



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

Elizabeth Maria Bispo Beltrão

**Caracterização de grupos de incompatibilidade plasmidial e ambiente genético de
bla_{KPC-2}, *bla_{SCO-1}*, *sul2* e *aph (3')*-VIi em isolados clínicos de *Enterobacter aerogenes***

RECIFE

2017

ELIZABETH MARIA BISPO BELTRÃO

Caracterização de grupos de incompatibilidade plasmidial e ambiente genético de *bla*_{KPC-2}, *bla*_{SCO-1}, *sul2* e *aph* (3')-VII em isolados clínicos de *Enterobacter aerogenes*

Dissertação 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 mestre em Medicina Tropical.

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

RECIFE

2017

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa - CRB4-1010

B453c Beltrão, Elizabeth Maria Bispo.
Caracterização de grupos de incompatibilidade plasmidial e ambiente genético de blaKPC-2, blaSCO-1, sul2 e aph (3')-VII em isolados clínicos de *Enterobacter aerogenes* / Elizabeth Maria Bispo Beltrão. – 2017.
101 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientadora: Ana Catarina de Souza Lopes.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical. Recife, 2017.
Inclui referências e apêndices.

1. *Enterobacter aerogenes*. 2. Plasmídeos. 3. Transposon. I. Lopes, Ana Catarina de Souza (Orientadora). II. Título.

618.9883 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2017-150)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE (CCS)

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)

ELIZABETH MARIA BISPO BELTRÃO

**CARACTERIZAÇÃO DE GRUPOS DE INCOMPATIBILIDADE PLASMIDIAL E
AMBIENTE GENÉTICO DE *bla*_{KPC-2}, *bla*_{SCO-1}, *sul2* e *aph* (3')-VII EM ISOLADOS
CLÍNICOS DE *Enterobacter aerogenes***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestra em Medicina Tropical.

Aprovada em: 23/02/2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fábio André Brayner dos Santos (Examinador Interno)
CPqAM/FIOCRUZ

Prof^a. Dr^a. Nilma Cintra Leal (Examinadora Interna)
CPqAM/FIOCRUZ

Prof^a. Dr^a. Dyana Leal Veras
CPqAM/FIOCRUZ



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

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

Valdênia Maria Oliveira de Souza

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

Maria Amélia Vieira Maciel

DOCENTES PERMANENTES

Ana Catarina de Souza Lopes

Ana Lúcia Coutinho Domingues

Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto

Fábio André Brayner dos Santos

Heloísa Ramos Lacerda de Melo

Maria Amélia Vieira Maciel

Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho

Marli Tenório Cordeiro

Rejane Pereira Neves

Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

Valdênia Maria Oliveira de Souza

Vera Magalhães da Silveira

Vlăudia Maria Assis Costa

DOCENTES COLABORADORES

Líbia Cristina Rocha Vilela Moura

Virgínia Maria Barros de Lorena

Dedico,

Primeiramente a Deus, por sempre me acompanhar, guiar e proteger em todos os momentos.

Aos meus pais Pedro Beltrão in memoriam e Maria de Lourdes Beltrão, e a minha irmã Elisa Beltrão por todo o amor, dedicação, incentivo e apoio.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por que lamparina para meus pés é teu amor e tua palavra Senhor.

Aos meus pais, Maria e Pedro *in memoriam*, por sempre me apoiarem e sempre me ensinaram que a educação muda o mundo.

A minha irmã Elisa pelo apoio e força.

A Prof^a. Dr^a. Ana Catarina de Souza Lopes, orientadora deste trabalho, por toda a paciência, confiança e dedicação.

Ao Professor Dr^o Antônio Mauro Rezende do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães pela colaboração, apoio e presteza no sequenciamento e análise do DNA plasmidial.

A Coordenação da Pós-graduação nas pessoas das Professoras Dr^a Valdênia Maria Oliveira de Souza e Dr^a Maria Amélia Maciel, pelos esforços e dedicação para o melhoramento do curso.

Ao corpo docente do programa de Pós-graduação em Medicina Tropical nas pessoas dos professores Ricardo Arraes Ximenes, Daniel Udrisar, Bruno Severo, Vera Silveira, Heloisa Melo, Rosangela Coêlho, Maria Amélia e Ana Catarina S. Lopes, por seus ensinamentos inestimáveis para a formação intelectual dos alunos.

Aos amigos do laboratório, Armando, Jussiegles, Valdemir, Jailton, Mariana e Graça.

Às amigas do grupo de pesquisa Adriane, Elza, Érica, Giselle, Renata, Sibele e Alexsandra, pelos momentos de descontração, companheirismo e apoio.

Aos amigos da pós-graduação Cinthia, Fernanda, Jorge, Mirela, Kaliene, pelo apoio.

Ao amigo de longa data Jorge Belém pelos momentos de apoio, companheirismo e descontração.

Ao corpo técnico do programa e em especial ao Sr. Walter pelos momentos de descontração e presteza no desempenho da função.

À banca de defesa do projeto de mestrado.

Aos familiares, meus tios e primos pelo apoio, meus sinceros agradecimentos.

Aos eternos amigos Fabiana, Rafaela, Adelane, Adilson, Sônia, Janaina e Ricardo.

Aos professores da UFAL, Msc. Daniel Coimbra e Drº. Tiago Andrade por seus ensinamentos inestimáveis.

A técnica Cássia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, pela presteza no desempenho do sequenciamento de DNA.

A doutoranda Crhisllane do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães pelo apoio na análise do sequenciamento de DNA.

A Plataforma de Sequenciamento LABCEN/CCB na UFPE pelo uso das instalações para o sequenciamento dos produtos de PCR, em especial a Drª Heidi Lacerda e ao Prof Dr. Marcos Antônio de Moraes Júnior.

A ferramenta on line Sci-hub pelos artigos científicos disponibilizados.

Ao programa Mendeley pelo apoio na formatação do presente trabalho.

Aos componentes da banca avaliadora.

A Universidade Federal de Pernambuco, através do Centro de Ciências da Saúde no departamento de Medicina Tropical pela oportunidade de cursar esta Pós-graduação.

Em todos os momentos da vida precisamos da ajuda de outras pessoas, e para este trabalho contei com a ajuda, apoio e incentivo de algumas pessoas especiais, aqui expresso meus sinceros agradecimentos a todos que de alguma forma me ajudaram.

MUITÍSSIMO OBRIGADA! A todos.

“... Bem-aventurado aquele que tem a Deus de Jacó por seu auxílio, cuja esperança está no SENHOR, seu Deus, que fez os céus e a terra, o mar e tudo o que neles há e mantém para sempre a sua fidelidade. Que faz justiça aos oprimidos e dá pão aos que têm fome...”.

Salmos (146: 5-7)

RESUMO

Enterobacter aerogenes é uma enterobactéria frequentemente envolvida em Infecções Relacionadas a Assistência à Saúde, que pode apresentar resistência às diferentes classes de antimicrobianos. Há evidências de que a aquisição de resistência nessa espécie, se deve à disseminação plasmidial, juntamente com transposons, entre bactérias gram-negativas. Portanto, o objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização de grupos de incompatibilidade plasmidiais (Incs) e determinar o ambiente genético de *bla*_{KPC-2} e outros genes de resistência presentes em plasmídeos de isolados clínicos de *E. aerogenes* provenientes de um hospital público de Recife-PE. Foram selecionados 17 isolados clínicos de *E. aerogenes*, carreadores do gene *bla*_{KPC}, e os mesmos foram submetidos a PCR para os grupos Incs A/C, L/M e HI-2. Foram selecionados dois isolados de *E. aerogenes* para o sequenciamento do DNA plasmidial, por serem provenientes de septicemia em pacientes de UTI e portadores do gene *bla*_{KPC}. Todos os 17 isolados foram positivos na PCR para os Incs A/C e L/M, enquanto o Inc HI-2 não foi detectado. Na análise do sequenciamento plasmidial além da confirmação da presença do gene *bla*_{KPC-2}, também foram encontrados os genes de resistência, *bla*_{SCO-1}, *sul2* e *aph* (3')-Vli. O gene *bla*_{KPC-2} foi encontrado inserido no transposon *Tn4401* com uma deleção da sequência de inserção *ISKpn7* e dos genes *istA*, *istB* e transposase (*TnpA*). Próximo ao gene *bla*_{KPC-2} também foi encontrado o gene *aph* (3')-Vli. Com relação ao gene *bla*_{SCO-1}, este foi encontrado próximo a uma transposase *tnpAtnpR*, sendo este o primeiro relato do gene *bla*_{SCO-1} em isolados de *E. aerogenes*. A presença de diferentes genes de resistência, inseridos em plasmídeos Inc A/C₂ e L/M, confirmam a importância de se monitorar a circulação dos plasmídeos e analisar as sequências gênicas dessas estruturas. Deve-se destacar que embora o gene *bla*_{KPC-2} tenha sido codificado dentro do elemento *Tn4401*, foram encontradas diferentes características estruturais, notadamente a perda de *tnpA* e *ISKpn7*, indicando uma nova versão do *Tn4401* (a ser denominada *Tn4401i*). Essas características podem fazer com que o transposon *Tn4401* perca sua capacidade de transposição, pois as sequências de inserção são essenciais para a sua mobilidade. Estes achados enfatizam ainda a continuada recombinação e evolução de plasmídeos e do elemento *Tn4401* que contém o gene *bla*_{KPC-2}, e o potencial de disseminação plasmidial de diferentes genes de resistência por *E. aerogenes* no ambiente hospitalar.

Palavras-chave: *Enterobacter aerogenes*. Plasmídeos. Transposon.

ABSTRACT

Enterobacter aerogenes is a frequently enterobacterium involved in healthcare-associated infections, it may be resistant to different antimicrobials agents classes. There is evidence of resistance acquisition in this species, due to plasmid propagation, along with transposons between gram-negative bacteria. This study aimed to characterize Plasmid Incompatibility Groups (Incs) and to determine the genetic region of *bla*_{KPC-2} and other resistance genes present in plasmids from clinical isolates of *E. aerogenes* from a public hospital in Recife/PE. Seventeen clinical isolates of *E. aerogenes* carriers of the *bla*_{KPC} gene were selected and subjected to PCR for the Incs A/C, L/M and HI-2 groups. Only two *E. aerogenes* isolates were selected for the sequencing of the plasmid DNA by carriers *bla*_{KPC-2} gene and from septicemia in ICU patients. All seventeen strains were PCR positive for Incs A/C and L/M, while Inc HI-2 was not detected. Plasmid sequencing confirmed the presence of the *bla*_{KPC-2} gene, and resistance genes, *bla*_{SCO-1}, *sul2* and *aph* (3')-Vi were also found. *bla*_{KPC-2} gene was found inserted in *Tn4401* transposon with deletion of the ISK_{pn7} insertion sequence and the *istA*, *istB* gene and a transposase (*TnpA*). Next to the *bla*_{KPC-2} gene was also found the *aph* (3')-VII gene. Related to the *bla*_{SCO-1} gene, it was found next to a *tnpAtnpR* transposase, which is the first report of the *bla*_{SCO-1} gene in *E. aerogenes* isolates. Presence of different resistance genes inserted in Inc A/C₂ and L/M plasmids confirm the importance of monitoring the circulation of plasmids and analyzing their gene sequences. It is important to note that although the *bla*_{KPC-2} gene was encoded within the *Tn4401* element, different structural characteristics were found; noting that the loss of *tnpA* and ISK_{pn7} indicated a new version of *Tn4401* (will be called *Tn4401i*). These characteristics may do the transposon *Tn4401* to lose its transposing ability, since the insertion sequences are essential for its mobility. These findings emphasize the continuous recombination and evolution of plasmids and *Tn4401* element that contains the *bla*_{KPC-2} gene, in addition to the potential for plasmidial dissemination of different resistance genes by *E. aerogenes* in the hospital environment.

Keywords: *Enterobacter aerogenes*. Plasmids. Transposon.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa linear mostrando a estrutura genética dos plasmídeos Inc L/M circulares pACM1, pARM26 e pIGT15.	29
Figura 2. Mapa circular do plasmídeo IncFIIK pE01 de <i>E. hormaechei</i> . Os genes que codificam proteínas hipotéticas estão em rosa, os genes do <i>Tn3000</i> estão em verde.....	30
Figura 1. Eletroforese em gel de agarose à 2% do produto da PCR para o Inc A/C (465pb) em isolados de <i>E. aerogenes</i>	47
Figura 2. Eletroforese em gel de agarose à 2% do produto da PCR para o Inc L/M (785pb) em isolados de <i>E. aerogenes</i>	47
Figura 3. Comparação do locus dos genes <i>bla</i> _{KPC-2} e <i>aph</i> (3')-VII dos isolados de <i>Enterobacter aerogenes</i> Ea18A e Ea33A e uma sequência de referência depositada no banco de dados GeneBank (no. acesso KJ933392).....	48
Figura 4. Ambiente genético dos genes <i>sul2</i> e <i>bla</i> _{SCO-1} comparação do locus destes genes entre os isolados Ea18A e Ea33A.....	48
Figura 5. Comparação do locus do Inc A/C e L/M entre os isolados Ea18A e Ea33A de <i>E. aerogenes</i>	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais testes bioquímicos para identificação de <i>E. aerogenes</i>	20
Tabela 2. Primers utilizados na PCR e sequenciamento do produto de PCR para detecção dos Incs A/C, L/M e HI-2.	33
Tabela 1. Caracterização fenotípica de resistência, setor de coleta e fonte de isolamento dos 17 isolados de <i>E. aerogenes</i> carreadores do gene <i>blaKPC</i> provenientes de um hospital público de Recife-PE.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% - Porcentagem

μM – Micromolar

°C – Graus Celsius

μg – Micrograma

μL – Microlitro

AMC – Amoxicilina-clavulanato

AMI – Amicacina

AMO – Amoxicilina

AMP – Ampicilina

APS –ampicilina/sulbactama

ATM– Aztreonam

CAZ – Ceftazidima

CEFT - Ceftriaxona

CFO – Cefoxitina

CFX – Cefotaxima

CFZ – Cefazolina

CFT - Cefotaxima

CIP - Ciprofloxacino

CLSI – Instituto de Normas Clínicas e Laboratoriais do inglês “Clinical and Laboratory Standards Institute”

CN – Controle negativo

CP – Controle positivo

CPM – Cefepime

CRX – Cefuroxima

CTX – Cefotaxima

DNA - Ácido desoxirribonucleico do inglês “Deoxyribonucleic Acid”

dNTP - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

EDTA - Ácido etileno-diamino tetraacético

ERIC-PCR - “Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR ”

ESBL - “Extended-spectrum β-lactamase”

ERT - Ertapenem

EUA - Estados Unidos da América

GC – Guanina e Citosina
GEN – Gentamicina
IMP – Imipenem
IRAS - Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
KPC - “*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase”
LB- Luria-Bertani
LPS - Lipopolissacarídeo
MBLs - Metallo- β -lactamases
MDR – Multi Droga Resistente
MPM – Meropenem
mg – Miligrama
MgCl₂ – Cloreto de Magnésio
mL – Mililitro
NAL – Ácido nalidíxico
NaCl – Cloreto de Sódio
ng – Nanograma
NpmA – “rRNA adenine N-1-methyltransferase”
NOR – Norfloxacin
pb - Pares de bases
PCR - “Polymerase chain reaction”
pH - Potencial hidrogeniônico
PH – Proteína hipotética
pmol – Picomol
POL – Polimixina B
PIT - Piperacilina /Tazobactam
RNA_r - Ácido ribonucleico ribossomal
SULT – Sulfametoxazol-Trimetoprim
Taq – Taq polimerase
TBE - Tris, EDTA, Ácido bórico
TE - Tris EDTA
TnpR- Transposase Resolvase
Tnp – Transposon
TOB - Tobramicina

Tris - Hidroximetilaminometano

TSA - Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos

TSB - “Tryptic Soy Broth”

U - Unidade

UTI - Unidade Terapia Intensiva

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1 <i>Enterobacteriaceae</i>	20
2.1.1 <i>Enterobacter aerogenes</i>	20
2.2 β -lactâmicos e resistência bacteriana aos β -lactâmicos.....	22
2.2.1 β -lactamases	23
2.2.2 <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase (KPC).....	24
2.3 Plasmídeos e grupos de incompatibilidade plasmidial (Inc)	26
3 OBJETIVOS	31
3.1 Geral	31
3.2 Específicos.....	31
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1 Isolados Bacterianos	32
4.2 Extração de dna total	32
4.3 PCR para identificação dos incs L/M, A/C e HI-2	32
4.4 Eletroforese em gel de agarose	33
4.5 Sequenciamento do produto da pcr para os Incs A/C, L/M e HI-2	33
4.6 Extração do dna plasmidial	34
4.7 Sequenciamento do dna plasmidial	34
5 RESULTADOS.....	36
Artigo: Ambiente genético plasmidial de <i>bla</i> _{KPC-2} , <i>bla</i> _{SCO-1} , <i>sul2</i> e <i>aph</i> (3')-VII em isolados clínicos multidroga-resistente de <i>Enterobacter aerogenes</i>	36
6 CONCLUSÕES.....	56
REFERÊNCIAS	57
APÊNDICE A	69
Plasmid genetic environment of <i>bla</i> _{KPC-2} , <i>bla</i> _{SCO-1} , <i>sul2</i> and <i>aph</i> (3') -VII in multidrug-resistant clinical isolates of <i>Enterobacter aerogenes</i>	69
APÊNDICE B.....	90
Condições da PCR para os Incs HI-2, L/M e A/C.....	90
APÊNDICE C	91
Visualização pelo programa Artemis, mostrando a localização do gene <i>bla</i> _{KPC-2} , <i>sul2</i> , <i>aph</i> (3') VII e <i>bla</i> _{SCO-1} nos isolados Ea18A e Ea33A.....	91
APÊNDICE D	93
Visualização pelo programa Artemis, mostrando a localização das sequências correspondentes a tipagem do Inc L/M nos isolados Ea18A e Ea33A, respectivamente.....	93
APÊNDICE E.....	94

Visualização pelo programa Artemis, mostrando a localização das sequências correspondentes a tipagem do Inc A/C nos isolados Ea18A e Ea33A, respectivamente.	94
APÊNDICE F	95
Extração de DNA por Boiling (Fervura)	95
APÊNDICE G	96
Contigs obtidos no sequenciamento do DNA plasmidial do isolado Ea18A	96
APÊNDICE H	97
Contigs obtidos no sequenciamento do DNA plasmidial do isolado Ea33A	97
APÊNDICE I	100
Dados gerais do sequenciamento plasmidial, gerados pela ferramenta Rast.	100

1 INTRODUÇÃO

As Infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) continuam sendo motivo de grande preocupação aos órgãos públicos de vigilância epidemiológica, devido ao aumento da resistência bacteriana aos antimicrobianos, principalmente devido à disseminação plasmidial de genes de resistência. As consequências do aumento na resistência bacteriana estão associadas ao aumento na morbimortalidade, tempo de internação dos pacientes, bem como o aumento da pressão seletiva (CANTÓN et al., 2002; DEL FRANCO et al., 2015).

