and for comparison between genomes: Orthomcl (Li; Stoeckert; Roos, 2003) and MySQL (<https://www.mysql.com/>).

Investigation of incompatibility groups (inc)

The incompatibility groups found in the isolates were investigated through aligning the primer sequences described by Carattoli *et al.* (2005) against the plasmid and chromosomal DNA, by means of the blastall tool. 100% alignment of the forward and reverse sequences implied that the isolate contained the sequence that existed between the two primers, i.e. the inc group that was studied.

Genomes for comparative analyses

GenBank currently provides two complete genomes of *E. aerogenes* for downloading: KCTC 2190 (now known as ATCC 13048) and *E. aerogenes* EA1509E. These were used to conduct comparative analysis on the isolates of the present study. The genomic characteristics of the strains KCTC 2190 and EA1509E that were used for performing the comparative analyses are described in Table 1.

Results

Clonal relationship through ERIC-PCR

The isolates Ea5A and Ea7A presented a clonal relationship through the ERIC-PCR technique, showing 100% similarity.

Assembly of contigs

Regarding Ea5A, a total of 219 contigs was obtained. From these, 18 were considered to be plasmid contigs, which allowed plasmid identification: Ea5A_pA (contig: NODE 55; length 72212; cov 88.949898), which was similar to the reference plasmid NZ_CP010365.1; and Ea5A_pB (contig: NODE 111; length 5386; cov 207.211105), which was similar to the reference plasmid NZ_AUPS01000027.1. It was not possible to assemble any other plasmids from the remaining contigs (n = 16). From the 201 chromosomal contigs, a chromosome of 5,571,633 bp was assembled based on the reference NC_20181 (Table 1).

Regarding Ea7A, a total of 142 contigs were obtained. From these, 20 were considered to be plasmid contigs, which allowed identification of the same plasmids in Ea7A_pA (contig: NODE 11; length 72344; cov 28.546349), which was similar to the reference plasmid NZ_CP010365.1; and in Ea7A_pB (contig: NODE 57; length 5386; cov 92.687149), which was similar to the reference plasmid NZ_AUPS01000027.1. It was not possible to assemble any other plasmids from the remaining contigs (n = 18). From the 122 chromosomal contigs, a chromosome of 5,423,282 bp was assembled based on the reference NC_20181 (Table 1).

Gene identification:

Through the tool **RASTtk**, coding sequences (CDS) with predicted or hypothetical rRNA and tRNA functions were identified in the chromosomal and plasmid DNA, as described in Table 1.

Investigation of plasmid incompatibility groups (inc)

Among all the inc groups investigated, inc genes of types L/M and A/C were detected in plasmid DNA from both isolates (Table 1). There was no alignment of the primers tested with chromosomal DNA, thus confirming the absence of plasmids identified by means of inc that were integrated with the bacterial chromosome.

Beta-lactam resistant genes: beta-lactamases

Regarding the chromosomal and plasmid DNA, twelve beta-lactamase genes were generically annotated in both isolates, using Rast. Through annotations of greater accuracy using Resfinder-beta-lactamases, *bla*_{TEM-1} and *bla*_{KPC-2} with 100% similarity were detected (Table 2).

Other resistance genes

In both isolates, considering the chromosomal and plasmid DNA, genes for resistance to aminoglycoside [*acc(3)-III*, *rmt*, *ant(9)*, *tmrB* and *ant(9)*], chloramphenicol (*cat*), sulfonamide (*sulIII*), trimethoprim (*dhfr*), macrolides (*macA* and *macB*), fosfomicin (*fosA*), polymyxin (*pmr* and *arn*) and sulfonamide (*sulIII*) were detected (Table 2).

Multidrug efflux system

Regarding the chromosomal DNA of both isolates, genes relating to multidrug efflux systems from different families were detected: “Resistance nodulation-cell division (RND)”, “Adenosine triphosphate-binding cassette superfamily (ABC)”, “Major facilitator superfamily (MFS)”, “Multidrug and toxic compound extrusion family (MATE)” and “Drug/metabolite transporter superfamily (DMT)” (Table 2). There was no detection of these genes in the plasmid DNA.

Virulence genes (fimbriae, siderophores, biofilm and capsule)

In both isolates, in the chromosomal DNA, the following were detected: (a) siderophore-related genes (30); (b) fimbria-related genes (58); (c) genes relating to synthesis, modification, transportation and regulation of biofilm and extracellular matrix (14); and (d) genes relating to biosynthesis, regulation and transportation of capsular colanic acid (9). The specific genes detected are described in Table 2. None of the genes was detected in the plasmid DNA.

Secretion systems (SST)

Regarding the chromosomal DNA of both isolates, type 4 secretion systems (SST4), SST1 and SST6 were detected (Table 2). None of the genes was detected in the plasmid DNA.

Genetic environment of *bla*_{TEM-1}

The analysis on the genetic environment of *bla*_{TEM-1} showed that there were genes that coded for mobile elements adjacent to this gene. It is also important to highlight the presence of *acc(3)-III*, which provides resistance to aminoglycosides, immediately after the gene *bla*_{TEM-1} in both isolates (Figure 1).

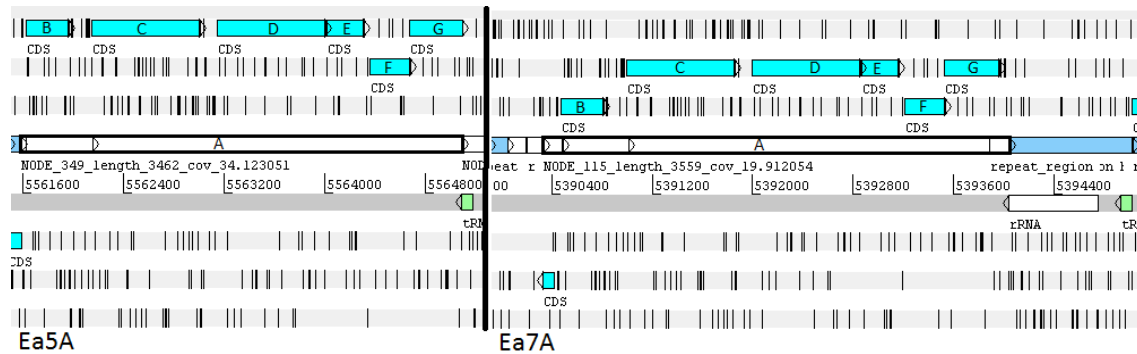


Figure 1. Genetic environment of *bla*_{TEM-1} in the *E. aerogenes* isolates Ea5A and Ea7A. The contigs harboring the genes are represented by A; the gene *bla*_{TEM-1} is represented by C; and the beginning and end of the contig (B and G) correspond to mobile elements. (D) corresponds to the aminoglycoside-resistance gene; (E) *tmrB* results in resistance to tunicamycin; and (F) represents a hypothetical protein.