Entre as espécies bacterianas envolvidas em IRAS, há destaque para *Enterobacter aerogenes*, um patógeno comumente causador de infecções oculares, infecções de corrente sanguínea e do trato urinário, com altos níveis de resistência às diferentes classes de fármacos, inclusive aos carbapenêmicos. Há evidências de que a aquisição de resistência a antimicrobianos nessa espécie, se deve à disseminação plasmidial, juntamente com transposons, entre bactérias gram-negativas. Foi em Recife-PE, onde ocorreram os primeiros relatos no Brasil do gene *bla_{KPC}* em *Klebsiella pneumoniae* (MONTEIRO et al., 2009), *Pseudomonas aeruginosa* (JÁCOME et al., 2012) e *Proteus mirabilis* (CABRAL et al., 2015). Contudo, ainda não se chegou a um consenso da localização plasmidial do gene *bla_{KPC-2}* e de outros genes de resistência. Como também, quais as variantes de transposons *Tn4401* e quais os tipos de plasmídeos, ou seja, os grupos de incompatibilidade plasmidial (Inc), presentes em *E. aerogenes* (MARCHAIM et al., 2008; CHMELNITSKY et al., 2008; CHEN et al., 2013 e CHMELNITSKY et al., 2014; et al., 2016).

Ding et al. (2016), em estudo na China, observaram em isolados de *K. pneumoniae* e *E. aerogenes* a presença do gene *bla_{KPC-2}* sendo carregado pelo plasmídeo IncFII e em plasmídeo não tipável. No Brasil, Andrade et al. (2014), analisaram *in vitro*, a transferência plasmidial do IncFIIk entre *K. pneumoniae*, *Serratia marcescens* e *Citrobacter freundii*, mostrando que o *bla_{KPC-2}* pode ser facilmente disseminado entre essas enterobactérias. Pereira et al. (2013), no Rio de Janeiro, em estudo com isolados de *K. pneumoniae*, analisaram a presença do gene *bla_{KPC-2}* sendo carregado pelo IncN. Entretanto, ainda são escassos os trabalhos que abordam a presença e tipos de plasmídeos Inc e o ambiente genético de genes de resistência em isolados de *E. aerogenes* no Brasil. Os estudos existentes relatam a presença dos Inc em isolados pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, relatando esporadicamente a presença de alguns isolados de *E. aerogenes* carregando plasmídeo. Portanto, o presente trabalho propõe-se caracterizar geneticamente os grupos Inc plasmidiais e determinar o

ambiente genético de *bla*_{KPC-2} e de outros genes de resistência encontrados em isolados clínicos de *Enterobacter aerogenes* provenientes de um hospital público de Recife-PE.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Enterobacteriaceae*

A família *Enterobacteriaceae* é constituída por um grupo grande e heterogêneo de bacilos gram-negativos com diâmetro de 0,3 a 1,5µm, fermentadores de glicose, produtores de catalase e citocromo-oxidase negativos. Algumas espécies compõem a microbiota comensal do intestino do homem e de outros animais, podendo encontrar-se em solos, plantas e águas. Contudo, as enterobactérias são agentes de infecções do trato urinário, respiratório, gastrointestinal, intra-abdominais, septicemias, entre outras. Os principais gêneros desta família são *Escherichia spp.*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Citrobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Proteus spp.* e *Hafnia spp.* (KONEMAN et al., 2008).

2.1.1 *Enterobacter aerogenes*

Enterobacter aerogenes é uma das espécies mais comuns deste gênero. E possui características que possibilitam sua identificação, como motilidade positiva, pode ou não produzir urease e lisina descarboxilase, é lactose e citrato positiva, sulfeto de hidrogênio (H₂S) e indol negativos (Tabela 1). Contudo, não é possível a identificação a nível de espécie com métodos fenotípicos convencionais (KONEMAN et al., 2008; DAVIN-REGLI; PAGÈS, 2015).

Tabela 1. Principais testes bioquímicos para identificação de *E. aerogenes*.

<i>Enterobacter aerogenes</i>	
Lactose	+
Sacarose	+
Urease	+
Lisina descarboxilase	+
Ornitina descarboxilase	+
Citrato	+
Sulfeto de hidrogênio	-
Indol	-
Motilidade	+

Fonte: Adaptado de Koneman et al. (2008)

Enterobacter aerogenes foi originalmente chamada de *Aerobacter aerogenes*, e posteriormente introduzida ao gênero *Enterobacter* em 1960. Em 1971, esta espécie foi proposta para ser renomeada para *Klebsiella mobilis*, devido sua motilidade conferida por flagelos peritríquios e sua relação genética com o gênero *Klebsiella*. É importante salientar que a diferença fenotípica entre o gênero *Klebsiella* e *E. aerogenes* não se deve apenas a motilidade, mas também a outras características como a produção de urease e presença de ornitina descarboxilase (DAVIN-REGLI; PAGÈS, 2015). No entanto, em estudo na França, o sequenciamento do genoma completo em isolados clínicos de *Enterobacter*, sugeriu a reclassificação de *E. aerogenes* para uma espécie do gênero *Klebsiella*, por nome de *Klebsiella aeromobilis* (DIENE et al., 2013).

A bactéria *E. aerogenes* é comumente isolado de espécimes clínicos de trato respiratório, urinário, de sangue e trato gastrointestinal. A epidemiologia desta espécie em particular na Europa, mostra que esta espécie tem sido frequentemente envolvida em surtos de infecções desde 1993 (GEORGHIOU et al., 1995; GRATTARD et al., 1995). Em 2003, foi considerado um patógeno emergente, principalmente com um aumento na multidroga resistência. A situação nos anos 90 na Europa apontou para a dispersão de um clone epidêmico, e desde então tem sido amplamente detectado em hospitais e centros de saúde europeus (DAVIN-REGLI; PAGÈS, 2015).

Em estudo na França, Robert et al. (2014) analisaram a ocorrência de enterobactérias e observaram uma frequência de 2104 (1,57%) isolados de *E. aerogenes*, estando este patógeno em 8º lugar e em 4ª lugar como produtor de β -lactamase de Espectro Estendido (ESBL). Por outro lado, Pollett et al. (2014), com estudos na Califórnia-EUA, relata uma ocorrência de *E. aerogenes* com 7,8% (9), estando este patógeno em 3ª lugar, perdendo apenas para *K. pneumoniae* e *Klebsiella oxytoca*, respectivamente. No Brasil, em estudos na cidade de Sorocaba, Sakabe e Del Fiol (2016), analisaram a ocorrência de diversos espécimes bacterianos causadores de infecções e observaram uma frequência de 57,1% para *E. aerogenes* e de 42,9% para pacientes que evoluíram para óbito.

Enterobacter aerogenes é uma das espécies da família *Enterobacteriaceae* que mais apresenta resistência a carbapenêmicos, juntamente com *K. pneumoniae* e *E. coli*. Desde de 1990, *E. aerogenes* é considerado um patógeno multidroga-resistente de grande importância, responsável por infecções nosocomiais, incluindo infecções respiratórias, infecções no trato urinário, sepses e infecções pós-cirúrgicas (BOSI et al., 1999; DAVIN-REGLI; PAGÈS, 2015)

2.2 β -lactâmicos e resistência bacteriana aos β -lactâmicos

No grupo dos β -lactâmicos estão incluídas as penicilinas, as cefalosporinas, os monobactâmicos e as carbapenêmicos. Todos estes possuem em comum o anel- β -lactâmico, que é composto de três átomos de carbono e um de nitrogênio (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

A descoberta do primeiro β -lactâmico se deu em 1929, quando Alexander Fleming publicou, no *British Journal Experimental Patology*, o primeiro trabalho descrevendo a penicilina e seus efeitos sobre os micro-organismos gram-positivos. Mas apenas, em 1940, a penicilina foi produzida em maior quantidade. A penicilina, após 70 anos de uso clínico, ainda continua sendo o fármaco de primeira escolha no tratamento de algumas doenças como sífilis e a faringite estreptocócica, e atualmente os β -lactâmicos utilizada são os mais utilizados no tratamento de infecções (CASTANHEIRA et al., 2014).

Em 1976, tienamicina foi o primeiro carbapenêmico do grupo a ser descoberto. Obtida a partir da cultura do actinomiceto, denominado *Streptomyces cattleya*, sua utilização, porém não foi possível devido à instabilidade em altas concentrações. A partir de 1979, surgiu um derivado mais estável, denominado imipenem. Contudo, o imipenem só seria utilizado em larga escala, a partir da produção de um composto adicional, denominado cilastatina, que tem a capacidade de inibir uma enzima produzida pelo organismo humano e que provocava a inativação do antimicrobiano (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012; HAMMOUDI et al., 2015).

A resistência bacteriana aos antimicrobianos pode acontecer de duas formas: a resistência intrínseca, que é uma característica natural a determinados grupos de bactérias, e a resistência adquirida, que ocorre por mutação genética ou através da transferência de material genético, como ocorre na conjugação e transformação (DIAS, 2009; COIMBRA, 2011; ROGÉRIO; SOUSA; PAULO, 2014).

São variados os mecanismos de resistência pelos quais as bactérias resistem a determinados antimicrobianos a depender do fármaco, dentre esses destacam-se: a produção de enzimas (inativando os antimicrobianos), alteração da permeabilidade da membrana (impedindo a passagem do antimicrobiano por alterações ou perdas de porinas), presença de efluxo ativo, ou comumente conhecido como bombas de efluxo (expulsa ativamente o antimicrobiano para fora da célula) e alteração do sítio de ligação ao antimicrobiano

(modificando o sítio alvo onde ocorrerá a ligação ao antimicrobiano) (COIMBRA, 2011; GRILLO et al., 2013)

2.2.1 β -lactamases

As β -lactamases são capazes de catalisar a hidrólise do anel β -lactâmico impossibilitando assim sua atividade antimicrobiana. Este é o principal mecanismo de resistência das bactérias gram-negativas aos β -lactâmicos o qual inativa esses antimicrobianos diminuindo a habilidade destes de alcançarem o sítio alvo, as proteínas ligadoras de penicilina (PBPs) (BIENDO et al., 2008; CABRAL; LOPES, 2014).

Alguns micro-organismos produzem as enzimas β -lactamase com um grande espectro de ação. Dentre os mecanismos de resistência mais comuns em bactérias gram- negativas, destacam-se as β -lactamase de Espectro Estendido (ESBL) (CABRAL; LOPES, 2014). Mutações pontuais nos genes para β -lactamases ocasionaram o surgimento de cepas resistentes produtoras de ESBLs. A produção dessas enzimas ocorre predominantemente em *Klebsiella* spp. e em *E. coli*, mas podendo ser encontrado em vários patógenos importantes clinicamente. Seu espectro de ação estende-se aos antimicrobianos β -lactâmicos de amplo espectro, abrangendo as cefalosporinas de terceira geração e monobactâmicos, porém não conferem resistência às cefamicinas e carbapenêmicos (como imipenem, meropenem, ertapenem e doripenem) (AL-JASSER et al., 2006; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012; CASTANHEIRA et al., 2014).

Até o final de 1990, a maioria das ESBL pertencia as variantes Temoniera (TEM) ou Sufidril (SHV). Mais recentemente, as cefotaximases tipo (CTX-M) difundiu-se rapidamente e foi detectada em vários países (DIAS, 2009). O primeiro relato do gene CTX-M, se deu em isolados de *E. coli* coletados de pacientes da Alemanha e Itália (DEL FRANCO et al., 2015). No Brasil, Bastos et al., 2015, relatam a prevalência de TEM e CTX-M, em isolados de *E. cloacae* e *Enterobacter* spp., coletados em hospitais distribuídos por todo o país. Lopes et al., (2010), relatam o primeiro isolamento do gene CTX-M-28 encontrado no Brasil.

As Metallo β -Lactamases (MBL) são β -lactamases pertencentes à classe B de Ambler ou à classe 3 de Bush-Jacoby-Medeiros e hidrolisam todos os β -lactâmicos comercialmente disponíveis, sendo a única exceção o monobactam, aztreonam (CASTANHEIRA et al., 2004; MENDES et al., 2006; VOULGARI et al., 2016)

Em 1999, uma segunda subclasse de MBL VIM-1, foi descrita em *P. aeruginosa*, em isolados provenientes de Verona na Itália, esta hidrolisa todos os β -lactâmicos, exceto o

aztreonam (NORDMANN et al., 2011). Em 1997, a terceira subclasse de MBL, SPM-1, foi identificada em isolados de *P. aeruginosa* no estado de São Paulo, e em 2002, na Alemanha, foi identificada a quarta subclasse de MBL, GIM-1 (CASTANHEIRA et al., 2004; MENDES et al., 2006).

A β -lactamase SCO-1, foi recentemente relatada e constitui uma das poucas β -lactamase de espectro estreito inibida por ácido clavulânico em relação a outras β -lactamases. SCO-1 hidrolisa principalmente penicilinas e imipenem. Curiosamente, é observado na literatura que o gene *bla*_{SCO-1} tem disseminado em diferentes espécies de *Acinetobacter*. Parece muito provável que a disseminação deste gene possa estar ligada à propagação de um único plasmídeo entre todos estes isolados. Contudo há relatos da ocorrência deste gene em isolados de *K. pneumoniae* (WYRES; HOLT, 2016), *Salmonella enterica* (KTARI et al., 2009) e *E. coli* (PAPAGIANNITSIS et al., 2011).

2.2.2 *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)

Os carbapenêmicos são considerados como a opção terapêutica preferencial para o tratamento de infecções graves associadas aos cuidados de saúde com bactérias gram-negativas multidroga-resistentes. Entretanto, têm sido descritos vários mecanismos de resistência aos carbapenêmicos, entre estes a produção de enzimas que degradam os carbapenêmicos, as carbapenemases. Duas grandes classes de carbapenemases são mais comumente encontradas em enterobactérias atualmente: as metalo-betalactamases (sendo os tipos IMP, VIM e NDM as mais frequentes), e as serino carbapenemases (incluindo como mais comuns as do tipo KPC e as OXA-carbapenemases) (PINTO et al., 2014).

As *K. pneumoniae* carbapenemases (KPC) são disseminadas globalmente e classificados como β -lactamase da classe A de Ambler, sendo as variantes KPC-2 e KPC-3 as mais frequentes. Eles são principalmente associados a *K. pneumoniae*, contudo surgem cada vez mais relatos em outras enterobactérias, além de não fermentadoras, como *Pseudomonas* e *Acinetobacter* (CHEN et al., 2011; VANEGAS et al., 2014).

O primeiro isolado detectado como produtor de KPC, foi encontrado em uma cepa de *K. pneumoniae* nos Estados Unidos, na Carolina do Norte, em 1996, apresentando resistência a todos os β -lactâmicos. Ficando por vários anos restritos a esse país. Em seguida, surgiram outros relatos de uma variante da enzima em pacientes hospitalizados na costa leste dos EUA, sendo denominado de KPC-2 (CHEN et al., 2011). Porém, uma correção posterior revelou se

tratar da mesma variante descrita inicialmente como KPC-1, diferenciando-se apenas por um aminoácido (YIGIT et al., 2003).

Existem 23 variantes do gene *bla*_{KPC} que foram descritas até a data (janeiro de 2017), classificadas em ordem de sequência numérica em *bla*_{KPC-2} até *bla*_{KPC-24} (WANG et al., 2014). Relatos de KPC-2 (MONTEIRO et al., 2009), KPC-3 (RODRIGUES et al., 2016), KPC-4 (WANG et al., 2014), KPC-5 (CHEN et al., 2013), KPC-6 (LAMOUREAUX et al., 2012), KPC-7 (NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009), KPC-8 (WANG et al., 2014), KPC-9 (HIDALGO-GRASS et al., 2012), KPC-10 (WANG et al., 2014), KPC-11 (LASCOLS et al., 2012), KPC-12, KPC-13, KPC-14, KPC-15, KPC-16, KPC-17 (WANG et al., 2014), KPC-18 (*Gen Bank*), KPC-19 (*Gen Bank*), KPC-20 (*Gen Bank*), KPC-21 (*Gen Bank*), KPC-22 (*Gen Bank*), KPC-23 (*Gen Bank*) e KPC-24 (*Gen Bank*) (Acesso: <https://www.lahey.org/studies/other.asp>), foram descritos em vários países. Os genes variantes para KPC já foram descritos em várias espécies de bactérias gram-negativas, incluindo *K. pneumoniae* (MONTEIRO et al., 2009), *Enterobacter spp.* (TUON et al., 2015; CABRAL et al., 2016), *P. aeruginosa* (JÁCOME et al., 2012), *Acinetobacter spp.* (AZIMI et al., 2015), *Salmonella enterica* (RODRÍGUEZ; BAUTISTA; BARRERO, 2014), *S. marcescens* (MARGATE et al., 2015), *C. freundii* (YAO et al., 2014), *P. mirabilis* (CABRAL et al., 2015), e *Raoultella spp.* (CASTANHEIRA et al., 2009).

No Brasil, Monteiro et al. (2009) publicaram o primeiro relato de quatro cepas de *K. pneumoniae* carreadores do gene de resistência *bla*_{KPC-2}, em um hospital terciário na cidade de Recife. Cabral et al., (2015), em Recife, relataram o isolamento da primeira cepa de *P. mirabilis* produtora de KPC no Brasil. É evidente essa disseminação do gene *bla*_{KPC} em bactérias de importância clínica no país.

Em hospitais de Porto Alegre, Pinto et al. (2014) relataram uma predominância de 48,5% de isolados produtores de KPC (340/701), em espécies de *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, seguido de *E. aerogenes* em 6º lugar. Tal fato corrobora, a preocupante disseminação tanto em nível nacional quanto global dessa carbapenemase e o papel de destaque da *K. pneumoniae* e *E. aerogenes* com sua predisposição a causar infecções nosocomiais e habilidade de acumular e transferir mecanismos de resistência. Em Recife-PE, Cabral et al. (2016), relata a ocorrência de 30 (85,7%) isolados de *Enterobacter aerogenes* carreadores do gene *bla*_{KPC} em amostras provenientes de colonização e infecção em um hospital público.

Tuon et al. (2015), em estudos no Paraná, analisaram a ocorrência de *E. aerogenes* carreador do gene de resistência *bla*_{KPC} causando morbidade e mortalidade em 16 pacientes

infectados com este patógeno, em diferentes sítios de infecção. Observaram que a taxa de mortalidade em 30 dias foi de 37,5% sem associação com tratamento inadequado, e em pacientes com idade maior que 43 anos apresentou alta comorbidade.

2.3 Plasmídeos e grupos de incompatibilidade plasmidial (Inc)

Os dois principais fatores envolvidos na resistência bacteriana a antimicrobianos é a pressão seletiva e aquisição de genes de resistência. Esses genes que codificam resistência podem estar localizados no DNA cromossomal bacteriano ou principalmente nos plasmídeos, transposons e integrons. O DNA cromossômico é estável, por seu tamanho relativamente grande se comparado ao DNA plasmidial, este último por sua vez é facilmente transportado de uma linhagem a outra por conjugação bacteriana, permitindo a transferência de genes de resistência em conjunto (LIMA et al., 2014; PEREIRA et al., 2015)

Os plasmídeos são elementos genéticos normalmente circulares e extra cromossômico que têm a capacidade de se replicar utilizando uma sequência de DNA que serve como uma origem de replicação (um ponto inicial para a replicação de DNA). E apesar da replicação plasmidial ser autônoma, os plasmídeos possuem importantes mecanismos que controlam o número de cópias daquele mesmo plasmídeo numa célula bacteriana (OZGUMUS et al., 2008; SCHWARZ; JOHNSON, 2016).

De acordo com a capacidade dos plasmídeos serem transmitidos através da conjugação bacteriana, os mesmos podem ser classificados em plasmídeos conjugativos e não conjugativos (CARATTOLI, et al., 2009; ROGERS; STENGER, 2012). Os plasmídeos conjugativos podem ser incompatíveis entre eles, impedindo a coexistência de tipos iguais em uma mesma célula, pertencendo ao mesmo grupo de incompatibilidade (Inc) (BERGER et al., 2013).

A incompatibilidade é uma manifestação da relação entre plasmídeos que compartilham controles de replicação comum (BERGER et al., 2013), enquanto que os plasmídeos com diferentes controles de replicação são compatíveis. Neste modo, dois plasmídeos pertencentes ao mesmo grupo Inc não podem ser propagados na mesma linha celular (DATTA; HUGHES, 1983; COUTURIER et al., 1988).

A identificação do grupo Inc tem sido frequentemente usada para classificar os plasmídeos. O método tem sido uma ferramenta importante para rastrear a difusão de plasmídeos conferindo resistência antimicrobiana e também para acompanhar a evolução e disseminação de plasmídeos emergentes (CARATTOLI et al., 2005). Portanto, grupo Inc são

grupos de genes plasmidiais que podem ser tipados através da presença de sequências conservadas nos plasmídeos, como por exemplo, a origem de replicação *repA*, *repC*, e os genes *parA* e *parB* (CARATTOLI et al., 2005).

Couturier et al. (1988) desenvolveram um novo método para a identificação dos principais replicons de plasmídeos circulantes entre as *Enterobacteriaceae*. Este método baseou-se na hibridação com 19 sondas de DNA que reconhecem diferentes replicons básicos (COUTURIER et al., 1988). Os plasmídeos parecem aumentar a diversidade genética bacteriana, adquirindo e perdendo genes, e podem ser trocados horizontalmente entre populações bacterianas por conjugação ou mobilização (FRANCIA et al., 2004). Elas contêm genes essenciais para a iniciação e controle de genes de replicação e acessórios que podem ser úteis ao seu hospedeiro bacteriano tal como resistência antimicrobiana ou genes de virulência (FRANCIA et al., 2004) (GOUVÊA, 2005). A identificação e classificação dos plasmídeos deve basear-se em características genéticas presentes e constantes. Esses critérios são melhor atendidos por traços relacionados com a manutenção do plasmídeo, especialmente controles de replicação (RODRIGUES et al., 2016).

Desde 2005, está disponível um esquema de tipagem com base em PCR, tendo como alvo os replicons das principais famílias de plasmídeos que ocorrem em *Enterobacteriaceae* (HI2, HI1, I1- α , X, L / M, N, FIA, FIB, FIC, W, Y, P, A / C, T, K, B / O) (CARATTOLI et al., 2005).

Os primeiros Incs foram definidos da seguinte forma: Tipo Inc I, plasmídeos produtores de pili I, suscetíveis ao fago IfI; Inc N, plasmídeos relacionados a N3, suscetíveis ao fago IKE; Inc F, plasmídeos produtores de Pili tipo F, e suscetíveis ao fago Ff e Inc P, plasmídeos RP4 e suscetíveis ao fago PRR1. Em *Enterobacteriaceae* são conhecidos 27 grupos Incs da secção plasmidial da Coleção Nacional de Culturas (Londres, Reino Unido), incluindo seis variantes do IncF e três do IncI. Deve se ressaltar que também existem Incs ainda não tipáveis. (JACOBY et al., 2006; CARATTOLI, et al., 2009; BERGER et al., 2013).

Os Incs A/C estavam entre os primeiros plasmídeos a serem associados à resistência aos antibióticos em bactérias gram-negativas. Eles foram identificados pela primeira vez em hospitais de Paris, em isolados de *Pseudomonas aeruginosa* e *K. pneumoniae* (WITCHITS; CHABBERTY, 1972). Também já foram encontrados em muitas outras espécies gram-negativas, incluindo *E. coli* (FERNÁNDEZ-ALARCÓN; SINGER; JOHNSON, 2011), *Salmonella enterica* (CAO et al., 2012), *Yersinia pestis* (WELCH et al., 2007), *Photobacterium damsela* (KIM et al., 2008), *Vibrio cholerae* (CARRARO et al., 2014),

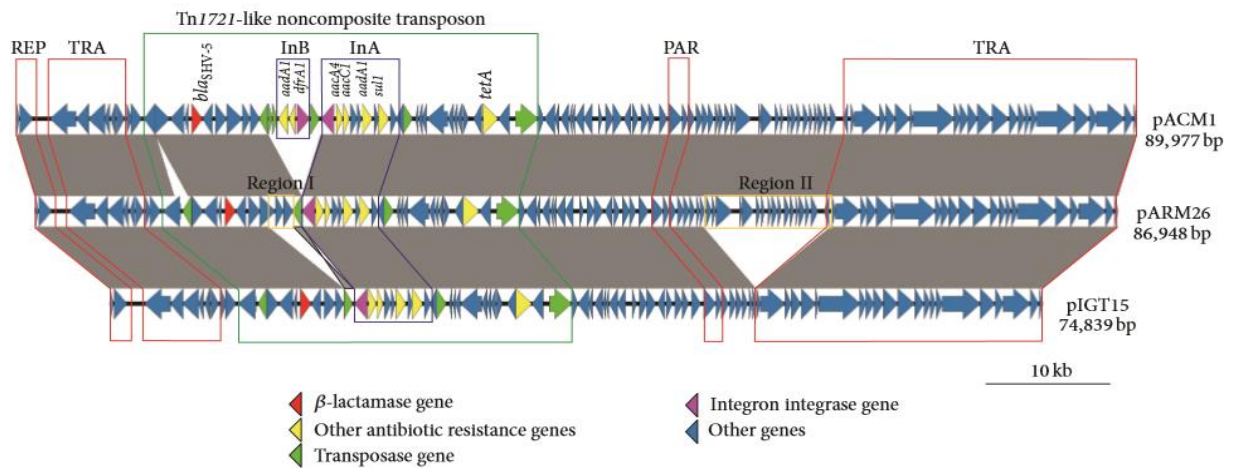
Aeromonas hydrophila (DEL CASTILLO et al., 2013) e *E. aerogenes* (DIENE et al., 2013; Cabral et al., 2016). Atualmente sabe-se que os plasmídeos bacterianos estão fortemente associados á resistência aos carbapenêmicos clinicamente relevantes e as cefalosporinas de 3ª geração (HARMER; HALL, 2015).

Quando os produtos das PCR de tipagem de replicons foram sequenciados, observou-se que a porção correspondente para a tipagem do plasmídeo, o *repA* do plasmídeo A/C de referência RA1 não eram idênticos. Com isso, surgiram linhagens que foram designadas Inc A/C₁ (RA1) e A/C₂ (CARATTOLI et al., 2005).

Dentre os diversos plasmídeos conjugativos, há uma especial atenção para o plasmídeo Inc L/M, um dos seis grupos principais de plasmídeos de resistência identificados em *Enterobacteriaceae*. Plasmídeos representando este grupo de incompatibilidade foram identificados como portadores de vários genes de resistência a β-lactâmicos e que codifica ESBLs, carbapenemases de classe A, B e D, e β-lactamases de classe C (ADAMCZUK et al., 2015).

Em *E. aerogenes* é relatado com maior frequência os Incs A/C (CARATTOLI, 2009; LINDSEY et al., 2011), L/M (PRESTON et al., 2014) e HI-2 (QUILES et al., 2015). Adamczuk et al. (2015), na Polônia, observaram a sequência genômica do plasmídeo IncL/M de Enterobactérias (*K. oxytoca*, *C. freundii*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *Erwinia amylovora*, *E. coli* e *S. marcescens*) (Figura 2) e observaram a presença dos genes de resistência *aadA2*, *bla_{CTX-M-14}*, *bla_{FOX-7}*, *bla_{IMP-4}*, *bla_{IMP-34}*, *bla_{KPC-4}*, *dfrA1*, *dfrA12*, *mphA*, *strA* e *strB*, sugerindo que boa parte dos genes que conferem resistência ao grupo dos β-lactâmicos estão localizados no plasmídeo IncL/M (Figura 1). Em Recife-PE, Cabral (2016), analisou a sequência completa do DNA genômico de dois isolados de *E. aerogenes* e dois de *E. cloacae*, e observaram a presença dos Incs A/C e L/M em ambos isolados de *E. aerogenes* do estudo e o Inc HI-2 nos isolados de *E. cloacae*.

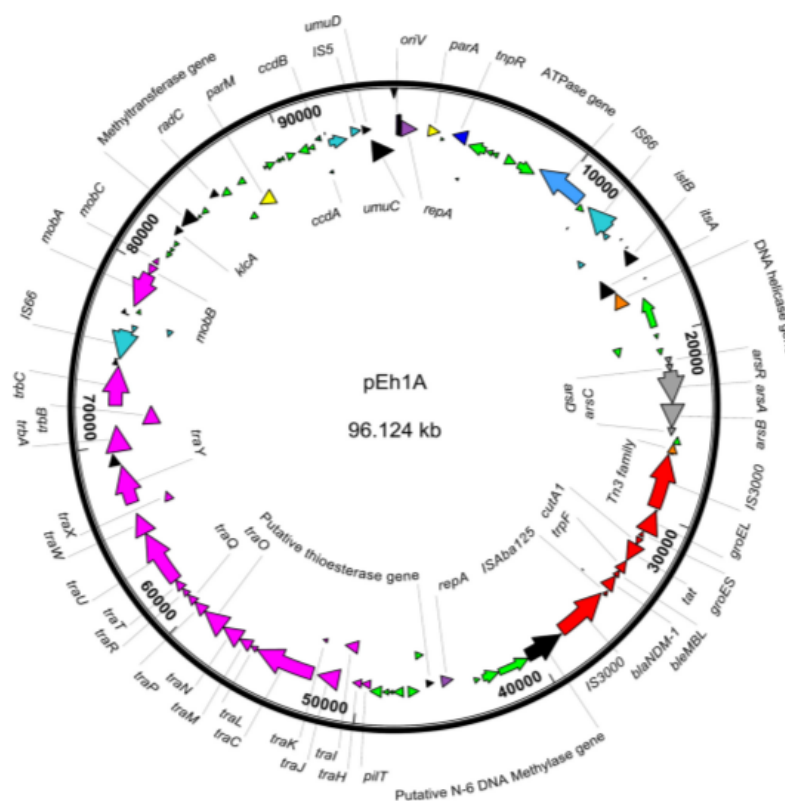
Figura 1. Mapa linear mostrando a estrutura genética dos plasmídeos Inc L/M circulares pACM1, pARM26 e pIGT15.



Fonte: Adamczuk, 2015

Os genes de resistência podem ser encontrados frequentemente inseridos no elemento móvel transposon, Adler et al. (2016), com estudo em um Hospital de Israel, analisaram a presença do gene *bla_{KPC}* inserido no Transposon *Tn4401*, nos plasmídeos IncFII e IncN, em isolados da família *Enterobacteriaceae* incluindo *K. pneumoniae*, *E. aerogenes* e *E. cloacae*. Campos et al. (2015), em estudo também com *Enterobacteriaceae*, analisaram a presença do gene de resistência *bla_{NDM-1}* no transposon *Tn3000* estando inserido no plasmídeo IncFII_K em um isolado de *Enterobacter hormaechei* (Figura 2).

Figura 2. Mapa circular do plasmídeo IncFII_K pE01 de *E. hormaechei*. Os genes que codificam proteínas hipotéticas estão em rosa, os genes do *Tn3000* estão em verde.



Fonte: (CAMPOS et al., 2015)

O transposon *Tn4401* possui seqüências que auxiliam na capacidade de transferência do mesmo, sendo constituído de duas *tnpA*, uma *tnpR*, as seqüências de inserção *ISKpn6* e *ISKpn7*, o gene *bla_{KPC}* e os genes *istA* e *istB* (CHEN et al., 2012; RIBEIRO et al., 2013; SHEPPARD et al., 2016). São 8 as variantes *Tn4401*, caracterizadas por deleções, a variante “a” é relatada por uma deleção de 99pb entre a seqüência de inserção *ISKpn7* e o gene *bla_{KPC}*, a variante “b” sem deleções, a variante “c” por uma deleção de 215pb, “d” por uma deleção de 68pb, “e” por uma deleção de 255pb, “f” caracterizada por uma *tnpA* cortada, ausência da seqüência de inserção *ISKpn7*-IR a esquerda do gene *istA* e ausência do gene *tnpR* do *Tn4401*, mas possui os genes *istA* e *istB*, “g” uma deleção igual a variante “c”, mas com uma única mutação nucleotídica no promotor e “h” caracterizada por uma versão truncada do *Tn4401e* (supressão de 255 bp a montante do gene *KPC*) no qual o gene *KPC* está flanqueado pelos *ISKpn6* e *ISKpn7* mas não possui os genes transposase e resolvase (NAAS et al., 2008; CHEN et al., 2012; BRYANT et al., 2013; MARTINEZ et al., 2016).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Realizar a caracterização de grupos Incs plasmidiais e determinar o ambiente genético de *bla*_{KPC-2} e outros genes de resistência presentes em isolados clínicos de *Enterobacter aerogenes* provenientes de um hospital público de Recife-PE.

3.2 Específicos

- Determinar os grupos Incs plasmidiais em isolados clínicos de *E. aerogenes*;
- Investigar o ambiente genético plasmidial de *bla*_{KPC-2} em isolados de *E. aerogenes*;
- Verificar a presença e ambiente genético de outros genes de resistência nos plasmídeos de isolados de *E. aerogenes*;
- Comparar a sequência de nucleotídeos do gene *bla*_{KPC-2}, e de outros genes de resistência, entre os dois isolados de *E. aerogenes* sequenciados;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Isolados Bacterianos

Para esse estudo foram selecionados 17 isolados de *Enterobacter aerogenes* por serem carreadores do gene *bla*_{KPC}. Esses isolados foram provenientes de estudo anterior e já estavam tipados quanto a presença do gene *bla*_{KPC-2} e ERIC-PCR (Cabral, et al. 2016). Essas bactérias foram provenientes de um hospital público de Recife-PE, entre 2011 e 2012, identificados por sistema automatizado Bactec 9120/Phoenix-BD e fazem parte da coleção de culturas bacterianas do Laboratório de Biologia Molecular e Genética Bacteriana (Departamento de Medicina Tropical, CCS, UFPE). Estão mantidas em estoque congelado com glicerol 15% a -20°C e para análise foram cultivadas em Caldo BHI (Brain Heart Infusion) ou Luria Bertani (LB) por 18 horas a 37°C, e semeadas em ágar nutriente.

4.2 Extração de DNA Total

A extração de DNA total foi realizada através da técnica de fervura, em que uma colônia bacteriana foi inoculada em 5mL do caldo LB, incubados por 37°C de 18-24h, em seguida centrifugado 1mL por 5min a 15000rpm, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspendido em 200µL de água Mili Q estéril, aquecido a 100°C por 10min e em seguida centrifugado por 5 min a 15000rpm. Foi retirado uma alíquota de 150µL do sobrenadante e armazenado a -20°C. O DNA foi quantificado utilizando o equipamento Nano Drop e diluído em água Mili Q estéril a 20ng/µL para realização das PCRs.

4.3 PCR para identificação dos Incs L/M, A/C e HI-2

Todos os 17 isolados de *E. aerogenes* foram investigados quanto a presença dos Incs L/M, A/C e HI-2 pela técnica de PCR, com iniciadores descritos na tabela 2 (CARATTOLI et al., 2005). Foram selecionados esses Incs por serem encontrados com maior frequência em *Enterobacter* spp. 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), 8 mM de dNTP (Promega), 25 mM de MgCl₂ e 10 µmol dos

iniciadores. Em cada partida de amplificação foi incluso um controle negativo sem DNA e um positivo. Como controles positivos foram utilizados os isolados de *E. aerogenes* e *E. cloacae*, identificados por Ea5A (Inc A/C e L/M) e Ec2A (Inc HI-2), respectivamente (CABRAL, 2016). As amplificações dos Incs foram realizadas com ciclos de desnaturação inicial à 95 °C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos, consistindo em cada ciclo de 1 minuto à 95°C para desnaturação, temperatura de anelamento descrito na tabela 1, e 1 minuto à 72°C para extensão. Após estes ciclos foi realizada uma etapa de alongamento final de 5 minutos à 72 °C (CARATTOLI et al., 2005).

Tabela 2. Primers utilizados na PCR e sequenciamento do produto de PCR para detecção dos Incs A/C, L/M e HI-2.

Incs	Iniciadores	Sítio Alvo	Tamanho do fragmento (pb)	Temperatura de anelamento
Inc A/C	For - 5'-GAGAACCAAAGACAAAGACCTGGA-3' Rev - 5'-ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTT-3'	<i>repA</i>	465	62°C
Inc L/M	For - 5'-GGATGAAAACCTATCAGCATCTGAAG-3' Rev - 5'-CTGCAGGGGCGATTCTTTAGG-3'	<i>repABC</i>	785	62°C
Inc HI-2	For - 5'-TTTCTCCTGAGTCACCTGTAAACAC-3' Rev - 5'-ATGAGCAACGATGCCTGGTA-3'	Interons	644	64°C

Inc – Grupos de Incompatibilidade Plasmidial.
Fonte: (CARATTOLI et al., 2005)

4.4 Eletroforese em gel de agarose

Após a PCR, todos os produtos foram corados com Blue Green Loading Dye (LGC Biotechnology), submetidos a eletroforese em gel de agarose (Promega) a 1,5% em tampão TBE e voltagem constante de 100V, visualizados em transiluminador de luz UV e fotografados em sistema de foto documentação Photocap da Vilber Lourmat. Foi utilizado um marcador de peso molecular de 100pb (Promega).

4.5 Sequenciamento do produto da PCR para os Incs A/C, L/M e HI-2

Os produtos de PCR positivos para os genes dos grupos Incs de 2 isolados representativos foram purificados através do Kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit e sequenciados pelo método de terminação de cadeia de

desoxirribonucleotídeo (Sanger *et al.*, 1977), para confirmação da identificação do Inc pela PCR. As sequências de nucleotídeos foram analisadas pelos programas BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e Clustal W do European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk/>). A tradução dos nucleotídeos em proteínas foi realizada utilizando o programa expasy (<http://web.expasy.org/tools/translate>). As sequências serão depositadas no *GeneBank*.

4.6 Extração do DNA plasmidial

A extração do DNA plasmidial foi realizada com o Kit de extração plasmidial Qiagen Mini Kit Plasmid (Qiagen), de acordo com especificações do fabricante. Para a visualização, o DNA plasmidial foi corado com Blue Green Loading Dye (LGC Biotechnology) e submetidos a eletroforese em gel de agarose a 0,8% em tampão TBE e voltagem constante de 70V. Foram visualizados em transiluminador de luz UV.

4.7 Sequenciamento do DNA plasmidial

Foram selecionados dois isolados de *E. aerogenes* (Ea33A e Ea18A) para realização do sequenciamento plasmidial, por serem provenientes de septicemia em pacientes da UTI, além de serem multidroga resistentes e portadores do gene *bla_{KPC-2}*.