Genetic environment of *bla*_{KPC-2}

Regarding the genetic environment of the gene *bla*_{KPC-2} that was detected in Ea5A, the gene for this beta-lactamase along with a gene that codes for a transposase comprise the contig node_2 (Figure 2). Anteriorly to this contig, there is contig node_401, which presents several genes that code for proteins of mobile elements, along with the DNA inversion/recombination/integration protein, resolvase and transposase. The isolate Ea7A presented anterior and posterior mobile elements similar to the gene *bla*_{KPC-2}, comprising contig node_2 (Figure 3).

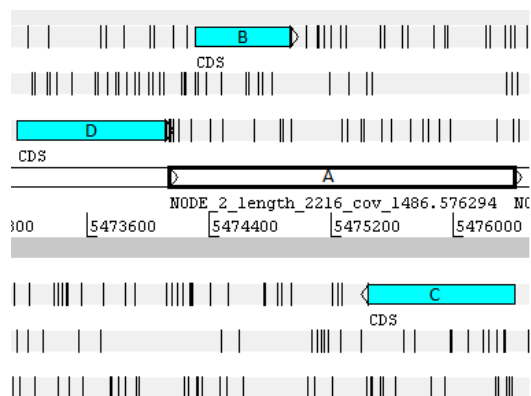


Figure 2. Genetic environment of the gene *bla*_{KPC-2} in the *E. aerogenes* isolate Ea5A. Contig node_2 (A) is composed of the gene *bla*_{KPC-2} (B) plus transposase (C). D corresponds to a mobile element in the contig anterior to gene node_401.

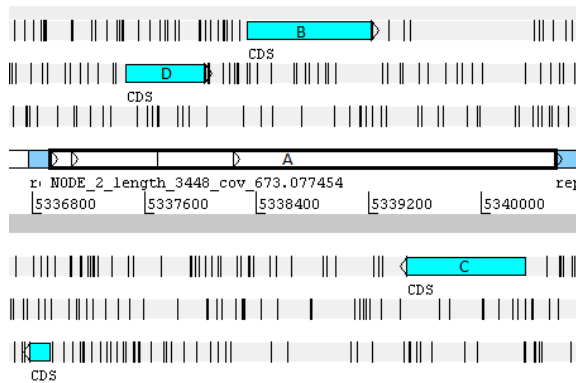


Figure 3. Genetic environment of the gene *bla*_{KPC-2} in the *E. aerogenes* isolate Ea7A. All genetic elements, i.e. *bla*_{KPC-2} (B), transposase (C) and mobile element (D) are present in the same contig node_2 (A).

Comparative analyses between the two isolates (Ea5A and Ea7A), at the level of large cholinergic blocks (LCBs)

The analysis of synteny between genomes of the isolates Ea5A and Ea7A that was performed using the Mauve software is represented in Figure 4.

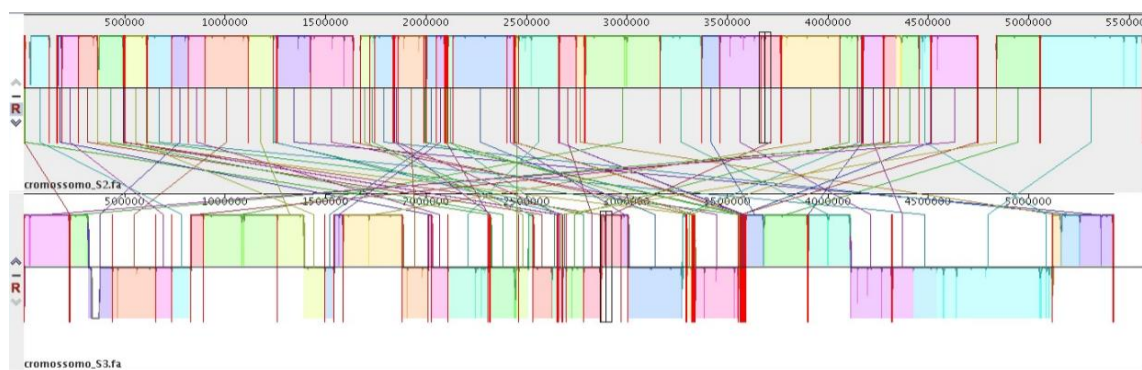


Figure 4. Genomic alignment of the *E. aerogenes* isolates Ea5A and Ea7A. Mauve aligned the genomic sequences of Ea5A (chromosome_S2) and Ea7A (chromosome_S3). LCBs with the same color represent homologous sequence areas, without rearrangements and shared between genomes.

Comparative analyses between the two isolates (Ea5A and Ea7A), at gene level

The characteristics of the isolates Ea5A and Ea7A regarding antimicrobial resistance genes, virulence genes, efflux systems and secretion systems are described in Table 2.

Comparative analyses between the two isolates (Ea5A and Ea7A), at nucleotide level

Alignment of nucleotide sequences of the beta-lactamases *bla*_{TEM-1} and *bla*_{KPC-2} enabled detection of an insertion of one thymine in position 519 in the gene *bla*_{KPC-2} of the colonization isolate Ea5A. This insertion was confirmed by aligning this sequence with the reference sequence for *bla*_{KPC-2} (AY034847) (Figure 5). No mutation, insertion or deletion

was detected in the sequences of *bla*_{TEM-1}.

```

Query  421  TTGGGCGGCCCGGCCGGGCTGACGGCCTTCATGCGCTCTATCGGCGATACCACGTTCCGT  480
Sbjct  426  TTGGGCGGCCCGGCCGGGCTGACGGCCTTCATGCGCTCTATCGGCGATACCACGTTCCGT  485
Query  481  CTGGACCGCTGGGAGCTGGAGCTGAACTCCGTCATTCCAGGCGATGCGCGGATACCTC  540
Sbjct  486  CTGGACCGCTGGGAGCTGGAGCTGAACTCCGTCCTCA-TCCAGGCGATGCGCGGATACCTC  544
Query  541  ATCGCCGCGCGCCGTGACGGAAAGCTTACAAAACTGACACTGGGCTCTGCACTGGCTGC  600
Sbjct  545  ATCGCCGCGCGCCGTGACGGAAAGCTTACAAAACTGACACTGGGCTCTGCACTGGCTGC  604

```

Figure 5. Alignment of the sequence *bla*_{KPC-2} of Ea5A (Query) with the reference sequence for *bla*_{KPC-2} (AY034847) (Subject), thus showing the insertion of one thymine in position 519.