O DNA plasmidial extraído foi quantificado em equipamento Nano Drop e pela plataforma fluorimétrica Qubit (ThermoFisher Scientific). As bibliotecas foram montadas utilizando o Kit TruSeq DNA PCR Free (Illumina). A quantificação das bibliotecas foi realizada pela técnica da PCR em Tempo Real através do kit Library Quantification – Illumina/Universal (Kapa Biosystems). O sequenciamento foi realizado utilizando o equipamento MiSeq (Illumina), com o cartucho MiSeq Kit V2 de 500 ciclos (Illumina) no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-CPqAM-Fiocruz-Recife-PE.

Foram utilizadas diversas ferramentas gratuitas para as análises dos fragmentos gerados. Os dados foram processados usando o Trimmomatic (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4103590/>) e montados utilizando a ferramenta Velvet (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18349386>), através do Velvetoptimiser (<http://www.vicbioinformatics.com/software/velvetoptimiser.shtml>). Os resultados da montagem foram submetidos a outro programa de montagem, o Cap3

(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC310812/>) e a anotação foi realizada através do Prokka (<http://www.vicbioinformatics.com/software/prokka.shtml>).

Para a análise dos resultados do sequenciamento foi utilizado o software Artemis Sanger (<http://www.sanger.ac.uk/science/tools/artemis>). E para a observação dos genes de resistência foram utilizados os sites *Resfinder* 2.1 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>), Rapid Annotation using Subsystem Technology - RAST (<http://rast.nmpdr.org/>) e Clustal (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

As sequencias nucleotídicas do DNA plasmidial dos isolados Ea18A e Ea33A, foram submetidas na base de dados de sequencias nucleotídicas *GenBank* sob número de acesso SAMN0685770 e SAMN06857861, respectivamente.

5 RESULTADOS

Artigo: Ambiente genético plasmidial de *bla_{KPC-2}*, *bla_{SCO-1}*, *sul2* e *aph (3')* -VII em isolados clínicos multidroga-resistente de *Enterobacter aerogenes*

RESUMO

Enterobacter aerogenes é uma enterobactéria frequentemente relatada como multirresistente a antimicrobianos principalmente devido à disseminação plasmidial, juntamente com transposons, de genes de resistência. Portanto, o objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização de grupos de incompatibilidade plasmidiais (Incs) em 17 isolados clínicos de *E. aerogenes* e determinar o ambiente genético de *bla_{KPC-2}* e outros genes de resistência presentes em plasmídeos em dois isolados clínicos de *E. aerogenes* provenientes de septicemia em pacientes de UTI de um hospital público de Recife-PE, Brasil. A investigação dos grupos Incs A/C, L/M e HI-2 foi realizada através de PCR, seguida de sequenciamento de DNA plasmidial em dois isolados. Todos os 17 isolados foram positivos na PCR para os Incs A/C e L/M, enquanto o Inc HI-2 não foi detectado. Na análise do sequenciamento plasmidial além da confirmação da presença do gene *bla_{KPC-2}*, também foram encontrados os genes de resistência, *bla_{SCO-1}*, *sul2* e *aph (3')*-VII. Com relação ao gene *bla_{KPC-2}*, este foi encontrado inserido no transposon *Tn4401*. Contudo, deve-se destacar que foram encontradas diferentes características estruturais, notadamente a perda de *tnpA* e *ISKpn7* e a presença de um *tnpR* indicando uma nova versão do *Tn4401* (a ser denominada *Tn4401i*). Essas características podem fazer com que o transposon *Tn4401* perca sua capacidade de transposição, pois as sequências de inserção são essenciais para a sua mobilidade. Estes achados enfatizam ainda a continuada recombinação e evolução de plasmídeos e do elemento *Tn4401* que contém o gene *bla_{KPC-2}*, e o potencial de disseminação plasmidial de diferentes genes de resistência por *E. aerogenes* no ambiente hospitalar.

Palavras-chave: *Enterobacter aerogenes*; plasmídeos; grupos de incompatibilidade plasmidial; gene *bla_{KPC-2}*

Introdução

As Infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) continuam sendo motivo de grande preocupação aos órgãos públicos de vigilância epidemiológica, devido ao aumento da resistência aos antimicrobianos, principalmente devido à disseminação plasmidial de genes de resistência. Suas consequências estão associadas ao aumento na morbimortalidade, tempo de internação dos pacientes, bem como o aumento da pressão seletiva (CANTÓN *et al.*, 2002; DEL FRANCO *et al.*, 2015).

Entre as espécies bacterianas envolvidas em IRAS, há destaque para *Enterobacter aerogenes*, um patógeno comumente causador de infecções oculares, infecções de corrente sanguínea e do trato urinário, com altos níveis de resistência às diferentes classes de fármacos, inclusive aos carbapenêmicos. Há evidências de que a aquisição de resistência a antimicrobianos nessa espécie, se deve à disseminação plasmidial de genes de resistência como *bla*_{KPC-2}, juntamente com transposons, entre bactérias gram-negativas. Contudo, ainda não se chegou a um consenso da localização plasmidial do gene *bla*_{KPC-2} e de outros genes de resistência. Como também, quais as variantes de transposons *Tn4401* e quais os tipos de plasmídeos, ou seja, os grupos de incompatibilidade plasmidial (Inc), presentes neste patógeno (MARCHAIM *et al.*, 2008; CHMELNITSKY *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2013 e CHMELNITSKY *et al.*, 2014; *et al.*, 2016).

Ding *et al.* (2016), em estudo na China, observaram em isolados de *K. pneumoniae* e *E. aerogenes* a presença do gene *bla*_{KPC-2} sendo carregado pelo plasmídeo IncFII e em plasmídeo não tipável. No Brasil, Andrade *et al.* (2014), analisaram *in vitro*, a transferência plasmidial do IncFIIk entre *K. pneumoniae*, *Serratia marcescens* e *Citrobacter freundii*, mostrando que o *bla*_{KPC-2} pode ser facilmente disseminado entre essas enterobactérias. Pereira *et al.* (2013), no Rio de Janeiro, em estudo com isolados de *K. pneumoniae*, analisaram a presença do gene *bla*_{KPC-2} sendo carregado pelo IncN. Entretanto, ainda são escassos os trabalhos que abordam a presença e tipos de plasmídeos Inc e o ambiente genético de genes de resistência em isolados de *E. aerogenes* no Brasil. Os estudos existentes relatam a presença dos Inc em isolados pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, relatando esporadicamente a presença de alguns isolados de *E. aerogenes* carregando plasmídeo.

Portanto, o presente trabalho propõe-se caracterizar geneticamente os grupos Inc plasmidiais e determinar o ambiente genético de *bla*_{KPC-2} e de outros genes de resistência

encontrados em isolados clínicos de *Enterobacter aerogenes* provenientes de um hospital público de Recife-PE.

Materiais e Métodos

Isolados Bacterianos

Para esse estudo foram selecionados 17 isolados de *Enterobacter aerogenes* (Tabela 1) por serem carreadores do gene *bla*_{KPC-2}. Esses isolados foram provenientes de estudo anterior e já foram analisados quanto a presença do gene *bla*_{KPC-2} e ERIC-PCR (Cabral, *et al.* 2016). Essas bactérias foram provenientes de um hospital público de Recife-PE, Brasil, entre 2011 e 2012, identificados por sistema automatizado Bactec 9120/Phoenix-BD e fazem parte da coleção de culturas bacterianas do Laboratório de Biologia Molecular e Genética Bacteriana (Departamento de Medicina Tropical, CCS, UFPE). Estão mantidas em estoque congelado com glicerol 15% a -20°C e para análise foram cultivadas em Caldo BHI (Brain Heart Infusion) ou Luria Bertani (LB) por 18 horas a 37°C e semeadas em ágar nutriente.

Extração de DNA total e PCR para os Incs L/M, A/C e HI-2

A extração de DNA total foi realizada através da técnica de fervura (LIMA, *et al.*, 2014) e o DNA foi quantificado utilizando o equipamento Nano Drop.

Todos os 17 isolados de *E. aerogenes* foram investigados quanto a presença dos Incs L/M, A/C e HI-2 pela técnica de PCR, com iniciadores descritos por Caratolli, *et al.* (2005). Foram selecionados esses Incs por serem encontrados com maior frequência em *Enterobacter* spp. 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), 8 mM de dNTP (Promega), 25 mM de MgCl₂ e 10 µmol dos iniciadores. Em cada partida de amplificação foi incluso um controle negativo sem DNA e um positivo. Como controles positivos foram utilizados os isolados de *E. aerogenes* e *E. cloacae*, identificados por Ea5A e Ec2A, respectivamente (CABRAL, 2016). As amplificações dos Incs foram realizadas com ciclo de desnaturação inicial à 95 °C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos, consistindo em cada ciclo de 1 minuto à 95°C, temperatura de anelamento descrito na tabela 1, e 1 minuto à 72°C, seguido de uma etapa de alongamento final de 5 minutos à 72 °C

(CARATTOLI et al., 2005). Após a PCR, todos os produtos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose (Promega) a 1,5%, visualizados em transiluminador de luz UV e fotografados em sistema de foto documentação (Vilber Lourmat).

Sequenciamento do produto da PCR para os Incs A/C, L/M e HI-2

Para confirmação da PCR, os produtos de PCR positivos para os genes Incs de 2 isolados representativos foram purificados através de Kit comercial e sequenciados pelo método de terminação de cadeia de desoxirribonucleotídeo (Sanger *et al.*, 1977). 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>).

Extração do DNA plasmidial

A extração do DNA plasmidial foi realizada com o Kit de extração plasmidial Qiagen Mini Kit Plasmid (Qiagen), de acordo com especificações do fabricante. Para a visualização, o DNA plasmidial foi corado com Blue Green Loading Dye (LGC Biotechnology) e submetidos a eletroforese em gel de agarose a 0,8% em tampão TBE e voltagem constante de 70V e visualizados em transiluminador de luz UV.

Sequenciamento do DNA plasmidial

Foram selecionados dois isolados de *E. aerogenes* (Ea33A e Ea18A) para realização do sequenciamento plasmidial, por serem provenientes de septicemia em pacientes da UTI, além de serem multirresistentes e portadores do gene *bla_{KPC}*.

O DNA plasmidial extraído foi quantificado em equipamento Nano Drop e pela plataforma fluorimétrica Qubit (ThermoFisher Scientific). As bibliotecas foram montadas utilizando o Kit TruSeq DNA PCR Free (Illumina). A quantificação das bibliotecas foi realizada pela técnica da PCR em Tempo Real através do kit Library Quantification – Illumina/Universal (Kapa Biosystems). O sequenciamento foi realizado utilizando o equipamento MiSeq (Illumina), com o cartucho MiSeq Kit V2 de 500 ciclos (Illumina).

Foram utilizadas diversas ferramentas gratuitas para as análises dos fragmentos gerados. Os dados foram processados usando o *Trimmomatic* (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014) e montados utilizando a ferramenta *Velvet* (ZERBINO; BIRNEY, 2008) através do *Velvet optimiser* (ZERBINO, 2011), os resultados dessa montagem ainda foram submetidos a outro programa de montagem, o *Cap3* (HUANG; MADAN, 1999) e a anotação foi realizada através do *Prokka* (Seemann, 2014). As sequências de DNA plasmidial foram analisadas utilizando o software Artemis Sanger (CARVER et al., 2008).

Número de acesso para a sequência nucleotídica

As sequências nucleotídicas do DNA plasmidial dos isolados Ea18A e Ea33A, foram submetidas na base de dados de sequências nucleotídicas GenBank sob número de acesso SAMN0685770 e SAMN06857861, respectivamente.

Resultados

Origem dos isolados e determinação dos grupos de incompatibilidade plasmidial (grupos Inc)

Dos 17 isolados de *E. aerogenes* carreadores do gene *bla_{KPC-2}* analisados no presente estudo, seis isolados foram provenientes de pacientes do setor de Unidade Coronariana (UCO), nove isolados de pacientes da Unidade de Terapia Intensiva (UTI), e 2 isolados da Cardiologia (Cardio), todos de um hospital público de Recife-PE (Tabela 1). Todos os 17 isolados foram positivos na PCR para os Inc A/C e L/M, amplificando fragmentos de 465 pb e 785 pb, respectivamente (Figura 1 e 2). O Inc HI-2 não foi detectado.

Análise geral do sequenciamento dos plasmídeos

A análise do sequenciamento plasmidial dos isolados Ea18A e Ea33A mostrou, respectivamente, que o número de leituras foi de 90.280,66 e 103.337,11; a quantidade de contigs foi de 21 e 76; e o número de proteínas foi 335 e 355. O DNA plasmidial apresentou uma quantidade média de 51,9% e 52,3% de GC para os isolados Ea18A e Ea33A, respectivamente.

Análise do ambiente genético de *bla*_{KPC-2}, *bla*_{SCO-1} *sul2* e *aph* (3')-VII

Após análise do sequenciamento plasmidial, através de anotações mais acuradas utilizando os banco de dados *Resfinder-β-lactamase* e *GeneBank* foi observada a presença dos genes de resistência *bla*_{KPC-2}, *bla*_{SCO-1} *sul2* e *aph* (3')-VII no DNA plasmidial de ambos os isolados (Ea18a e Ea33A). Todos esses genes foram identificados com 100% de similaridade quando comparados com sequências depositadas no *GeneBank*, para os genes *bla*_{KPC-2} (AY034847), *bla*_{SCO-1} (NG_049978.1), *sul2* (GQ421466) e *aph* (3')-VII (KU922932.1).

A sequência do gene *bla*_{KPC-2} apresentou um tamanho de 882pb. Este gene foi observado em ambientes genéticos semelhantes para ambos isolados, inserido entre a sequência de inserção IS*Kpn6* e aos genes correspondentes a uma transposase *TnpA* com 839pb e a resolvase *TnpR* com 557pb (Figura 3), demonstrando que o gene *bla*_{KPC-2} está evidentemente inserido no transposon *Tn4401*. Contudo, em ambos isolados observou-se uma deleção da sequência de inserção IS*Kpn7*, como também dos genes *istA*, *istB* e da outra transposase *TnpA*. Foi observada a presença de cinco genes adicionais, encontrados próximos ao gene *bla*_{KPC-2}, uma proteína *repC*, um regulador, um repressor de proteína F, uma proteína hipotética e uma *mobC* (Figura 3).

A partir da análise das sequências plasmidiais, foi observado que os genes *bla*_{KPC-2} e *aph* (3')-VII, em ambos isolados, estavam inseridos próximos, como pode ser observado na figura 3. A sequência deste gene *aph* (3')-VII apresentou um tamanho de 780pb nos 2 isolados. Este gene foi observado próximo ao gene *repC*, seguida de um regulador, um repressor, uma proteína hipotética, os genes *mobC* e *mobA* (Figura 3).

Com relação a *sul2*, a sequência deste gene apresentou um tamanho de 816pb em ambos os isolados e foi observado em ambientes genéticos semelhantes nos 2 isolados. O gene *sul2* foi encontrado inserido próximo a uma proteína hipotética, seguida dos genes *cobQ*, *parB* e uma outra proteína hipotética (Figura 4).

Outra sequência gênica encontrada nos dois isolados, foi o gene de resistência *bla*_{SCO-1}, que apresentou um tamanho de 867pb. Este gene foi observado em ambientes genéticos semelhantes para ambos isolados, sendo encontrado inserido próximo a um gene correspondente a enzima transposase *TnpA*, seguido de um gene para celulase e uma proteína hipotética (Figura 4).

Análise do ambiente genético dos Grupos de Incompatibilidade Plasmidial (Inc)

No sequenciamento plasmidial o Inc L/M foi encontrado em ambos isolados (Ea18A e Ea33A), confirmando os dados da PCR. Os genes *repA*, *repB* e *repC*, utilizados para a tipagem do Inc L/M, foram encontrados inseridos logo em seguida aos genes *trbN*, *trbA* e *trbC*, e o transposon *Tn3*, seguidos dos genes *excA*, *docA*, *traX*, *traW*, *traU*, *traR*, *traQ*, *traP*, *traO*, *traN* e *traM* (Figura 5).

Com relação ao ambiente genético do Inc A/C, foi encontrado o gene *Fe3*, responsável pela produção de sideróforo, 34 proteínas hipotéticas, uma nuclease, uma redutase, os genes *dsbA*, *sppA*, *stbA*, uma proteína reguladora, uma permease, os genes *traG*, *traH* e *traF*, e o gene *repA* (utilizado na tipagem para o Inc A/C), para ambos os isolados sequenciados (Ea18A e Ea33A) (Figura 5).

Para análise de variantes do Inc A/C, foi realizada uma comparação do gene *repA*, que é utilizado na tipagem para o Inc A/C, com sequências desse mesmo gene, para as variantes Inc A/C₁ (NC_012885.1) e A/C₂ (NC_023908.1). Os 2 isolados do estudo apresentaram similaridade de 94,2% para a variante A/C₁, e 98,5% de similaridade para uma sequência de A/C₂, sendo então definida como a variante Inc A/C₂ nesse estudo.

Discussão

Os genes de resistência a antimicrobianos são facilmente disseminados entre as enterobactérias, estando em sua maioria inseridos em plasmídeos e/ou transposons. Contudo, pouco se sabe sobre a localização plasmidial desses genes e quais os plasmídeos e transposons disseminados. Com isso, determinar a localização plasmidial desses genes e analisar as sequências gênicas dos plasmídeos, é útil para se entender quais os Incs circulantes no ambiente hospitalar. Como também quais os genes de resistência antimicrobiana que podem ser facilmente disseminados por estes Incs em isolados de *E. aerogenes*, patógeno causador de IRAS. Contudo, pouco se sabe sobre quais os plasmídeos disseminados e sobre o ambiente genético dos genes *bla*_{KPC-2}, *bla*_{SCO-1} *sul2* e *aph* (3')–VII, principalmente em isolados de *E. aerogenes* no Brasil.

O gene *bla*_{KPC} é frequentemente encontrado inserido no transposon *Tn4401*, podendo estar em plasmídeos distintos, como os Incs N, L/M e FI-A em isolados de *E. aerogenes* e *K. pneumoniae* (LI *et al.*, 2014; ADAMCZUK *et al.*, 2015; RODRIGUES *et al.*, 2016; TIJET *et*

al., 2016; RODRIGUES *et al.*, 2016). A literatura descreve a presença de 8 variantes diferentes do *Tn4401* (NAAS *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2012) sendo as variantes “a” e “b” as mais comuns. Essas 2 últimas variantes apresentam as sequências de inserção ISK_{pn7} e ISK_{pn6} e os genes *istA* e *istB*, juntamente com o gene *bla*_{KPC}, que compõem o transposon *Tn4401* (ANDRADE *et al.*, 2011; RODRIGUES *et al.*, 2016; TIJET *et al.*, 2016). Dados estes que diferem em parte do presente estudo, no qual a sequência de inserção ISK_{pn7} e as sequências *tnpA*, *istA* e *istB* não estavam presentes, nos 2 isolados sequenciados. Contudo, a sequência do gene *bla*_{KPC}, a sequência de inserção ISK_{pn6} e uma transposase *tnpA* estavam presentes. Portanto, está descrita no presente estudo uma nova variante do *Tn4401*. A deleção dessas sequências podem fazer com que o transposon *Tn4401* perca sua capacidade de transposição, sendo as sequências de inserção essenciais para a mobilidade do *Tn4401* (CHEN *et al.*, 2012; AGEEVETS *et al.*, 2016).