Comparative analyses between the two isolates of *E. aerogenes* of the present study (Ea5A and Ea7A) and the strains of *E. aerogenes* previously deposited in GenBank (KCTC 2190 and EA1509E)

The genomic characteristics of the strains Ea5A, Ea7A, KCTC 2190 and EA1509E that were used for comparative analyses are presented in Table 1.

Exclusive proteins and proteins always present in the strains compared

The quantities of exclusive proteins in the genomes of Ea5A, Ea7A, KCTC 2190 and EA1509E were 448, 110, 246 and 423, respectively (Figure 6). On the other hand, 3,875 proteins were shared by the genomes of the four bacteria. Regarding the plasmid DNA, Ea5A presented 145 exclusive proteins versus 144 in Ea7A. The exclusive proteins relating to resistance, virulence, efflux systems and secretion systems of the isolates Ea5A and Ea7A in the chromosomal and plasmid DNA are described in Table 3.

Orthologs and paralogs (corresponding to beta-lactamases) that were exclusive or shared by the strains compared were observed (Table 4). These were independent of the generic annotation obtained through Rast.

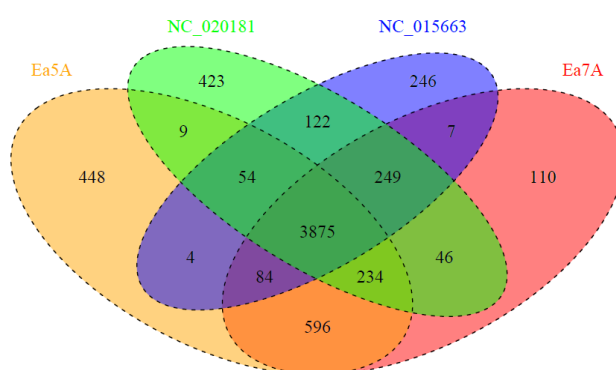


Figure 6. Comparison of the chromosomal DNA of the four strains of *E. aerogenes* by means of a Venn diagram. The Venn diagram shows the chromosomal DNA of Ea5A, Ea7A, KCTC 2190 (NC_015663) and EA1509E

(NC_020181) generated through EDGAR (BLOM *et al.*, 2009). Overlapping areas present common coding sequences shared between genomes. The number outside of the overlapping areas indicates the number of coding sequences in each genome that are not homologous to another sequenced genome.

Discussion

In the present study, the comparative analysis showed that the chromosomal DNA of the colonization isolate of *E. aerogenes* (Ea5A) presented more genes than the infection isolate (Ea7A). On the other hand, regarding the plasmid DNA, the infection isolate presented more genes. These findings emphasize that even considering that the isolates presented a clonal relationship through the ERIC-PCR, they presented different quantities of genes, thus showing that they were not genetically identical. It is also important to highlight the importance of a larger number of plasmid genes in the infection isolate, which may favor horizontal dissemination of these genes. It should be noted that several genes did not have their predicted function and, consequently, additional studies will be conducted with the objective of performing a more accurate annotation of these genes.

Regarding the chromosomal and plasmid DNA, the isolates Ea5A and Ea7A presented 12 genes of beta-lactamases. This was a larger number than what was detected by Diene *et al.* (2012) in the strain EA1509E and in the strain KCTC 2190 (CP002824). Accumulation of resistance determinants in samples of *E. aerogenes* had already been cited previously in the literature (Jaskulski *et al.*, 2013; Kuai *et al.*, 2014; Nogueira *et al.*, 2014). However, through genomic sequencing, the quantity of resistance genes that can be harbored by a strain becomes evident, which hampers the use of beta-lactams as a therapeutic option.

Through analysis on orthologs, the enzymes *bla*_{TEM-1} and *bla*_{KPC-2} comprise the group ORTHOMCL3033, which was exclusive to the isolates of the present study. In other words, the reference strains EA1509E and KCTC 2190 that were used for comparison do not present these genes. This highlights the ease with which these important resistance mechanisms, previously undetected in genomically sequenced *E. aerogenes*, are acquired.

Another point that deserves to be emphasized is the chromosomal location of the gene *bla*_{KPC-2} in the isolates Ea5A and Ea7A. The gene *bla*_{KPC} has been more commonly described associated with plasmids of various sizes and incompatibility groups (Patel; Rasheed; Kitchel, 2009; Cuzon *et al.*, 2010; Andrade *et al.*, 2011; Kuai *et al.*, 2014; Pereira *et al.*, 2015; Tavares *et al.*, 2015). However, including in Brazil, through hybridization, Quiles *et al.* (2015) confirmed the chromosomal location of the gene *bla*_{KPC} in *E. cloacae*, thus suggesting that the transposon associated with the gene *bla*_{KPC} can be inserted both in plasmids and in

chromosomes, given that it is a mobile element. Luo *et al.* (2014) confirmed that the dissemination of *bla*_{KPC-2} among various species of enterobacteria in China, including *E. aerogenes*, was related to the horizontal transference of the transposon and not to plasmids carrying *bla*_{KPC-2}.

In the isolates of the present study, genes that provide resistance to other classes of antimicrobials were also detected, in addition to beta-lactams. These included aminoglycosides, chloramphenicol, sulfonamide, macrolides, fosfomicin, fosmidomycin and polymyxin. A wide arsenal of resistance genes was also detected by Diene *et al.* (2015), through genomic sequencing of the strain EA1509E. In turn, in the strain KCTC 2190, only specific resistance to chloramphenicol was reported.

Subtle differences detected in quantifying these resistance genes among the isolates of the present study need to be highlighted, even though these were found to be clones according to the ERIC-PCR and were collected in the same hospital, over the same period. Additional copies of the gene are known to possibly affect their expression level (Peleg *et al.*, 2005). Therefore, detection of extra copies for the aminoglycoside resistance mechanisms, ABC efflux system and SST4 in the colonization isolate may have resulted in increased expression of these genes, in comparison with the infection isolate.

It is also interesting to highlight that genes resisting beta-lactams, streptomycin and sulfonamide were also detected in the plasmid DNA of the isolates of the present study. Plasmid resistance simultaneous to these classes of antimicrobial has also already been reported in *E. aerogenes* by other authors (Machado *et al.*, 2007; Diene *et al.*, 2012). Enterobacteria usually present various high-molecular-weight plasmids. In the isolates of the present study, two closed plasmids were observed, as well as the remaining plasmid DNA from which no other plasmid could be closed. This quantity of plasmids was similar to the one genomically detected by Diene *et al.* (2012). On the other hand, plasmids were not detected in the strain KCTC 2190, or in the strain studied by Eevers *et al.* (2015). However, through other genetic techniques, detection of plasmids in *E. aerogenes* is common (Perilli *et al.*, 2008; Tavares *et al.*, 2015).

Regarding the plasmid incompatibility groups detected in the isolates Ea5A and Ea7A, *incA/C* had already been reported in plasmids of *E. aerogenes* in Brazil by other authors (Machado *et al.*, 2007; Diene *et al.*, 2012), as had *incL/M* (Bogaerts *et al.*, 2007; Markovska *et al.*, 2014). Plasmids of *incX* and *incF* have also been reported in this species (Burmolle *et al.*, 2008; Norman *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2009). This confirms the variety of *inc* groups

currently described, among which the types *incN*, *incL/M* and *incF* are the most frequently reported ones in enterobacteria in Brazil (Cuzon *et al.*, 2010; Andrade *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2015). This reinforces the finding of *incL/M* in the present study.

Regarding the multidrug efflux systems in the isolates analyzed in the present study, only subtle differences were detected in the ABC transport system (186 versus 185, in Ea5A and Ea7A, respectively) and in the MFS superfamily (29 versus 31, in Ea5A and Ea7A, respectively). Systems of types RND, ABC, MFS and DMT have also already been reported in *E. aerogenes* (Diene *et al.*, 2012). Quantitatively, the most notable difference in the isolates Ea5A and Ea7A in relation to EA1509E lies in the ABC transport system (186 genes in Ea5A, 185 genes in Ea7A and 87 genes in EA1509E), thus giving room for further analysis on the ABC transport systems detected in Ea5A and Ea7A, with the objective of confirming whether all of them really correspond to multidrug transport systems.

Extracellular protein secretion is considered to be one of the main virulence mechanisms of bacterial infection (Sandkvist, 2001). Regarding the secretion systems SST1, SST4 and SST6 that were detected, the colonization isolate (Ea5A) presented five SST4 genes more than did Ea7A. Many bacterial genomes are known to be continuously bombarded with conjugative integrative elements that frequently carry the loci for SST4 (Wozniak; Waldor, 2010). In comparison with other secretion systems, SST4, presents extremely diversified functions (Wallden *et al.*, 2010; Voth *et al.*, 2012). Consequently, there is only limited comprehension of how multiple different SST4 genes act in order to perform their specific functions properly, despite being cited as one of the main factors responsible for bacterial diversity (Gillespie *et al.*, 2016).

Among fimbrial adhesins, detection of fimbria type I (*fim*) reinforces the finding that this type of fimbria is one of the forms most frequently reported in enterobacteria (Burmolle *et al.*, 2008; Struve *et al.*, 2009; De Cássia Andrade Melo *et al.*, 2014). On the other hand, there was no detection of fimbriae of type III (*mrk*), with a similar finding for KCTC 2190. This result contradicts the majority of the data in the literature, for which this type of fimbria also comprises one of the forms most detected in enterobacteria (Burmolle *et al.*, 2008; Struve *et al.*, 2009; De Cássia Andrade Melo *et al.*, 2014).

Regarding siderophores, both isolates presented enterobactin and aerobactin, which are the types most frequently detected in enterobacteria, including in species of *Enterobacter* (Mokracka *et al.*, 2003; 2004), as well as other siderophores that have become more often reported since the advent of genomic sequencing (yersiniabactin, TonB and bacterioferritin).

It is important to highlight the chromosomal location of virulence factors of fimbrial adhesins and siderophores presented by Ea5A and Ea7A, which corroborate the majority of the findings in the literature (Loper *et al.*, 1993; Mokracka *et al.*, 2004). However, less frequently, plasmid genes for fimbriae and siderophores also have been reported in *E. aerogenes* (Waters; Crosa, 1988; Burmolle *et al.*, 2008; Norman *et al.*, 2008).

Regarding the comparative analysis through Mauve, synteny between the isolates Ea5A and Ea7A was observed. Structural conservation and collinearity between the chromosomes of the isolates were observed. In addition, occurrence of inversion of LCBs was also observed. Chromosomal inversion is known to be one of the main genomic rearrangement events in bacteria (Kittichotirat *et al.*, 2010; Ramos *et al.*, 2014).

Furthermore, in relation to comparative analyses, Venn diagrams showed that the quantity of genes shared by Ea5A and Ea7A corresponded to 90% of the genome of Ea5A and to 92% of the genome of Ea7A, which may explain the similar resistance and virulence detected in the isolates. In comparing the *E. aerogenes* isolates of the present study and the reference strains previously sequenced in other studies (KCTC 2190 and EA1509_E), it could be seen that Ea5A and Ea7A were slightly more similar to EA1509_E (human pathogen) than to KCTC 2190. To the best of our knowledge, this is the first comparative analysis conducted between genomes of *E. aerogenes*. It showed the similarity between the strains of the present study (Ea5A and Ea7A), between the reference strains used (KCTC 2190 and EA1509_E) and also between the four strains that were compared, despite their different origins and geographic locations.