Os genes *sul2* e *aph (3')-VII* foram outros genes de resistência encontrados nos plasmídeos (Incs L/M ou A/C) dos isolados do estudo. O gene *sul2* já foi encontrado em isolados de *E. coli*, *E. aerogenes*, *E. cloacae* e *K. pneumoniae* nos Incs A/C, FII, B/O, I1, FI-A, FI-B (WU *et al.*, 2010; HARMER; HALL, 2015) e N (LI *et al.*, 2014). O gene *aph (3')-VII* já foi encontrado nos Incs A/C e L/M de isolados como *K. pneumoniae*, e confere resistência aos aminoglicosídeos, relacionado com a inativação da amicacina. No presente estudo, ambos os isolados sequenciados apresentaram resistência a amicacina. Este é o primeiro relato da localização plasmidial e ambiente do gene *aph (3')-VII* em *E. aerogenes* no Brasil.

O gene *bla*_{SCO-1} encontrado nos isolados desse estudo, confere resistência as penicilinas e em menor intensidade as cefalosporinas e carbapenêmicos (POIREL *et al.*, 2007). São escassos os estudos que abordam a presença deste gene. Há relatos da presença desse gene em *Acinetobacter spp.* (POIREL *et al.*, 2007), *K. pneumoniae* (WYRES; HOLT, 2016), *Salmonella enterica* (KTARI *et al.*, 2009) e *E. coli* (PAPAGIANNITSIS *et al.*, 2011). Sendo este o primeiro relato deste gene em isolados de *E. aerogenes*.

Quanto a presença dos Incs, de acordo com estudos anteriores, observou-se uma frequência maior dos Incs N, A/C e L/M em *Enterobacteriaceae* distribuídas em vários países (POIREL *et al.*, 2011; ADAMCZUK *et al.*, 2015; WAILAN *et al.*, 2016). No Brasil, Pereira *et al.* (2013), analisando isolados de *K. pneumoniae* distribuídos em diferentes estados brasileiros, observaram a presença apenas do Inc N em todos os isolados do estudo, incluindo 2 isolados de Recife. No Brasil, os trabalhos que abordam a presença dos Incs em isolados de *E. aerogenes* são escassos e utilizam poucos isolados, sendo em sua maioria estudos que

abordam isolados de *Enterobacteriaceae* que esporadicamente analisaram algum isolado de *E. aerogenes* (Machado *et al.*, 2007; Diene *et al.*, 2013). No presente estudo, foram detectados os Inc A/C e L/M em todos os isolados de *E. aerogenes* portadores do gene *bla_{KPC-2}*. Quanto a presença do Inc L/M, Adamczuk *et al.* (2015) na, Polônia, analisaram isolados de *Enterobacteriaceae*, sendo encontrado apenas em 4 isolados de *E. cloacae*.

Com relação as variantes do Inc A/C, foi relatado na literatura que o gene *repA* da maioria dos plasmídeos A/C diferem da sequência *repA* da variante A/C₁, partilhando apenas 93,2% de similaridade, sendo a variante A/C₂ mais encontrada em todo o mundo (Carattoli *et al.*, 2009). No presente estudo, foi observada a presença da variante A/C₂ nos isolados de *E. aerogenes*. Hancock *et al.* (2016), analisaram a sequência do Inc A/C e observaram a presença de genes adicionais, como os genes de proteínas hipotéticas e os demais genes: *parA*, *parB*, *xerD*, *kfrA*, *traH* e *acr2*. Dados estes que diferem em parte dos dados do presente estudo, pois o contig correspondente ao Inc A/C apresentou adicionalmente outros genes. Por exemplo, o gene de replicação *repA*, correspondente a sequência de tipagem do Inc A/C, acompanhado dos genes *traG*, *traH*, *traF*, responsáveis pela capacidade de transferência conjugativa do plasmídeo e diversas proteínas hipotéticas, em ambos os isolados do estudo.

Com relação ao Inc L/M, Adamczuk *et al.* (2015), observaram que esse grupo Inc possui regiões altamente conservadas, partilhando cerca de 20 genes. Esses genes foram classificados funcionalmente como genes de proteinase envolvidas na replicação plasmídica (*repA*, *repC*), manutenção estável de plasmídeos (*resD*, *parA*), conjugação (*trbA*, *trbB*, *trbC*, *nika*, *mobA*, *traH*, *traI*, *traJ*, *traN*, *traO*, *traQ*, *traU*, *traW* e *traY*), e resistência UV (*mucA*). Dados estes que corroboram ao presente estudo, sendo encontrados também nos 2 isolados de *E. aerogenes* do estudo.

A análise comparativa realizada entre os dois isolados, mostrou alta similaridade plasmidial tanto em relação a um contexto geral quanto às características pontuais do estudo, como genes de β -lactamases. Entretanto, mesmo diante das semelhanças (relação clonal pela ERIC-PCR, mesmo hospital de procedência, mesmo setor e mesmo sítio de infecção) não devemos esquecer as particularidades detectadas para cada isolado, especialmente em relação ao quantitativo de genes totais, além dos genes que são exclusivos de cada isolado (Cabral *et al.*, 2016).

Os dados desse estudo evidenciam a capacidade de *E. aerogenes* de acumular determinantes de resistência através de plasmídeos com potencial de realizar a conjugação, devido a presença de genes *tra*. Adicionalmente, a presença de diferentes genes de resistência

inseridos nos plasmídeos Inc A/C₂ e L/M identificados, confirmam a importância de se monitorar a circulação dos plasmídeos Incs em ambiente hospitalar e analisar as sequências gênicas desses plasmídeos. Embora o gene *bla*_{KPC-2} tenha sido codificado dentro do elemento *Tn4401*, foram encontradas várias características estruturais, notadamente a perda de *tnpA* e *ISKpn7*, o que sugere que os transposons *Tn4401* dos 2 isolados de *E. aerogenes* descrito neste trabalho não tem capacidade de transposição. Mas isso não impede que ele seja transferido através da transferência plasmidial. Estes achados enfatizam ainda a continuada recombinação e evolução do elemento *Tn4401* que codifica o gene *bla*_{KPC-2}.

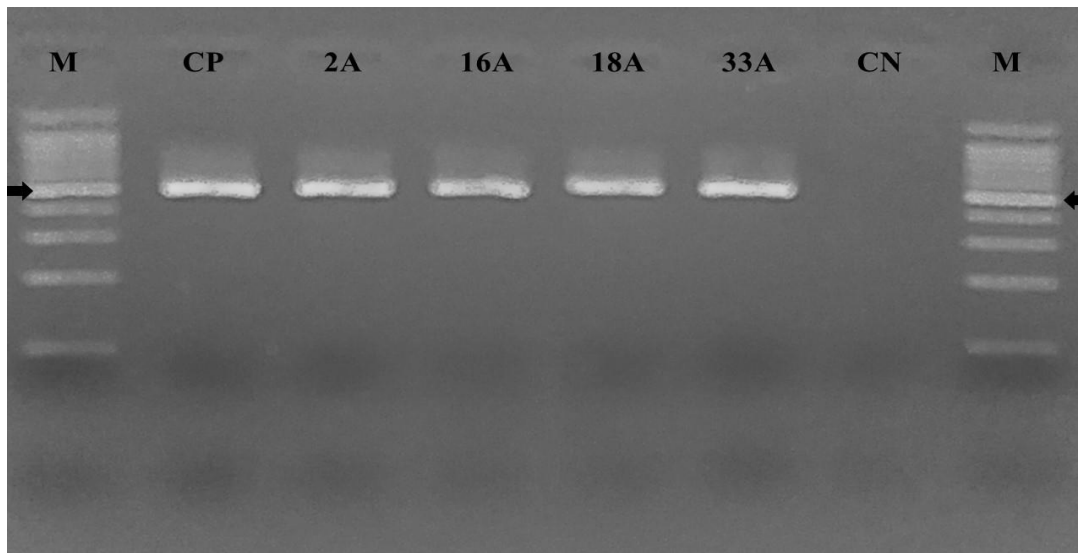
Tabela 1. Caracterização fenotípica de resistência, setor de coleta e fonte de isolamento dos 17 isolados de *E. aerogenes* carreadores do gene *bla*_{KPC} provenientes de um hospital público de Recife-PE, Brasil.

Identificação dos isolados	Setor	Fonte de Isolamento	Perfil de resistência
Ea2A	UCO1	Swab Retal	AMI, AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN, IMI, LEV, MER, PIPT, TOB, SULT
Ea4A	UC	Swab Retal	AMI, AMP, AMPS, CFZ, CFP, CFX, CEFT, CEFU, CIP, IMI, LEV, MER, PIPT, SULT
Ea6A	UTI	Swab Retal	AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN, IMI, LEV, MER, PIPT, TOB, SULT
Ea12A	UTI	Ponta de cateter	AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN, IMI, LEV, MER, PIPT, TOB, SULT
Ea13A	UCO	Swab Retal	AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, IMI, LEV, MER, PIPT, TOB (int), SULT
Ea15A	UTI	Secreção traqueal	AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN, IMI, LEV, MER, PIPT, TOB, SULT
Ea16A	UCO1	Swab Retal	AMI, AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN, IMI, LEV, MER, PIPT, TOB
Ea18A	UTI	Sangue	AMI, AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN, IMI, LEV, MER, PIPT, TOB, SULT
Ea19A	UTI	Secreção Traqueal	AMI (int), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, IMI, LEV, MER, PIPT, TOB (int), SULT
Ea27A	UCO1	Sangue	AMI, AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN, IMI, LEV, MER, PIPT, TOB
Ea28A	UTI	Sangue	AMI (int), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, IMI, LEV, MER, PIPT, TOB (int), SULT

Ea29A	UCO1	Swab retal	AMI, AMP, AMPS, CFZ, CFP, CFX, CEFT, CEFU, CIP, IMI(int), LEV, MER, PIPT, TOB(int), SULT
Ea30A	UTI	Líquido ascético	AMI, AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, IMI, LEV, MER, PIPT, TOB(int), SULT
Ea31A	UC	Swab retal	AMI (int), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN, IMI, LEV, MER, PIPT, TOB
Ea32A	UCO1	Sangue	AMI(int), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, IMI(int), LEV, MER, PIPT, SULT
Ea33A	UTI	Sangue	AMI, AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, IMI, LEV, MER, PIPT, TOB(int), SULT
Ea34A	UTI	Sangue	AMI (int), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, LEV, MER, PIPT, TOB(int), SULT

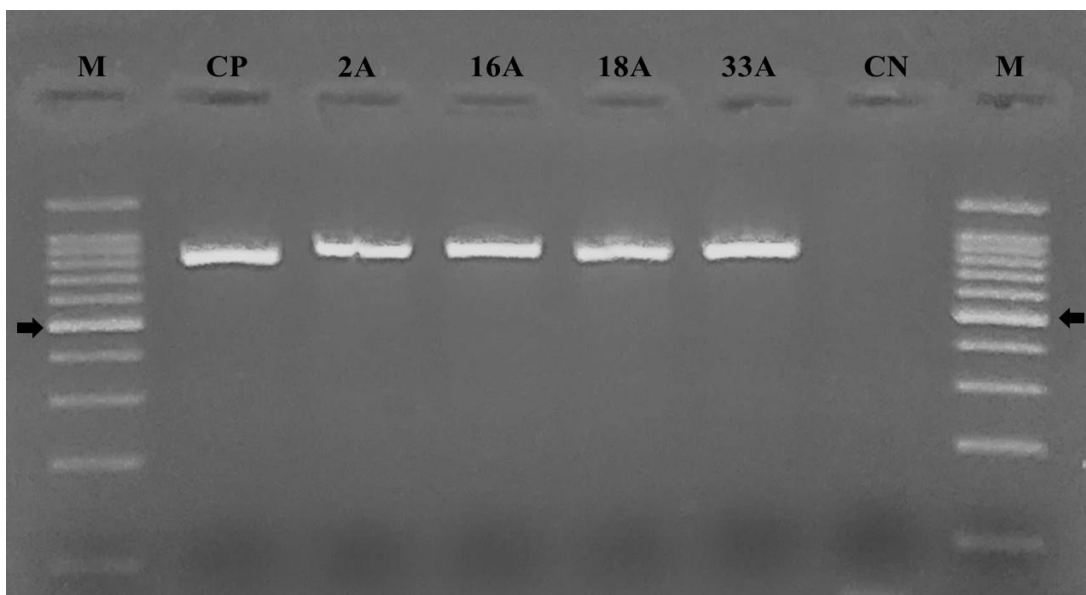
Ea – *Enterococcus aerogenes*; UC – Unidade de cardiologia; UCO – Unidade Coronariana; UCO1 – Unidade coronariana 1; UTI – Unidade de Terapia Intensiva; Sens. – sensível; Int – intermediário; AMI – Amicacina; AMC – Amoxicilina clavulanato; AMP – Ampicilina; CFZ - Cefazolina; CFP – Cefepime; CFT - Cefotaxima; CFX - Cefoxitina; CEFT - Ceftriaxona; CIP – Ciprofloxacina; ERT – Ertapenem; GEN – Gentamicina; IMI - Imipenem; LEV – Levofloxacina; MER – Meropenem; PIPT – Piperacilina-taobactam; TIG – Tigeciclina; TOB – Tobramicina; SULT – Sulfametoxazol-trimetoprim

Figura 1. Eletroforese em gel de agarose à 2% do produto da PCR para o Inc A/C (465pb) em isolados de *E. aerogenes*.



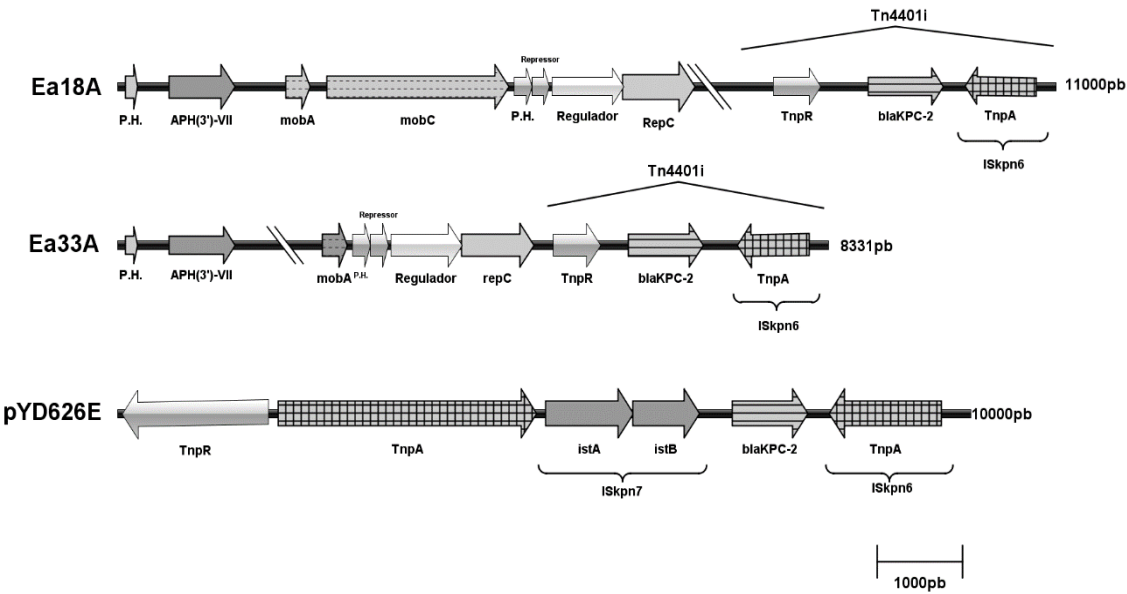
Linhas: 1 e 8, marcadores de peso molecular de 100pb; Linha 2, Controle positivo - CP; Linhas 3, 4, 5 e 6: isolados representativos de *E. aerogenes*; Linha 7; Controle negativo – CN; Setas -indicam fragmento de 500pb no marcador de peso molecular.

Figura 2. Eletroforese em gel de agarose à 2% do produto da PCR para o Inc L/M (785pb) em isolados de *E. aerogenes*.



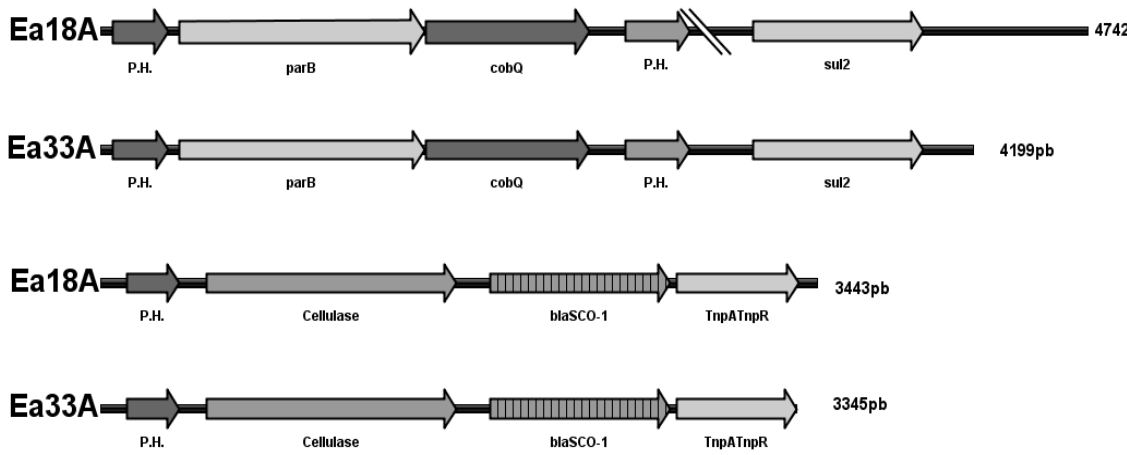
Linhas: 1 e 8, marcador de peso molecular de 100pb; Linha 2, Controle positivo - CP; Linhas 3, 4, 5 e 6: isolados representativos de *E. aerogenes*; Linha 7; Controle negativo – CN; Setas - indicam fragmento de 500pb no marcador de peso molecular.

Figura 3. Comparação do locus dos genes *bla_{KPC-2}* e *aph* (3')-VII dos isolados de *Enterobacter aerogenes* Ea18A e Ea33A e uma sequência de referência depositada no banco de dados GeneBank (no. acesso KJ933392) P.H.