The comparative analysis performed between the isolates of this study, Ea5A and Ea7A, showed that they presented high chromosomal and plasmid similarity both regarding the general context and regarding the specific characteristics of this study: beta-lactamase genes, resistance genes relating to other classes of antimicrobials, virulence genes, efflux systems and secretion systems. However, despite the similarities (clonal relationship shown by the ERIC-PCR, same hospital, same sector and same sampling date), the particularities detected for each isolate should not be neglected, especially regarding the total quantity of genes, the quantitative aspects of the efflux and secretion systems and the genes that are exclusive to each isolate. Additional studies will be conducted in order to annotate the proteins that were obtained as hypothetical.

From the results obtained, it can be concluded that the isolates Ea5A and Ea7A from colonization and infection, respectively, present a wide arsenal of resistance and virulence

determinants. These results should serve to raise awareness among the medical authorities regarding the problem of patients colonized by *E. aerogenes*, because although this does not cause infection, the *E. aerogenes* isolate Ea5A, from colonization, presented virulence genes with the potential to establish infection, as well as mobile genetic elements capable of transmitting various genes to other bacteria present in the patient's enteric microbiota. Along with this, the wide arsenal of determinants of resistance to the antimicrobials most commonly used in clinical practice, as found in the present study, hampers treatment of infections caused by these bacteria.

Table 1. Genomic characteristic of the *Enterobacter aerogenes* isolates Ea5A and Ea7A analyzed in the present study and the strains KCTC 2190 and EA1509E that were used for performing the comparative analyses.

	Ea5A	Ea7A	KCTC 2190	EA1509E
Important feature	Human colonization	Human infection	2-3-butanediol producer	Human pathogen
Reference	Present study	Present study	Shin <i>et al.</i> (2012)	Diene <i>et al.</i> (2012)
Chromosome ^(a)	5.571.633pb	5.423.282pb	5.280.350pb	5.419.609pb
GC content	55.56%	55.73%	54.8%	55%
Chromosome CDS ^(b)	5571	5351	4.912	5.260
Predict proteins	4517	4402	3.824	3.415
Hypothetical proteins	1054	949	1088	1845
RNA _r	5	9	25	8
RNA _t	75	90	84	87
Plasmids ^(c)	Ea5A_pA: 5.436pb	Ea7A_pA: 5.534pb	ausentes	pEA1509_A: 162,202
	Ea5A_pB: 72.262pb	Ea7A_pB: 72.492pb		bp
	DNA plasmidial restante: 241.370pb	DNA plasmidial restante: 427.902pb		pEA1509_B: 9,294 bp
Inc groups	L/M e A/C	L/M e A/C	ausente	ND
Plasmid CDS ^(b)	438	630	ausente	239
Predict proteins	153	297	ausente	134
Hypothetical proteins	285	333	ausente	105

(a) chromosome size in base pairs, (b) CDS, coding sequences, (c) plasmids detected and respective sizes in base pairs

Table 2. Quantitative and qualitative characterization of the *Enterobacter aerogenes* isolates Ea5A and Ea7A regarding antimicrobial resistance genes, virulence genes, efflux systems and secretion systems, identified through Rast or Resfinder (beta-lactamases)

	Ea5A		Ea7A	
	Chromosomal DNA	Plasmid DNA	Chromosomal DNA	Plasmid DNA
Beta-lactamases	11 genes: Annotated through Rast (generically) Annotated through Resfinder: <i>bla</i> _{TEM-1} (S2.CDS.5550) e <i>bla</i> _{KPC-2} (S2.CDS.5428)	1 gene: Annotated through Rast (generically)	11 genes: Annotated through Rast (generically) Annotated through Resfinder: <i>bla</i> _{TEM-1} (S3.CDS.5307) <i>bla</i> _{KPC-2} (S3.CDS.5254)	1 gene: Annotated through Rast (generically)
Other resistance genes	20 genes: <i>acc(3)-III</i> (1), <i>rmt</i> (2), <i>ant</i> (9) (2), <i>tmrB</i> (1), <i>cat</i> (1), <i>sulII</i> (1), <i>dhfr</i> (4), <i>macA</i> (1), <i>macB</i> (1), <i>fosA</i> (1), <i>pmr</i> (3), <i>arn</i> (2)	2 genes: <i>ant</i> (9) (1) e <i>sulIII</i> (1)	21 genes: <i>acc(3)-III</i> (1), <i>rmt</i> (2), <i>ant</i> (9) (1), <i>tmrB</i> (1), <i>cat</i> (1), <i>sulIII</i> (3), <i>dhfr</i> (4), <i>macA</i> (1), <i>macB</i> (1), <i>fosA</i> (1), <i>pmr</i> (3), <i>arn</i> (2)	2 genes: <i>ant</i> (9) (1) e <i>sulIII</i> (1)
Multidrug efflux system	244 genes: RND (15), ABC (186), MFS (29), MATE (1), DMT (13)	-	245 genes: RND (15), ABC (185), MFS (31), MATE (1), DMT (13)	-
Siderophores	30 genes: enterobactina (<i>ent</i>) (13), aerobactina (1), yersiniabactina (<i>irp</i>)(7), <i>tonB</i> (7), bacterioferritina (2)	-	30 genes: Enterobactina (<i>ent</i>) (13), aerobactina (1), yersiniabactina (<i>irp</i>) (7), <i>tonB</i> (7), bacterioferritina (2)	-
Fimbriae	58 genes: fimbrias do tipo I (<i>fim</i>) (18), <i>csg</i> (1), fimbrias do tipo IV (<i>pil</i>) (5), <i>sfm</i> (3), sigma-fimbria (5), alfa- fimbria (3) e CFA/I (6), tipo não especificado (17)	-	58 genes: fimbrias do tipo I (<i>fim</i>) (18), <i>csg</i> (1), fimbrias do tipo IV (<i>pil</i>) (5), <i>sfm</i> (3), sigma-fimbria (5), alfa- fimbria (3) e CFA/I (6), tipo não especificado (17)	-
Biofilm	14 genes: <i>pga</i> (4), <i>bssR</i> (1), <i>cid</i> (3), <i>yjg</i> (6)	-	14 genes: <i>pga</i> (4), <i>bssR</i> (1), <i>cid</i> (3), <i>yjg</i> (6)	-
Capsule	9 genes <i>rcs</i> (5), <i>yegH</i> (1), <i>cps</i> (3)	-	9 genes <i>rcs</i> (5), <i>yegH</i> (1), <i>cps</i> (3)	-
Secretion systems (SST)	35 genes: SST4 (<i>imp</i> , <i>vas</i> e <i>vir</i>) (29), SST1 (<i>lap</i> , <i>lss</i> e <i>hly</i>) (4), SST6 (2)	-	30 genes: SST4 (<i>imp</i> , <i>vas</i> e <i>vir</i>) (24), SST1 (<i>lap</i> , <i>lss</i> e <i>hly</i>) (4), SST6 (2)	-

Table 3. Exclusive proteins relating to resistance, virulence, efflux systems and secretion systems of the *Enterobacter aerogenes* isolates Ea5A (colonization) and Ea7A (infection), identified through Rast.

	Ea5A		Ea7A	
	Chromosomal DNA	Plasmid DNA	Chromosomal DNA	Plasmid DNA
Exclusive proteins / ortólogos groups	448	145	110	144
Hypothetical proteins	124	105	74	103
Proteins relating to resistance	Beta-lactamase class C and other penicillin binding proteins* Streptomycin 3-O- adenylyltransferase EC 2.7.7.47/@ Spectinomycin 9-O-adenylyltransferase*	-	Dihydropteroate synthase type-2 EC 2.5.1.15 @ Sulfonamide resistance protein (2 copies)*	-
proteins relating to virulence	TonB (1), Rcs (3), YegH (1)	-	-	-
Multidrug efflux system	ABC (14), MFS (5), DMT (3), RND (2)	-	-	-
Secretion systems (SST)	SST4 (9) e SST1 (2)	-	-	-

* Generic annotation obtained through Rast

Table 4. Beta-lactamases and groups of orthologs and paralogs (corresponding to beta-lactamases) that were exclusive or shared by the *Enterobacter aerogenes* isolates Ea5A (colonization) and Ea7A (infection) that were compared.

Ortólogo/ parólogo	Proteína ^(a)	Proteína ^(b)	Ea5A	Ea7A	KCTC 2190	EA1509E
nulo	Beta-lactamase class C and other penicillin binding proteins	ND	+	-	-	-
nulo	Beta-lactamase	ND	-	-	-	+
1399	Metal-dependent hydrolases of the beta-lactamase superfamily I; PhnP protein	ND	+	+	++	+
1619	Beta-lactamase EC 3.5.2.6/beta-lactamaseD-alanine carboxypeptidase	ND	+	+	+	+
178	Beta-lactamase	ND	-	-	+	+
3033	Beta-lactamase EC 3.5.2.6	<i>bla</i> _{TEM-1}	+	+	-	-
		<i>bla</i> _{KPC-2}	+	+	-	-
3110	Beta-lactamase class C and other penicillin binding proteins	ND	-	+	+	+
4023	Beta-lactamase EC 3.5.2.6	ND	+	+	+	+
4211	beta-lactamase domain-containing protein	ND	+	+	+	++
522	Predicted hydrolase of the metallo-beta-lactamase superfamily, clustered with KDO2-Lipid A biosynthesis genes	ND	+	+	++	+
710	(beta-lactamase-like protein)	ND	+	+	+	++
830	Metallo-beta-lactamase superfamily protein PA0057	ND	+	+	+	+

(a) Generic annotation obtained through Rast, (b) Accurate annotation obtained through Resfinder-Beta-lactamase, * another annotation for the protein

References:

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*, 215, 403-410.

Andrade, L.N., Curiao, T., Ferreira, J.C., Longo, J.M., Clímaco, E.C., Martinez, R., Bellissimo-Rodrigues, F., Basile-Filho, A., Evaristo, M.A., Del Peloso, P.F., Ribeiro, V.B., Barth, A.L., Paula, M.C., Baquero, F., Cantón, R., Darini, A.L., Coque, T.M., 2011. Dissemination of *bla*_{KPC-2} by the spread of *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 258 clones (ST258, ST11, ST437) and plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among *Enterobacteriaceae* species in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*, 55, 3579-3583.

Blom, J., Albaum, S.P., Doppmeier, D., Pühler, A., Vorhölter, F.J., Zakrzewski, M., Goesmann, A., 2009. EDGAR: a software framework for the comparative analysis of

prokaryotic genomes. BMC Bioinformatics, 10, 154.

Bogaerts, P., Galimand, M., Bauraing, C., Deplano, A., Vanhoof, R., De Mendonca, R., Rodriguez-Villalobos, H., Struelens, M., Glupczynski, Y., 2007. Emergence of ArmA and RmtB aminoglycoside resistance 16S rRNA methylases in Belgium. J Antimicrob Chemother, 59, 459-464.

Burmolle, M., Bahl, M.I., Jensen, L.B., Sorensen, S.J., Hansen, L.H., 2008. Type 3 fimbriae, encoded by the conjugative plasmid pOLA52, enhance biofilm formation and transfer frequencies in Enterobacteriaceae strains. Microbiology, 154, 187-195.

Cuzon, G., Naas, T., Truong, H., Villegas, M-V., Wisell, K.T., Carmeli, Y., Gales, A.C., Navon-Venezia, S., Quinn, J.P., Nordmann, P., 2010. Worldwide Diversity of *Klebsiella pneumoniae* That Produces β -Lactamase blaKPC-2 Gene. Emerg Infect Dis, 16, 1349-1356.

Bullen, J.J., Rogers, H.J., Spalding, P.B., Ward, C.G., 2005. Iron and infection: the heart of the matter. FEMS Immunol Med Microbiol, 43, 325-330.

Cabral, A.B., Melo, R.C.A., Maciel, M.A.V., Lopes, A.C.S., 2012. Multidrug resistance genes, including *bla*_{KPC} and *bla*_{CTX-M-2}, among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop, 45, 572-578.

Calfee, D., Jenkins, S.G., 2008. Use of active surveillance cultures to detect asymptomatic colonization with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in intensive care unit patients. Infect Control Hosp Epidemiol, 29, 966-968.

Carattoli, A., Bertini, A., Villa, L., Falbo, V., Hopkins, K.L., Threlfall, E.J., 2005. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. J Microbiol Methods, 63, 219-228.

Darling, A.E., Tritt, A., Eisen, J.A., Facciotti, M.T., 2011. Mauve assembly metrics. Bioinformatics, 27, 2756-2757.