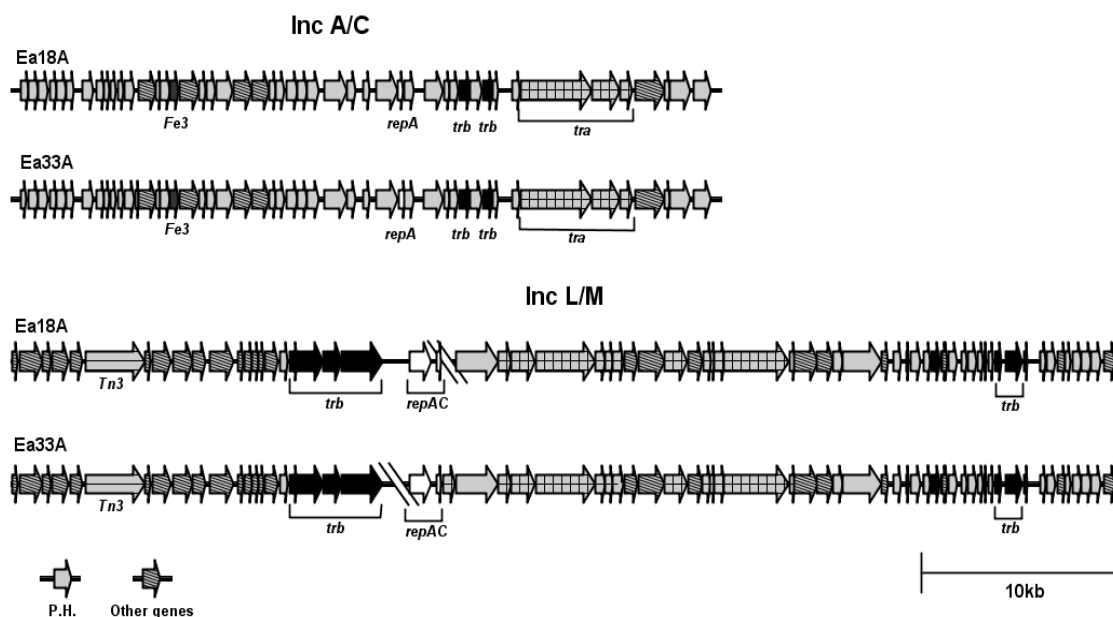
Proteína hipotética.

Figura 4. Ambiente genético dos genes *sul2* e *bla_{SCO-1}* comparação do locus destes genes entre os isolados Ea18A e Ea33A.



P. H. - Proteína hipotética.

Figura 5. Comparação do locus do Inc A/C e L/M entre os isolados Ea18A e Ea33A de *E aerogenes*.



Referências

- ADAMCZUK, M. et al. Diversity and Global Distribution of IncL/M Plasmids Enabling Horizontal Dissemination of β -Lactam Resistance Genes among the *Enterobacteriaceae*. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.
- ADLER, A. et al. Dissemination of the *bla*_{KPC} gene by clonal spread and horizontal gene transfer: comparative study of incidence and molecular mechanisms. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, p. 1–4, 2016.
- AGEEVETS, V. et al. Genetic environment of the *bla*_{KPC-2} gene in *Klebsiella pneumoniae* isolate which may have been imported to Russia from Southeast Asia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, n. December, p. AAC.01856-16, 2016.
- ANDRADE, L. N. et al. Dissemination of *bla*_{KPC-2} by the Spread of *Klebsiella pneumoniae* Clonal Complex 258 Clones (ST258, ST11, ST437) and Plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among *Enterobacteriaceae* Species in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 7, p. 3579–3583, 2011.
- AZIMI, L. et al. Characterization of Carbapenemases in Extensively Drug Resistance *Acinetobacter baumannii* in a Burn Care Center in Iran. **International journal of molecular and cellular medicine**, v. 4, n. 1, p. 46–53, 2015.
- BERGER, S. et al. Characterization of a new *bla*_{OXA-48}-carrying plasmid in *Enterobacteriaceae*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 8, p. 4064–7, 2013.
- BIENDO, M. et al. Successive emergence of extended-spectrum β -lactamase-producing and carbapenemase-producing *Enterobacter aerogenes* isolates in a university hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 1037–1044, 2008.

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114–2120, 2014.

BOSI, C. et al. Most *Enterobacter aerogenes* strains in France belong to a prevalent clone. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 7, p. 2165–2169, 1999.

BRYANT, K. A. et al. KPC-4 Is Encoded within a Truncated *Tn4401* in an IncL/M Plasmid, pNE1280, Isolated from *Enterobacter cloacae* and *Serratia marcescens*. v. 57, n. 1, p. 37–41, 2013.

CABRAL, A. B. et al. KPC-2 in *Proteus mirabilis* in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 1, p. 94–95, 2015.

CABRAL, A. B. **Caracterização genética de isolados clínicos de *Enterobacter aerogenes* e *Enterobacter cloacae* : determinantes de resistência e virulência** Caracterização genética de isolados clínicos de *Enterobacter aerogenes* e *Enterobacter cloacae* : determinantes de resi. [s.l.] Universidade Federal de Pernambuco, 2016.

CABRAL, A. B.; LOPES, A. C. DE S. *Klebsiella pneumoniae*: **macanismos de resistência aos B-lactâmicos**. [s.l.: s.n.].

CABRAL, ADRIANE BORGES et al. Clonal spread and accumulation of Beta-lactams resistance determinants in *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae* complex isolates from infection and colonization in patients at a public hospital in Recife, Pernambuco, Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, 28 nov. 2016.

CAMPOS, J. C. et al. Characterization of *Tn3000*, a Transposon Responsible for *bla*_{NDM-1} Dissemination among *Enterobacteriaceae* in Brazil, Nepal, Morocco, and India. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 12, p. 7387–7395, 2015.

CANTÓN, R. et al. Epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacter* isolates in a Spanish hospital during a 12-year period. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 1237–1243, 2002.

CAO, G. et al. Draft genome sequences of eight *Salmonella enterica* serotype newport strains from diverse hosts and locations. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 18, p. 5146, 2012.

CARATTOLI, A. et al. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. **Journal of Microbiological Methods**, v. 63, n. 3, p. 219–228, 2005.

CARATTOLI, A. Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 2227–2238, 2009.

CARRARO, N. et al. Development of pVCR94X from *Vibrio cholerae*, a prototype for studying multidrug resistant IncA/C conjugative plasmids. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. FEB, p. 1–13, 2014.

CARVER, T. et al. Artemis and ACT: Viewing, annotating and comparing sequences stored in a relational database. **Bioinformatics**, v. 24, n. 23, p. 2672–2676, 2008.

CASTANHEIRA, M. et al. Molecular Characterization of a β -Lactamase Gene, *bla*_{GIM-1}, Encoding a New Subclass of Metallo- β -Lactamase Molecular Characterization of a β -Lactamase Gene, *bla*_{GIM-1}, encoding a new subclass of Metallo- β -Lactamase. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, n. 12, p. 4654–4661, 2004.

CASTANHEIRA, M. et al. First descriptions of *bla*_{KPC} in *Raoultella* spp. (*R. planticola* and

R. ornithinolytica): Report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 12, p. 4129–4130, 2009.

CASTANHEIRA, M. et al. Evaluation of Clonality and Carbapenem Resistance Mechanisms among *Acinetobacter baumannii* - *Acinetobacter calcoaceticus* Complex and *Enterobacteriaceae* Isolates Collected in European and Mediterranean Countries and Detection of Two Novel β -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 12, p. 7358–7366, 2014.

CHEN, L. et al. Multiplex real-time PCR assay for detection and classification of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase gene (*bla_{KPC}*) variants. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 579–585, 2011.

CHEN, L. et al. Partial excision of *bla_{KPC}* from *Tn4401* in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 3, p. 1635–1638, 2012.

CHEN, L. et al. Complete nucleotide sequences of *bla_{KPC-4}* and *bla_{KPC-5}*-harboring IncN and IncX plasmids from *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in New Jersey. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 269–76, 2013.

COIMBRA, D. G. **Identificação de bactérias patogênicas isolados na Unidade de Emergência do Agreste-AL, através de PCR de amplo espectro e sequenciamento de rRNA 16S**. [s.l.] Universidade Federal de Alagoas, 2011.

COUTURIER, M. et al. Identification and classification of bacterial plasmids. **Microbiological Reviews**, v. 52, n. 3, p. 375–395, 1988.

DA SILVA GRILLO, V. T. R. et al. Incidência bacteriana e perfil de resistência a antimicrobianos em pacientes pediátricos de um hospital público de Rondônia, Brasil. **Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 34, n. 1, p. 117–123, 2013.

DATTA, N.; HUGHES, V. M. Plasmids of the same Inc groups in *Enterobacteria* before and after the medical use of antibiotics. **Nature**, 1983.

DAVIN-REGLI, A.; PAGÈS, J. M. *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; Versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. MAY, p. 1–10, 2015.

DEL CASTILLO, C. S. et al. Comparative sequence analysis of a multidrug-resistant plasmid from *Aeromonas hydrophila*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 120–129, 2013.

DEL FRANCO, M. et al. Molecular epidemiology of carbapenem resistant *Enterobacteriaceae* in Valle d'Aosta region, Italy, shows the emergence of KPC-2 producing *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 101 (ST101 and ST1789). **BMC microbiology**, v. 15, n. 1, p. 260, 2015.

DIAS, D. J. A. Estudo dos Principais Mecanismos de Resistência aos Antibióticos beta-lactâmicos em Bactérias Patogênicas de Gram negativo. **Departamento De Ciências Da Vida**, v. Mestrado, 2009.

DIENE, S. M. et al. 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, n. 2, p. 369–383, 2013.

- DING, B. et al. In vivo acquisition of carbapenemase gene *bla*_{KPC-2} in multiple species of enterobacteriaceae through horizontal transfer of insertion sequence or plasmid. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. OCT, p. 1–8, 2016.
- FERNÁNDEZ-ALARCÓN, C.; SINGER, R. S.; JOHNSON, T. J. Comparative genomics of multidrug resistance-encoding IncA/C plasmids from commensal and pathogenic *Escherichia coli* from multiple animal sources. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, 2011.
- FRANCIA, M. V. et al. A classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 28, n. 1, p. 79–100, 2004.
- GEORGHIOU, P. R. et al. Molecular epidemiology of infections due to *Enterobacter aerogenes*: Identification of hospital outbreak-associated strains by molecular techniques. **Clinical Infectious Diseases**, v. 20, n. 1, p. 84–94, 1995.
- GOUVÊA, A. Controlo da Replicação de Plasmídeos. 2005.
- GRATTARD, F. et al. Characterization of Nosocomial Strains of *Enterobacter aerogenes* by Arbitrarily Primed-PCR Analysis and Ribotyping Published by : Cambridge University Press. v. 16, n. 4, p. 224–230, 1995.
- HAMMOUDI, D. et al. Spread of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* co-expressing OXA-23 and GES-11 carbapenemases in Lebanon. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 36, p. e56–e61, 2015.
- HANCOCK, S. J. et al. Identification of IncA/C Plasmid Replication and Maintenance Genes and Development of a Plasmid Multi-Locus Sequence-Typing Scheme. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, n. November, p. AAC.01740-16, 2016.
- HARMER, C. J.; HALL, R. M. The A to Z of A/C plasmids. **Plasmid**, v. 80, p. 63–82, 2015.
- HIDALGO-GRASS, C. et al. KPC-9, a novel carbapenemase from clinical specimens in Israel. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 11, p. 6057–6059, 2012.
- HUANG, X.; MADAN, A. CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome Research**, v. 9, n. 9, p. 868–877, 1999.
- JACOBY, G. A et al. qnrB , Another Plasmid-Mediated Gene for Quinolone Resistance **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, n. 4, p. 1178–1182, 2006.
- JÁCOME, P. R. L. DE A. et al. First report of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 9, p. 4990, 2012.
- KIM, M. J. et al. Complete DNA sequence and analysis of the transferable multiple-drug resistance plasmids (R plasmids) from *Photobacterium damsela* subsp. piscicida isolates collected in Japan and the United States. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 2, p. 606–611, 2008.
- KTARI, S. et al. Molecular epidemiology and genetic environment of acquired bla ACC-1 in *Salmonella enterica* serotype Livingstone causing a large nosocomial outbreak in Tunisia. **Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)**, v. 15, n. 4, p. 279–86, 2009.
- LAMOUREAUX, T. L. et al. Antibiotic resistance and substrate profiles of the class a carbapenemase KPC-6. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 11, p. 6006–6008, 2012.
- LASCOLS, C. et al. Using nucleic acid microarrays to perform molecular epidemiology and

detect novel β -lactamases: A snapshot of extended-spectrum β -lactamases throughout the world. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 5, p. 1632–1639, 2012.

LI, J. J. et al. Complete sequence of a conjugative IncN plasmid harboring *bla*_{KPC-2}, *bla*_{SHV-12}, and *qnrS1* from an *Escherichia coli* sequence type 648 Strain. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 11, p. 6974–6977, 2014.

LIMA, A. M. DA S. et al. Investigation of class 1 integrons in *Klebsiella pneumoniae* clinical and microbiota isolates belonging to different phylogenetic groups in Recife, State of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 2, p. 165–169, 2014.

LINDSEY, R. L. et al. Microarray-based analysis of incA/C plasmid-associated genes from multidrug-resistant *Salmonella enterica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 19, p. 6991–6999, 2011.

LOPES, A. C. S. et al. *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. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 2, p. 163–167, 2010.

MACHADO, E. et al. High diversity of extended-spectrum β -lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* from Portugal. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, n. 6, p. 1370–1374, 2007.

MARGATE, E. et al. KPC-PRODUCING *Serratia marcescens* IN A HOME-CARE PATIENT FROM RECIFE, BRAZIL. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 57, n. 4, p. 359–360, 2015.

MARTINEZ, T. et al. Genetic environment of the KPC gene in *Acinetobacter baumannii* ST2 clone from Puerto Rico and genomic insights into its drug resistance. **Journal of Medical Microbiology**, v. 65, n. 8, p. 784–792, 2016.

MENDES, R. E. et al. Metallo- β -lactamases. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 2, p. 103–113, 2006.

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

NAAS, T. et al. Genetic Structures at the Origin of Acquisition of the β -Lactamase. v. 52, n. 4, p. 1257–1263, 2008.

NORDMANN, P. et al. Global Spread of Carbapenemase- producing *Enterobacteriaceae*. v. 17, n. 10, p. 1791–1798, 2011.

NORDMANN, P.; CUZON, G.; NAAS, T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 9, n. 4, p. 228–36, abr. 2009.

OZGUMUS, O. B. et al. Horizontal Dissemination of Tem- and Shv-Type Beta-Lactamase Genes- Carrying Resistance Plasmids Amongst Clinical Isolates of. p. 636–643, 2008.

PAPAGIANNITSIS, C. C. et al. Sequence of pR3521, an IncB plasmid from *Escherichia coli* encoding ACC-4, SCO-1, and TEM-1 β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 1, p. 376–381, 2011.

PEREIRA, P. S. et al. Coproduction of NDM-1 and KPC-2 in *Enterobacter hormaechei* from

Brazil. **Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)**, v. 21, n. 2, p. 234–6, 2015.

PINTO, F. D. M. et al. Prevalence of carbapenemases in carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in four tertiary care hospitals in Porto Alegre. **Clin Biomed Res**, v. 34, n. 1, p. 47–52, 2014.

POIREL, L. et al. Identification of the novel narrow-spectrum β -lactamase SCO-1 in *Acinetobacter* spp. from Argentina. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 6, p. 2179–2184, 2007.

POIREL, L. et al. Genetic Features of *bla*_{NDM-1} -Positive *Enterobacteriaceae*. **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**, v. 55, n. 11, p. 5403–5407, 2011.

POLLETT, S. et al. Phenotypic and molecular characteristics of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in a health care system in Los Angeles, California, from 2011 to 2013. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 11, p. 4003–4009, 2014.

PRESTON, K. E. et al. The complete nucleotide sequence of the multi-drug resistance-encoding IncL/M plasmid pACM1. **Plasmid**, v. 76, p. 54–65, 2014.

QUILES, M. G. et al. Unusual association of NDM-1 with KPC-2 and armA among Brazilian *Enterobacteriaceae* isolates. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 2, p. 174–177, 2015.

RIBEIRO, V. B. et al. Molecular characterization of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing isolates in southern Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. PART 11, p. 1721–1727, 2013.

ROBERT, J. et al. Incidence rates of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* clinical isolates in France: A prospective nationwide study in 2011–12. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 10, p. 2706–2712, 2014.

RODRIGUES, C. et al. KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* in Portugal linked to previously circulating non-CG258 lineages and uncommon genetic platforms (Tn4401d-IncFIA and Tn4401d-IncN). **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. JUN, 2016.

RODRÍGUEZ, E.; BAUTISTA, A.; BARRERO, L. First report of a *Salmonella enterica* serovar typhimurium isolate with carbapenemase (KPC-2) in Colombia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 2, p. 1263–1264, 2014.

ROGERS, E. E.; STENGER, D. C. A Conjugative 38 kB Plasmid Is Present in Multiple Subspecies of *Xylella fastidiosa*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, 2012.

SAKABE, D.; DEL FIOL, F. DE S. Profile of infections and antimicrobial treatment among burn-injury patients. **American Journal of Infection Control**, v. 44, n. 8, p. 950–952, 2016.

SCHWARZ, S.; JOHNSON, A. P. Transferable resistance to colistin: A new but old threat. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 8, p. 2066–2070, 2016.

SHEPPARD, A. E. et al. Nested Russian Doll-Like Genetic Mobility Drives Rapid Dissemination of the Carbapenem Resistance Gene *bla*_{KPC}. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 60, n. 6, p. 3767–78, 2016.

TIJET, N. et al. Lateral dissemination and inter-patient transmission of *bla*_{KPC-3}: Role of a conjugative plasmid in spreading carbapenem resistance. **Journal of Antimicrobial**

Chemotherapy, v. 71, n. 2, p. 344–347, 2016.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. [s.l: s.n.].

TUON, F. F. et al. KPC-producing *Enterobacter aerogenes* infection. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 19, n. 3, p. 324–327, 2015.

VANEGAS, J. M. et al. Similar frequencies of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing KPC and VIM carbapenemases in diverse genetic clones at tertiary-care hospitals in Medellin, Colombia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 11, p. 3978–3986, 2014.

VOULGARI, E. et al. First report of an NDM-1 Metallo- β -lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* clinical isolate in Greece. **International Journal of Antimicrobial Agents**, set. 2016.

WAILAN, A. M. et al. Mechanisms involved in acquisition of *bla*_{NDM} genes by IncA/C₂ and IncFII_Y plasmids. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. April, p. AAC.00368-16, 2016.

WANG, D. et al. Phenotypic and enzymatic comparative analysis of the KPC variants, KPC-2 and its recently discovered variant KPC-15. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. 1–8, 2014.

WELCH, T. J. et al. Multiple antimicrobial resistance in plague: An emerging public health risk. **PLoS ONE**, v. 2, n. 3, 2007.

WITCHITS, J. L.; CHABBERTY, Y. A. HIGH LEVEL TRANSFERABLE RESISTANCE TO GENTAMICIN. v. XXIV, n. 2, p. 4–6, 1972.

WU, S. et al. Prevalence and characterization of plasmids carrying sulfonamide resistance genes among *Escherichia coli* from pigs, pig carcasses and human. **Acta veterinaria Scandinavica**, v. 52, p. 47, 2010.

WYRES, K. L.; HOLT, K. E. *Klebsiella pneumoniae* Population Genomics and Antimicrobial-Resistant Clones. **Trends in Microbiology**, v. 24, n. 12, p. 944–956, 2016.

YAO, Y. et al. Complete Nucleotide Sequence of a *Citrobacter freundii* Plasmid Carrying KPC-2 in a Unique Genetic Environment. **Genome announcements**, v. 2, n. 6, p. e01157-14, 2014.

YIGIT, H. et al. Carbapenem-Resistant Strain of. **Society**, v. 47, n. 12, p. 3881–3889, 2003.