Davin-Regli, A., Pagès, J-M., 2015. *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. Front Microbiol, 6, 392.

de Cássia Andrade Melo, R., de Barros, E.M., Loureiro, N.G., de Melo, H.R., Maciel, M.A., Souza Lopes, A.C., 2014. Presence of fimH, mrkD, and irp2 virulence genes in KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Recife-PE, Brazil. Curr Microbiol, 69, 824-831.

Diene, S.M., Merhej, V., Henry, M., Filali, A.E., Roux, V., Robert, C., Azza, S., Gavory, F., Barbe, V., La Scola, B., Raoult, D., Rolain, J.M., 2012. The Rhizome of the Multidrug-Resistant *Enterobacter aerogenes* Genome Reveals How New “Killer Bugs” Are Created because of a Sympatric Lifestyle. Mol Biol Evol, 30, 369-383.

Duan, H., Chai, T., Liu, J., Zhang, X., Qi, C., Gao, J., Wang, Y., Cai, Y., Miao, Z., Yao, M., Schlenker, G., 2009. Source identification of airborne *Escherichia coli* of swine house surroundings using ERIC-PCR and REP-PCR. Environ Res, 109, 511-517.

Eevers, N., Van Hamme, J.D., Bottos, E.M., Weyens, N., Vangronsveld, J., 2015.

Draft genome sequence of *Enterobacter aerogenes*, a DDE-degrading and plant growthpromoting strain isolated from *Cucurbita pepo*. *Genome Announc*, 3, e00317-15.

Gillespie, J.J., Phan, I.Q.H., Scheib, H., Subramanian, S., Edwards, T.E., Lehman, S.S., Piitulainen, H., Rahman M.S., Rennoll-Bankert, K.E., Staker, B.L., Taira, S., Stacy, R., Myler, P.J., Azad, A.F., Pulliainen, A.T., 2015. Structural insight into how bacteria prevent interference between multiple divergent type IV secretion systems. *mBio*, 6, e01867-15.

Jaskulski, M.R., Medeiros, B.C., Borges, J.V., Zalewsky, R., Fonseca, M.E.C., Marinowic, D.R., Rocha, M.P., Nodari, P., Machado, D.C., 2013. Assessment of extended-spectrum β -lactamase, KPC carbapenemase and porin resistance mechanisms in clinical samples of *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents*, 42, 76-79.

Juhász, E., Jánvári, L., Tóth, A., Damjanova, I., Nobilis, A., Kristóf, K., 2012. Emergence of VIM-4- and SHV-12-producing *Enterobacter cloacae* in a neonatal intensive care unit. *Int J Med Microbiol*, 302, 257-260.

Kittichotirat, W., Bumgarner, R., Chen, C., 2010. Markedly different genome arrangements between serotype a strains and serotypes b or c strains of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *BMC Genomics*, 11, 489.

Kuai, S., Shao, H., Huang, L., Pei, H., Lu, Z., Wang, W., Liu, J., 2014. KPC-2 carbapenemase and DHA-1 AmpC determinants carried on the same plasmid in *Enterobacter aerogenes*. *J Med Microbiol*, 63, 367-370.

Lee, C.C., Lee, N.Y., Yan, J.J., Lee, H.C., Chen, P.L., Chang, C.M., Wu, C.J., Ko, N.Y., Wang, L.R., Chi, C.H., Ko, W.C., 2010. Bacteremia due to Extended-Spectrum- β -Lactamase-producing *Enterobacter cloacae*: Role of Carbapenem Therapy. *Antimicrob Agents Chemother*, 54, 3551-3556.

Li, L., Stoeckert, C.J.Jr., Roos, D.S., 2003. OrthoMCL: identification of ortholog groups for eukaryotic genomes. *Genome Res*, 13, 2178-2189.

Liu, W-Y., Wong, C-F., Chung, K.M-K., Jiang, J-W., Leung, F.C-C.. 2013. Comparative Genome Analysis of *Enterobacter cloacae*. *PLoS ONE*, 8, e74487.

Loper, J.E., Ishimaru, C.A., Carnegie, S.R., Vanavichit, A., 1993. Cloning and Characterization of Aerobactin Biosynthesis Genes of the Biological Control Agent *Enterobacter cloacae*. *Appl Environ Microbiol*, 59, 4189-4197.

Luo, Y., Yang, J., Ye, L., Guo, L., Zhao, Q., Chen, R., Chen, Y., Han, X., Zhao, J., Tian, S., Han, L., 2014. Characterization of KPC-2-producing *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, and *Klebsiella oxytoca* isolates from a Chinese Hospital. *Microb Drug Resist*, 20, 264-269.

Machado, E., Coque, T.M., Cantón, R., Novais, A., Sousa, J.C., Baquero, F., Peixe, L., 2007. High diversity of extended-spectrum β -lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* from Portugal. *J Antimicrob Chemother*, 60, 1370-1374.

Markovska, R.D., Stoeva, T.J., Bojkova, K.D., Mitov, I.G., 2014. Epidemiology and

molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacter* spp., *Pantoea agglomerans*, and *Serratia marcescens* isolates from a Bulgarian hospital. *Microb Drug Resist*, 20, 131-137.

Mokracka, J., Kaznowski, A., Szarata, M., Kaczmarek, E., 2003. Siderophore-mediated strategies of iron acquisition by extraintestinal isolates of *Enterobacter* spp. *Acta Microbiol Pol*, 52, 81-86.

Mokracka, J., Koczura, R., Kaznowski, A., 2004. Yersiniabactin and other siderophores produced by clinical isolates of *Enterobacter* spp. and *Citrobacter* spp. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 40, 51-55.

Nogueira, K.D., Paganini, M.C., Conte, A., Cogo, L.L., Taborda de Messias Reason I, da Silva MJ, Dalla-Costa LM. 2014. Emergence of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacter* spp. in patients with bacteremia in a tertiary hospital in southern Brazil. *Enferm Infecc Microbiol Clín*, 32, 87-92.

Norman, A., Hansen, L.H., She, Q., Sorensen, S.J., 2008. Nucleotide sequence of pOLA52: A conjugative IncX1 plasmid from *Escherichia coli* which enables biofilm formation and multidrug efflux. *Plasmid*, 60, 59-74.

Patel, J.B., Rasheed, J.K., Kitchel, B., 2009. Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: Activity, Epidemiology, and Laboratory Detection. *Clin Microbiol Newsl*, 31, 8.