ZERBINO, D. R. Using the Velvet de novo assembler for short-read sequencing technologies. **Curr. Protoc. Bioinforma.**, p. 1–13, 2011.

ZERBINO, D. R.; BIRNEY, E. Velvet: Algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. **Genome Research**, v. 18, n. 5, p. 821–829, 2008.

6 CONCLUSÕES

- Todos os isolados de *Enterobacter aerogenes* analisados no presente estudo apresentaram os plasmídeos Incs L/M e A/C₂;
- A detecção de *aph* (3')-Vli em ambos os isolados corrobora a emergência dessa variante no Brasil, sua localização plasmidial e ambiente genético em *E. aerogenes* pode facilitar a manutenção e disseminação desse gene em bactérias gram-negativas, que até o momento haviam poucos relatos na literatura desta variante sendo carregada por *E. aerogenes*;
- A detecção de *sul2* em *E. aerogenes*, reforça uma das variantes mais frequente do gene *sul* no Brasil;
- A detecção do gene *bla*_{SCO-1} em *E. aerogenes*, reforça a preocupante disseminação de genes que conferem resistência a β -lactâmicos em diferentes espécies de bactérias gram-negativas, uma vez que este é o primeiro relato do gene *bla*_{SCO-1} em *E. aerogenes*;
- Embora o gene *bla*_{KPC-2} tenha sido codificado dentro do elemento *Tn4401*, foram encontradas várias características estruturais, notadamente a perda de *tnpA* e *ISKpn7*, o que sugere que o transposon *Tn4401* descrito neste trabalho não tem capacidade de transposição. Portanto, esse trabalho relata uma nova variante do *Tn4401* (a ser denominada *Tn4401i*). Estes achados enfatizam a continuada recombinação e evolução do elemento *Tn4401* que codifica o gene *bla*_{KPC-2};
- Apesar dos dois isolados sequenciados serem decorrentes de septicemia de uma mesma UTI e clonalmente relacionados por ERIC-PCR, foi observado uma pequena diferença no DNA plasmidial entre os dois isolados, reforçando a necessidade de instituir rigorosos métodos de detecção e consequentemente controle da disseminação de isolados multidroga-resistentes em ambiente hospitalar.

REFERÊNCIAS

ADAMCZUK, M. et al. Diversity and Global Distribution of IncL/M Plasmids Enabling Horizontal Dissemination of β -Lactam Resistance Genes among the *Enterobacteriaceae*. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

ADLER, A. et al. Dissemination of the *bla*_{KPC} gene by clonal spread and horizontal gene transfer: comparative study of incidence and molecular mechanisms. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, p. 1–4, 2016.

AGEEVETS, V. et al. Genetic environment of the *bla*_{KPC-2} gene in *Klebsiella pneumoniae* isolate which may have been imported to Russia from Southeast Asia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, n. December, p. AAC.01856-16, 2016.

ANDRADE, L. N. et al. Dissemination of *bla*_{KPC-2} by the Spread of *Klebsiella pneumoniae* Clonal Complex 258 Clones (ST258, ST11, ST437) and Plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among *Enterobacteriaceae* Species in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 7, p. 3579–3583, 2011.

AZIMI, L. et al. Characterization of carbapenemases in extensively drug Resistance *Acinetobacter baumannii* in a Burn Care Center in Iran. **International journal of molecular and cellular medicine**, v. 4, n. 1, p. 46–53, 2015.

BERGER, S. et al. Characterization of a new *bla*_{OXA-48}-carrying plasmid in *Enterobacteriaceae*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 8, p. 4064–7, 2013.

BIENDO, M. et al. Successive emergence of extended-spectrum β -lactamase-producing and carbapenemase-producing *Enterobacter aerogenes* isolates in a university hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 1037–1044, 2008.

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114–2120, 2014.

BOSI, C. et al. Most *Enterobacter aerogenes* strains in France belong to a prevalent clone. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 7, p. 2165–2169, 1999.

BRYANT, K. A. et al. KPC-4 Is Encoded within a Truncated *Tn 4401* in an IncL / M Plasmid , pNE1280 , Isolated from *Enterobacter cloacae* and *Serratia marcescens*. v. 57, n. 1, p. 37–41, 2013.

CABRAL, A. B. et al. KPC-2 in *Proteus mirabilis* in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 1, p. 94–95, 2015.

CABRAL, A. B. **Caracterização genética de isolados clínicos de *Enterobacter aerogenes* e *Enterobacter cloacae* : determinantes de resistência e virulência** Caracterização genética de isolados clínicos de *Enterobacter aerogenes* e *Enterobacter cloacae* : determinantes de resi. [s.l.] Universidade Federal de Pernambuco, 2016.

CABRAL, A. B.; LOPES, A. C. DE S. ***Klebsiella pneumoniae*: mecanismos de resistência aos β -lactâmicos**. [s.l.: s.n.].

CABRAL, ADRIANE BORGES et al. Clonal spread and accumulation of Beta-lactams resistance determinants in *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae* complex isolates from infection and colonization in patients at a public hospital in Recife, Pernambuco, Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, 28 nov. 2016.

CAMPOS, J. C. et al. Characterization of *Tn3000*, a transposon Responsible for blaNDM-1 Dissemination among *Enterobacteriaceae* in Brazil, Nepal, Morocco, and India. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 12, p. 7387–7395, 2015.

CANTÓN, R. et al. Epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacter* isolates in a Spanish hospital during a 12-year period. **Journal of Clinical Microbiology**, v.

40, n. 4, p. 1237–1243, 2002.

CAO, G. et al. Draft genome sequences of eight *Salmonella enterica* serotype newport strains from diverse hosts and locations. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 18, p. 5146, 2012.

CARATTOLI, A. et al. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. **Journal of Microbiological Methods**, v. 63, n. 3, p. 219–228, 2005.

CARATTOLI, A. Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 2227–2238, 2009.

CARRARO, N. et al. Development of pVCR94 from *Vibrio cholerae*, a prototype for studying multidrug resistant IncA/C conjugative plasmids. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. FEB, p. 1–13, 2014.

CARVER, T. et al. Artemis and ACT: Viewing, annotating and comparing sequences stored in a relational database. **Bioinformatics**, v. 24, n. 23, p. 2672–2676, 2008.

CASTANHEIRA, M. et al. Molecular Characterization of a β -Lactamase Gene, *bla*_{GIM-1}, Encoding a New Subclass of Metallo- β -Lactamase Molecular Characterization of a β -Lactamase Gene, *bla*_{GIM-1}, Encoding a New Subclass of Metallo- β -Lactamase. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, n. 12, p. 4654–4661, 2004.

CASTANHEIRA, M. et al. First descriptions of *bla*_{KPC} in *Raoultella* spp. (*R. planticola* and *R. ornithinolytica*): Report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 12, p. 4129–4130, 2009.

CASTANHEIRA, M. et al. Evaluation of Clonality and Carbapenem Resistance Mechanisms among *Acinetobacter baumannii* - *Acinetobacter calcoaceticus* Complex and *Enterobacteriaceae* Isolates Collected in European and Mediterranean Countries and

Detection of Two Novel β -Lactamases ,. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 12, p. 7358–7366, 2014.

CHEN, L. et al. Multiplex real-time PCR assay for detection and classification of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase gene (*bla_{KPC}*) variants. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 579–585, 2011.

CHEN, L. et al. Partial excision of *bla_{KPC}* from *Tn4401* in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 3, p. 1635–1638, 2012.

CHEN, L. et al. Complete nucleotide sequences of *bla_{KPC}*-4- and *bla_{KPC}*-5-harboring IncN and IncX plasmids from *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in New Jersey. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 269–76, 2013.

COIMBRA, D. G. **Identificação de bactérias patogênicas isolados na Unidade de Emergência do Agreste-AL, através de PCR de amplo espectro e sequenciamento de rRNA 16S**. [s.l.] Universidade Federal de Alagoas, 2011.

COUTURIER, M. et al. Identification and classification of bacterial plasmids. **Microbiological Reviews**, v. 52, n. 3, p. 375–395, 1988.

DA SILVA GRILLO, V. T. R. et al. Incidência bacteriana e perfil de resistência a antimicrobianos em pacientes pediátricos de um hospital público de Rondônia, Brasil. **Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 34, n. 1, p. 117–123, 2013.

DATTA, N.; HUGHES, V. M. Plasmids of the same Inc groups in enterobacteria before and after the medical use of antibiotics. **Nature**, 1983.

DAVIN-REGLI, A.; PAGÈS, J. M. Enterobacter aerogenes and *Enterobacter cloacae*; Versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. **Frontiers in Microbiology**, v.

6, n. MAY, p. 1–10, 2015.

DEL CASTILLO, C. S. et al. Comparative sequence analysis of a multidrug-resistant plasmid from *Aeromonas hydrophila*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 120–129, 2013.

DEL FRANCO, M. et al. Molecular epidemiology of carbapenem resistant Enterobacteriaceae in Valle d'Aosta region, Italy, shows the emergence of KPC-2 producing *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 101 (ST101 and ST1789). **BMC microbiology**, v. 15, n. 1, p. 260, 2015.

DIAS, D. J. A. Estudo dos Principais Mecanismos de Resistência aos Antibióticos beta-lactâmicos em Bactérias Patogênicas de Gram negativo. **Departamento De Ciências Da Vida**, v. Mestrado, 2009.

DIENE, S. M. et al. 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, n. 2, p. 369–383, 2013.

DING, B. et al. In vivo acquisition of carbapenemase gene *bla*_{KPC-2} in multiple species of enterobacteriaceae through horizontal transfer of insertion sequence or plasmid. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. OCT, p. 1–8, 2016.

FERNÁNDEZ-ALARCÓN, C.; SINGER, R. S.; JOHNSON, T. J. Comparative genomics of multidrug resistance-encoding incA/C plasmids from commensal and pathogenic escherichia coli from multiple animal sources. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, 2011.

FRANCIA, M. V. et al. A classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 28, n. 1, p. 79–100, 2004.

GEORGHIOU, P. R. et al. Molecular epidemiology of infections due to enterobacter

aerogenes: Identification of hospital outbreak-associated strains by molecular techniques. **Clinical Infectious Diseases**, v. 20, n. 1, p. 84–94, 1995.

GOUVÊA, A. Controlo da Replicação de Plasmídeos. 2005.

GRATTARD, F. et al. Characterization of Nosocomial Strains of *Enterobacter aerogenes* by Arbitrarily Primed-PCR Analysis and Ribotyping Published by : Cambridge University Press. v. 16, n. 4, p. 224–230, 1995.

HAMMOUDI, D. et al. Spread of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* co-expressing OXA-23 and GES-11 carbapenemases in Lebanon. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 36, p. e56–e61, 2015.

HANCOCK, S. J. et al. Identification of IncA/C Plasmid Replication and Maintenance Genes and Development of a Plasmid Multi-Locus Sequence-Typing Scheme. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, n. November, p. AAC.01740-16, 2016.

HARMER, C. J.; HALL, R. M. The A to Z of A/C plasmids. **Plasmid**, v. 80, p. 63–82, 2015.

HIDALGO-GRASS, C. et al. KPC-9, a novel carbapenemase from clinical specimens in Israel. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 11, p. 6057–6059, 2012.

HUANG, X.; MADAN, A. CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome Research**, v. 9, n. 9, p. 868–877, 1999.

JACOBY, G. A et al. qnrB , Another Plasmid-Mediated Gene for Quinolone Resistance These include: qnrB , Another Plasmid-Mediated Gene for Quinolone Resistance. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, n. 4, p. 1178–1182, 2006.

JÁCOME, P. R. L. DE A. et al. First report of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 9, p. 4990, 2012.

KIM, M. J. et al. Complete DNA sequence and analysis of the transferable multiple-drug resistance plasmids (R plasmids) from *Photobacterium damsela* subsp. piscicida isolates collected in Japan and the United States. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 2, p. 606–611, 2008.

KTARI, S. et al. Molecular epidemiology and genetic environment of acquired bla ACC-1 in *Salmonella enterica* serotype Livingstone causing a large nosocomial outbreak in Tunisia. **Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)**, v. 15, n. 4, p. 279–86, 2009.

LAMOUREAUX, T. L. et al. Antibiotic resistance and substrate profiles of the class a carbapenemase KPC-6. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 11, p. 6006–6008, 2012.

LASCOLS, C. et al. Using nucleic acid microarrays to perform molecular epidemiology and detect novel β -lactamases: A snapshot of extended-spectrum β -lactamases throughout the world. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 5, p. 1632–1639, 2012.

LI, J. J. et al. Complete sequence of a conjugative IncN plasmid harboring blaKPC-2, blaSHV-12, and qnrS1 from an escherichia coli sequence type 648 Strain. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 11, p. 6974–6977, 2014.

LIMA, A. M. DA S. et al. Investigation of class 1 integrons in *Klebsiella pneumoniae* clinical and microbiota isolates belonging to different phylogenetic groups in Recife, State of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 2, p. 165–169, 2014.

LINDSEY, R. L. et al. Microarray-based analysis of incA/C plasmid-associated genes from multidrug-resistant *Salmonella enterica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 19, p. 6991–6999, 2011.

LOPES, A. C. S. et al. *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. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 2, p. 163–167, 2010.

MACHADO, E. et al. High diversity of extended-spectrum β -lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* from Portugal. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, n. 6, p. 1370–1374, 2007.

MARGATE, E. et al. KPC-PRODUCING *Serratia marcescens* IN A HOME-CARE PATIENT FROM RECIFE , BRAZIL. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 57, n. 4, p. 359–360, 2015.

MARTINEZ, T. et al. Genetic environment of the KPC gene in *Acinetobacter baumannii* ST2 clone from Puerto Rico and genomic insights into its drug resistance. **Journal of Medical Microbiology**, v. 65, n. 8, p. 784–792, 2016.

MENDES, R. E. et al. Metallo- β -lactamases. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 2, p. 103–113, 2006.

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

NAAS, T. et al. Genetic Structures at the Origin of Acquisition of the β -Lactamase. v. 52, n. 4, p. 1257–1263, 2008.

NORDMANN, P. et al. Global Spread of Carbapenemase- producing *Enterobacteriaceae*. v. 17, n. 10, p. 1791–1798, 2011.

NORDMANN, P.; CUZON, G.; NAAS, T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 9, n. 4, p. 228–36, abr. 2009.

OZGUMUS, O. B. et al. Horizontal Dissemination of Tem- and Shv-Type Beta-Lactamase Genes- Carrying Resistance Plasmids Amongst Clinical Isolates of. p. 636–643, 2008.

PAPAGIANNITSIS, C. C. et al. Sequence of pR3521, an IncB plasmid from *Escherichia coli* encoding ACC-4, SCO-1, and TEM-1 β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 1, p. 376–381, 2011.

PEREIRA, P. S. et al. Coproduction of NDM-1 and KPC-2 in *Enterobacter hormaechei* from Brazil. **Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)**, v. 21, n. 2, p. 234–6, 2015.

PINTO, F. D. M. et al. Prevalence of carbapenemases in carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in four tertiary care hospitals in Porto Alegre. **Clin Biomed Res**, v. 34, n. 1, p. 47–52, 2014.

POIREL, L. et al. Identification of the novel narrow-spectrum β -lactamase SCO-1 in *Acinetobacter spp.* from Argentina. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 6, p. 2179–2184, 2007.

POIREL, L. et al. Genetic Features of *bla*_{NDM-1}-Positive *Enterobacteriaceae*. **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**, v. 55, n. 11, p. 5403–5407, 2011.

POLLETT, S. et al. Phenotypic and molecular characteristics of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in a health care system in Los Angeles, California, from 2011 to 2013. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 11, p. 4003–4009, 2014.

PRESTON, K. E. et al. The complete nucleotide sequence of the multi-drug resistance-encoding IncL/M plasmid pACM1. **Plasmid**, v. 76, p. 54–65, 2014.

QUILES, M. G. et al. Unusual association of NDM-1 with KPC-2 and armA among Brazilian *Enterobacteriaceae* isolates. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48,

n. 2, p. 174–177, 2015.

RIBEIRO, V. B. et al. Molecular characterization of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing isolates in southern Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. PART 11, p. 1721–1727, 2013.

ROBERT, J. et al. Incidence rates of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* clinical isolates in France: A prospective nationwide study in 2011-12. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 10, p. 2706–2712, 2014.

RODRIGUES, C. et al. KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* in Portugal linked to previously circulating non-CG258 lineages and uncommon genetic platforms (Tn4401d-IncFIA and Tn4401d-IncN). **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. JUN, 2016.

RODRÍGUEZ, E.; BAUTISTA, A.; BARRERO, L. First report of a *Salmonella enterica* serovar typhimurium isolate with carbapenemase (KPC-2) in Colombia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 2, p. 1263–1264, 2014.

ROGÉRIO, R.; SOUSA, F. DE; PAULO, S. Universidade de São Paulo Faculdade de Saúde Pública Pesquisa de genes de resistência a quinolonas em bacilos Gram negativos de origem clínica e ambiental Pesquisa de genes de resistência a quinolonas em bacilos Gram negativos de origem clínica e ambiental. 2014.

ROGERS, E. E.; STENGER, D. C. A Conjugative 38 kB Plasmid Is Present in Multiple Subspecies of *Xylella fastidiosa*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, 2012.

SAKABE, D.; DEL FIOL, F. DE S. Profile of infections and antimicrobial treatment among burn-injury patients. **American Journal of Infection Control**, v. 44, n. 8, p. 950–952, 2016.

SCHWARZ, S.; JOHNSON, A. P. Transferable resistance to colistin: A new but old threat. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 8, p. 2066–2070, 2016.

SHEPPARD, A. E. et al. Nested Russian Doll-Like Genetic Mobility Drives Rapid Dissemination of the Carbapenem Resistance Gene blaKPC. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 60, n. 6, p. 3767–78, 2016.

TIJET, N. et al. Lateral dissemination and inter-patient transmission of bla_{KPC-3}: Role of a conjugative plasmid in spreading carbapenem resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 2, p. 344–347, 2016.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. [s.l: s.n.].

TUON, F. F. et al. KPC-producing *Enterobacter aerogenes* infection. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 19, n. 3, p. 324–327, 2015.

VANEGAS, J. M. et al. Similar frequencies of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing KPC and VIM carbapenemases in diverse genetic clones at tertiary-care hospitals in Medellin, Colombia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 11, p. 3978–3986, 2014.

VOULGARI, E. et al. First report of an NDM-1 metallo-β-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* clinical isolate in Greece. **International Journal of Antimicrobial Agents**, set. 2016.

WAILAN, A. M. et al. Mechanisms involved in acquisition of bla_{NDM} genes by IncA/C₂ and IncFII_γ plasmids. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. April, p. AAC.00368-16, 2016.

WANG, D. et al. Phenotypic and enzymatic comparative analysis of the KPC variants, KPC-2 and its recently discovered variant KPC-15. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. 1–8, 2014.

WELCH, T. J. et al. Multiple antimicrobial resistance in plague: An emerging public health

risk. **PLoS ONE**, v. 2, n. 3, 2007.

WU, S. et al. Prevalence and characterization of plasmids carrying sulfonamide resistance genes among *Escherichia coli* from pigs, pig carcasses and human. **Acta veterinaria Scandinavica**, v. 52, p. 47, 2010.