Park, Y-J., Yu, J.K., Kim, S-I., Lee, K., Arakawa, Y., 2009. Accumulation of Plasmid-Mediated Fluoroquinolone Resistance Genes, *qepA* and *qnrS1*, in *Enterobacter aerogenes* Co-producing RmtB and Class A β -lactamase LAP-1. *Ann Clin Lab Sci*, 39, 55-59.

Peleg, A.Y., Franklin, C., Bell, J.M., Spelman, D.W., 2005. Dissemination of the metallo- β -lactamases Gene *blaIMP-4* among Gram-negative pathogens in a clinical setting in Australia. *Clin Infect Dis*, 41, 1549-1556.

Pereira, P.S., Borghi, M., Albano, R.M., Lopes, J.C.O., Silveira, M.C., Marques, E.A., Oliveira, J.C.R., Asensi, M.D., Carvalho-Assef, A.P.D'A., 2015. Coproduction of NDM-1 and KPC-2 in *Enterobacter hormaechei* from Brazil. *Microb Drug Resist*, 21, 234-236.

Perilli, M., Celenza, G., De Santis, F., Pellegrini, C., Forcella, C., Rossolini, G.M., Stefani, S., Amicosante, G., 2008. E240V Substitution Increases Catalytic Efficiency toward Ceftazidime in a New Natural TEM-Type Extended-Spectrum β -Lactamase, TEM-149, from *Enterobacter aerogenes* and *Serratia marcescens* Clinical Isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, 52, 915-919.

Quiles, M.G., Rocchetti, T.T., Fehlberg, L.C., Kusano, E.J., Chebabo, A., Pereira, R.M., Gales, A.C., Pignatari, A.C., 2015. Unusual association of NDM-1 with KPC-2 and *armA* among Brazilian *Enterobacteriaceae* isolates. *Braz J Med Biol Res*, 48, 174-177.

Ramos, P.I.P., Picão, R.C., de Almeida, L.G.P., Lima, N.C.B., Girardello, R., Vivan, A.C.P., Xavier, D.E., Barcellos, F.G., Pelisson, M., Vespero, E.C., Médigue, C., de Vasconcelos, A.T.R., Gales, A.C., Nicolás, M.F., 2014. Comparative analysis of the complete genome of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* Kp13 reveals remarkable genome

plasticity and a wide repertoire of virulence and resistance mechanisms. *BMC Genomics*, 15, 54.

Sandkvist, M., 2001. Type II Secretion and Pathogenesis. *Infect Immun*, 69, 3523-3535.

Schechner, V., Kotlovsky, T., Kazma, M., Mishali, H., Schwartz, D., Navon-Venezia, S., Schwaber, M.J., Carmeli, Y., 2013. Asymptomatic rectal carriage of blaKPC producing carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: who is prone to become clinically infected? *Clin Microbiol Infect*, 19, 451-456.

Shin, S.H., Kim, S., Kim, J.Y., Lee, S., Um, Y., Oh, M.K., Kim, Y.R., Lee, J., Yang, K.S., 2012. Complete Genome Sequence of *Enterobacter aerogenes* KCTC 2190. *J Bacteriol*, 194, 2373-2374.

Struve, C., Bojer, M., Krogfelt, K.A., 2009. Identification of a Conserved Chromosomal Region Encoding *Klebsiella pneumoniae* Type 1 and Type 3 Fimbriae and Assessment of the Role of Fimbriae in Pathogenicity. *Infect Immun*, 77, 5016-5024.

Taghavi, S., Wu, X., Ouyang, L., Zhang, Y.B., Stadler, A., McCorkle, S., Zhu, W., Maslov, S., van der Lelie, D., 2015. Transcriptional Responses to Sucrose Mimic the Plant-Associated Life Style of the Plant Growth Promoting Endophyte *Enterobacter* sp. 638. *PLoS ONE*, 10, e0115455.

Tavares, C.P., Pereira, P.S., de Andrade Marques, E., Faria Jr, C., de Souza, M.P.A.H., de Almeida, R., Alves, C.F.M., Asensi, M.D., Carvalho-Assef, A.P.D'A., 2015. Molecular epidemiology of KPC-2-producing Enterobacteriaceae (non-*Klebsiella pneumoniae*) isolated from Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 82, 326-330.

Tuon, F.F., Scharf, C., Rocha, J.L., Cieslinski, J., Becker, G.N., Arend, L.N., 2015. KPC-producing *Enterobacter aerogenes* infection, *Braz J Infect dis*, 19, 324-327.

Voth, D.E., Broederdorf, L.J., Graham, J.G., 2012. Bacterial type IV secretion systems: versatile virulence machines. *Future Microbiol*, 7, 241-257.

Wallden, K., Rivera-Calzada, A., Waksman, G., 2010. Type IV secretion systems: versatility and diversity in function. *Cell Microbiol*, 12, 1203-1212.

Waters, V.L., Crosa, J.H., 1988. Divergence of the aerobactin iron uptake systems encoded by plasmids pCoIV-K30 in *Escherichia coli* K-12 and pSMN1 in *Aerobacter aerogenes* 62-1. *J Bacteriol*, 170, 5153-5160.

Wozniak, R.A.F., Waldor, M.K., 2010. Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. *Nat Rev Microbiol*, 8, 552-563.

Zerbino, D.R., Birney, E., 2008. Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Res*. 18, 821-829.

Submission Confirmation

Entrada x



IJMM Editorial Office intern.journal@uni-wuerzburg.de por eesmail.elsevier.com
para mim, [adriane_cabral](#)

22:37 (Há 22 horas) ★



inglês ▾

>

português ▾

[Traduzir mensagem](#)[Desativar para: inglês](#) x

Re: Genomic analysis on Enterobacter aerogenes isolates positive for blaKPC-2 from colonization and infection among ICU patients: diversity of resistance and virulence genes
by ADRIANE BORGES CABRAL, MSc; Antônio M Rezende; Rodrigo S Galhardo; Ingrid R Alves; Célia M de Castro; Ana C Lopes
Research paper

Dear ADRIANE,

Your submission entitled "Genomic analysis on Enterobacter aerogenes isolates positive for blaKPC-2 from colonization and infection among ICU patients: diversity of resistance and virulence genes" has been received by International Journal of Medical Microbiology

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/ijmm/>.

Your username is: adrianeborgescabral@gmail.com

If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/IJMM/automail_query.asp.

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,