WYRES, K. L.; HOLT, K. E. Klebsiella pneumoniae Population Genomics and Antimicrobial-Resistant Clones. **Trends in Microbiology**, v. 24, n. 12, p. 944–956, 2016.

YAO, Y. et al. Complete Nucleotide Sequence of a Citrobacter freundii Plasmid Carrying KPC-2 in a Unique Genetic Environment. **Genome announcements**, v. 2, n. 6, p. e01157-14, 2014.

YIGIT, H. et al. Carbapenem-Resistant Strain of. **Society**, v. 47, n. 12, p. 3881–3889, 2003.

ZERBINO, D. R. Using the Velvet de novo assembler for short-read sequencing technologies. **Curr. Protoc. Bioinforma.**, p. 1–13, 2011.

ZERBINO, D. R.; BIRNEY, E. Velvet: Algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. **Genome Research**, v. 18, n. 5, p. 821–829, 2008.

APÊNDICE A

Plasmid genetic environment of *bla*_{KPC-2}, *bla*_{SCO-1}, *sul2* and *aph* (3')-VII in multidrug-resistant clinical isolates of *Enterobacter aerogenes*

Elizabeth Maria Bispo Beltrão⁽²⁾

Érica Maria de Oliveira⁽¹⁾

Crhisllane Rafael dos Santos Vasconcelos⁽³⁾

Antônio Mauro Rezende⁽⁴⁾

Ana Catarina de Souza Lopes⁽⁵⁾

Departamento de Medicina Tropical , Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

⁽¹⁾Mestranda do Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical-UFPE

⁽²⁾Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical-UFPE

⁽³⁾Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Genética - UFPE

⁽⁴⁾Professor do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhaes- CPQAM - FIOCRUZ-PE

⁽⁵⁾Professora do Departamento de Medicina Tropical – UFPE

Address to: Dra. Ana Catarina S. Lopes. Depto. Medicina Tropical/UFPE. Av. Prof. Moraes Rego s/n, 50732-970 Recife, PE, Brasil.

Phone: 55 81 2126-8526; Fax: 55 81 2126-8528

e-mail: ana.lopes.ufpe@gmail.com

ABSTRACT

Enterobacter aerogenes is an enterobacteria often reported as multidrug-resistant, mainly due to the plasmidial spread, along with transposons of resistance genes. Therefore, the aim of this study was to characterize plasmid incompatibility groups (Incs) in 17 clinical isolates of *E. aerogenes* and to determine the genetic environment of *bla*_{KPC-2} and other resistance genes in plasmids of two clinical isolates of *E. aerogenes* from patients with septicemia in the ICU of a public hospital in Recife-PE, Brazil. Investigations of Incs A/C, L/M and HI-2 groups were performed by PCR, followed by sequencing of plasmid DNA in two isolates. All 17 isolates were PCR positive for Incs A/C and L/M, while Inc HI-2 was not detected. In the analysis of plasmid sequencing was confirmed of the presence of the *bla*_{KPC-2} gene, *bla*_{SCO-1}, *sul2* and *aph* (3')-Vi genes resistance were also found. The *bla*_{KPC-2} gene was found inserted into the transposon *Tn4401*. However, it should to note different structural characteristics, as the loss of *tnpA* and *ISKpn7*, and the presence of a *tnpR* presented a new version of *Tn4401* (described as *Tn4401i*). These characteristics may to do the transposon *Tn4401* to lose its transposing ability, because the insertion sequences are essential for its mobility. These findings also confirm the continued recombination and evolution of plasmids, and of the *Tn4401* element that containing the *bla*_{KPC-2} gene, and the potential for plasmidial dissemination of different resistance genes of *E. aerogenes* in the hospital.

Keywords: *Enterobacter aerogenes*; Plasmids; Groups of plasmid incompatibility; *bla*_{KPC-2} gene

INTRODUCTION

Healthcare-associated infections (HAIs) are still of great concern to public health surveillance due to the increase in antimicrobial resistance, mainly plasmidial spread of resistance genes. Results are associated with high morbidity and mortality, long-term hospitalization, and antibiotic selective pressure (CANTON et al., 2002; DEL FRANCO et al., 2015).

Among bacterial species associated with HAIs, *Enterobacter aerogenes* is a pathogen common that cause eye infection, bloodstream and urinary tract infection, with high levels of resistance to different classes of drugs, including carbapenems. There is evidence that acquisition of antimicrobial resistance in this specie occurs by the plasmidial spread of resistance genes, such as *bla*_{KPC-2} together with transposons, among gram-negative bacteria. However, there is still no consensus on the plasmidial location of the *bla*_{KPC-2} gene and other resistance genes. In addition, *Tn4401* transposon variants and types of plasmids, known as plasmidial incompatibility groups (Inc), present in this pathogen (MARCHAIM et al., 2008; CHMELNITSKY et al., 2008; CHEN et al., 2013 and CHMELNITSKY et al., 2014, et al., 2016).

Ding et al. (2016), in a study in China, observed the presence of the *bla*_{KPC-2} gene in *K. pneumoniae* and *E. aerogenes* isolates, carried by IncFII plasmid and in non-typing plasmid. In Brazil, Andrade et al. (2014) analyzed the *in vitro* plasmid transfer of IncFIIk between *K. pneumoniae*, *Serratia marcescens* and *Citrobacter freundii*, showing that *bla*_{KPC-2} may be easily disseminated among these enterobacteria. Pereira et al. (2013), in Rio de Janeiro, in a study with *K. pneumoniae* isolates analyzed the presence of the *bla*_{KPC-2} gene carried by IncN. However, there are few studies that analyze the presence and types of plasmids Incs and genetic environment of resistance genes in *E. aerogenes* isolates in Brazil. These studies report the presence of Incs in isolates of the family Enterobacteriaceae, sporadically describing the presence of some isolates of *E. aerogenes* carrying the plasmid.

Therefore, the present work aims to characterize genetically the plasmid Incs groups and to determine the genetic environment of *bla*_{KPC-2} and other resistance genes found in clinical isolates of *Enterobacter aerogenes* from a public hospital in Recife-PE.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial Isolates

In this study, seventeen *Enterobacter aerogenes* isolates (Table 1) were selected for carrying the *bla*_{KPC-2} gene, previously analyzed by ERIC-PCR (CABRAL et al., 2016). These isolates are come from a public hospital in Recife-PE, Brazil, between 2011 and 2012, identified by automated system Bactec 9120/Phoenix-BD, composing the bacterial cultures collection of the Laboratory of Molecular Biology and Bacterial Genetics (Department of Tropical Medicine, CCS, UFPE). They are maintained in frozen stock at 15% glycerol at -20°C, and for analysis were grown in BHI broth (Brain Heart Infusion) or Luria Bertani (LB) for 18 hours at 37°C and plated on nutrient agar.

DNA extraction and PCR for Incs L/M, A/C and HI-2

DNA extraction was realized for boiling technique (LIMA et al., 2014) and DNA was quantified using the Nano Drop equipment.

All *E. aerogenes* isolates were investigated the presence of the L/M, A/C and HI-2 Incs by PCR technique with primers described by Caratolli et al., (2005). These Incs were selected for to be found more frequently in *Enterobacter* spp. Amplification reactions were prepared in a total volume of 25 µl per tube, following: 1 µl of 20 ng/µl genomic DNA, 1.0 U of the Taq DNA polymerase enzyme (Promega), 8 mM dNTP (Promega), 25 mM MgCl₂ and 10 µmol of primers.

In each amplification match was included one negative control without DNA and one positive control. As positive controls were used *E. aerogenes* and *E. cloacae* isolates, identified by Ea5A and Ec2A, respectively (CABRAL, 2016). Inc's amplifications were performed with the initial denaturation cycle at 95°C for 5 minutes, followed by 30 cycles of 1 minute at 95°C, annealing temperature described in table 1, and 1 minute at 72°C, followed by final stretch of 5 minutes at 72°C (CARATTOLI et al., 2005). After PCR, all products were submitted to 1.5% agarose gel electrophoresis (Promega), visualized in UV light transilluminator and photographed in photo documentation system (Vilber Lourmat).

PCR Product Sequencing for Incs A/C, L/M, HI-2, FI-A and FI-B

For confirmation of PCR, products positive of *Incs* genes from two representative isolates were purified by commercial kit and sequenced by deoxyribonucleotide chain termination method (SANGER et al., 1977). Nucleotide sequences were analyzed by BLAST programs (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) and Clustal W of the European Bioinformatics Institute (<http://www.cbi.ac.uk/>). Translation of nucleotides into proteins was performed using the expasy program (<http://web.expasy.org/tools/translate>).

Extraction of plasmid DNA

Extraction of the plasmid DNA was performed with Qiagen Mini Plasmid kit (Qiagen), according to the manufacturer's specifications. For visualization, the plasmid DNA was stained with Blue Green Loading Dye (LGC Biotechnology) and subjected to 0.8% agarose gel electrophoresis in TBE buffer and 70V constant voltage and visualized in UV light transilluminator.

Sequencing of plasmid DNA

Two isolates of *E. aerogenes* (Ea33A and Ea18A) were selected for plasmidial sequencing, obtained from septicemia in patients of the ICU, and considered multidrug-resistant and carriers of the gene *bla_{KPC}*.

Extracted plasmid DNA was quantified in Nano Drop equipment and Qubit fluorimetric platform (ThermoFisher Scientific). Libraries were assembled using the TruSeq DNA PCR Free kit (Illumina) and its quantification was performed by Real Time PCR technique through the Library Quantification - Illumina/Universal (Kapa Biosystems) kit. Sequencing was performed using the MiSeq (Illumina) equipment with MiSeq 500 V Cycle kit V2 (Illumina).

Several free tools were used to analyze the fragments generated. Data were processed using Trimmomatic (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014) and assembled with Velvet tool (ZERBINO; BIRNEY, 2008) through Velvet optimiser (ZERBINO, 2011). Results were assembly with Cap3 (HUANG; MADAN, 1999) and annotation was done through Prokka (Seemann, 2014). Plasmid DNA sequences were analyzed using the Artemis Sanger software (CARVER et al., 2008).

Nucleotide sequence accession number

The nucleotide sequences of the plasmid DNA of the isolates Ea18A and Ea33A were submitted to the GenBank nucleotide sequence database under accession number SAMN0685770 and SAMN06857861, respectively.

RESULTS

Origin of the isolates and determination of the groups of plasmidial incompatibility (groups Inc)

Of the 17 isolates of *E. aerogenes* carriers of the *bla*_{KPC-2} gene analyzed in this study, six isolates were obtained from patients in Coronary Unit (UCO), nine isolates from the Intensive Care Unit (ICU), and 2 isolates from Cardiology (Cardio), all from a public hospital in Recife-PE (Table 1). All 17 isolates were PCR positive for Inc A/C and L/M, amplifying fragments with 465 bp and 785 bp, respectively (Figure 1 and 2). Inc HI-2 was not detected.

General analysis of plasmid sequencing

Analysis of the plasmid sequencing of Ea18A and Ea33A isolates showed, respectively, which the number of readings was 90.280,66 and 103.337,11; number of contigs was 21 and 76; and number of proteins was 335 and 355. Plasmid DNA presented an average amount of 51.9% and 52.3% GC for isolates Ea18A and Ea33A, respectively.

Analysis of the genetic environment of *bla*_{KPC-2}, *bla*_{SCO-1}, *sul2* and *aph* (3') – Vii

After analysis of plasmid sequencing through more accurate annotations using the Resfinder-β-lactamase and GeneBank databases was observed the presence of the *bla*_{KPC-2}, *bla*_{SCO-1}, *sul2* and *aph* (3') -Vi resistance genes in the plasmid DNA of isolates (Ea18a and Ea33A). All these genes were identified with 100% similarity when compared to sequences deposited on GeneBank for the genes *bla*_{KPC-2} (AY034847), *bla*_{SCO-1} (NG_049978.1), *sul2* (GQ421466) and *aph* (3') - Vii (KU922932.1).

The *bla_{KPC-2}* gene sequence presented a size of 882 bp. This gene was observed in similar genetic environments in isolates, inserted between the *ISKpn6* insertion sequence and genes corresponding to an 839 bp *TnpA* transposase and 557 bp *TnpR* resolvase (Figure 3), demonstrating that the *bla_{KPC-2}* gene is evidently inserted on transposon *Tn4401*. However, was observed in both isolates a deletion of *ISKpn7* insertion sequence, such as *istA*, *istB* and the other *TnpA* transposase genes.

Presence of five additional genes found next to the *bla_{KPC-2}* gene, a *repC* protein, a regulator, a F protein repressor, a hypothetical protein and a *mobC* (Figure 3) were observed.

From the analysis of the plasmid sequences, it was observed inserted next that the *bla_{KPC-2}* and *aph* (3') - *VIi* genes in isolates, as can be seen in figure 3. Sequence of this *aph* (3')-*VIi* gene presented a size of 780 bp in the 2 isolates. This gene was observed next to the *repC* gene, followed by a regulator, a repressor, a hypothetical protein, the *mobC* and *mobA* genes (Figure 3).

Regarding *sul2*, the sequence of this gene presented a size of 816 bp in all isolates with observation of similar genetic environments. The *sul2* gene was found inserted next to hypothetical protein, followed by *cobQ*, *parB* and another hypothetical protein (Figure 4).

Other gene sequence found was *bla_{SCO-1}* resistance gene, which present a size of 867 bp. This gene was observed in similar genetic environments in isolates, inserted next to a gene corresponding to enzyme *TnpA* transposase, followed by gene for cellulase and a hypothetical protein (Figure 4).

Analysis of the genetic environment of the Plasmidial Incompatibility Groups (Inc)

In the plasmid sequencing, Inc L/M was found in both Ea18A and Ea33A, confirming the PCR data. The *repA*, *repB* and *repC* genes used for Inc L/M typing were found inserted then *trbN*, *trbA* and *trbC* genes, and transposon *Tn3*, followed by *excA*, *docA*, *traX*, *traW*, *traU*, *traP*, *traO*, *traN* and *traM* (Figure 5).

In relation to the genetic environment of Inc A/C, *Fe3* gene, responsible for the production of siderofor, 34 hypothetical proteins, one nuclease, one reductase, *dsbA*, *sppA*, *stbA* genes, one regulatory protein, one permease gene *traG*, *traH* and *traF*, and *repA* gene (used for Inc A/C typing), for both sequenced isolates Ea18A and Ea33A (Figure 5).

For analysis of Inc A/C variants, a comparison between the *repA* gene, used in typing for the Inc A/C, and sequences of the same gene for Inc A/C₁ (NC_012885.1) and A/C₂

(NC_023908.1). Two isolates from the study showed similarity of 94.2% for the A/C₁ variant, and 98.5% similarity for an A/C₂ sequence, and it was defined as the Inc A/C₂ variant in that study.

DISCUSSION

Antimicrobial resistance genes are easily disseminated among enterobacteria, most of which are inserted into plasmids and / or transposons. However, little is known about the plasmidial location of these genes and what the disseminated plasmids and transposons are. Thus, determining the plasmid location of these genes and analyzing the gene sequences of the plasmids is useful to understand which circulating Inc's in the hospital environment. As well as which antimicrobial resistance genes can be easily disseminated by these Inc's in isolates of *E. aerogenes*, the pathogen that causes IRAS. However, little is known about the disseminated plasmids and the genetic environment of the *bla*_{KPC-2}, *bla*_{SCO-1} *sul2* and *aph* (3')-Vi genes, especially in *E. aerogenes* isolates in Brazil.

The *bla*_{KPC} gene is often found inserted into transposon *Tn4401*, and can be in different plasmids, such as Inc's N, L/M and FI-A in *E. aerogenes* and *K. pneumoniae* isolates (LI et al., 2014; ADAMCZUK et al. (Edwards et al., 1991). The literature describes the presence of 8 different variants of *Tn4401* (NAAS et al., 2008; CHEN et al., 2012), with variants "a" and "b" being the most common. These two last variants present the ISK_{p_n7} and ISK_{p_n6} insertion sequences and the *istA* and *istB* genes, together with the *bla*_{KPC} gene, which make up the transposon *Tn4401* (Anderson et al., 2011; RODRIGUES et al., 2016; TIJET et al. 2016). These data differed in part from the present study, in which the ISK_{p_n7} insert sequence and the *tnpA*, *istA* and *istB* sequences were not present in the sequenced isolates. However, the *bla*_{KPC} gene sequence, the ISK_{p_n6} insertion sequence and a *tnpA* transposase were present. Therefore, a new variant of *Tn4401* is described in the present study. The deletion of these sequences may cause the transposon *Tn4401* to lose its transposability, the insertion sequences being essential for the mobility of *Tn4401* (CHEN et al., 2012; AGEEVETS et al., 2016).

The *sul2* and *aph* (3')-Vli genes were other resistance genes found on the plasmids (Inc's L/M or A/C) of the isolates from the study. The *sul2* gene has already been found in *E. coli*, *E. aerogenes*, *E. cloacae* and *K. pneumoniae* isolates from Inc's A/C, FII, B/O, I1, FI-A, FI-B (WU et al. , 2010), and N (LI et al., 2014). The *aph* (3') - Vli gene has already been

found in the A/C and L/M Incs of isolates such as *K. pneumoniae*, and confer resistance to aminoglycosides, related to the inactivation of amikacin. In the present study, both sequenced isolates showed resistance to amikacin. This is the first report of the plasmidial location and environment of the *aph(3')*-VI gene in *E. aerogenes* in Brazil.

The gene *bla_{SCO-1}* found in the isolates of this study, confers resistance to penicillins and to a lesser extent cephalosporins and carbapenems (POIREL et al., 2007). There are few studies that address the presence of this gene. There are reports of the presence of this gene in *Acinetobacter spp.* (Bertone et al., 2007), and in the absence of a positive correlation with the results of the present study. This is the first report of this gene in *E. aerogenes* isolates.

As for the presence of Incs, according to previous studies, there was a higher frequency of Inc N, A/C and L/M in *Enterobacteriaceae* distributed in several countries (POIREL et al., 2011; ADAMCZUK et al., 2015; WAILAN et al., 2016). In Brazil, Pereira et al. (2013), analyzing isolates of *K. pneumoniae* distributed in different Brazilian states, observed the presence of Inc N in all isolates of the study, including 2 isolates from Recife. In Brazil, the studies that address the presence of Incs in *E. aerogenes* isolates are scarce and use few isolates, being mostly studies that approach *Enterobacteriaceae* isolates that sporadically analyzed some isolates of *E. aerogenes* (Machado et al., 2007 Diene et al., 2013). In the present study, Incs A/C and L/M were detected in all isolates of *E. aerogenes* harboring the *bla_{KPC-2}* gene. Regarding the presence of Inc L/M, Adamczuk et al. (2015) in Poland, analyzed isolates of *Enterobacteriaceae*, being found only in 4 isolates of *E. cloacae*.

Regarding the Inc A/C variants, it has been reported in the literature that the *repA* gene of most A/C plasmids differ from the *repA* sequence of the A/C₁ variant, sharing only 93.2% similarity, the A/C₂ variant Most commonly found worldwide (Carattoli et al., 2009). In the present study, the presence of the A/C₂ variant was observed in *E. aerogenes* isolates. Hancock et al. (2016), analyzed the sequence of Inc A/C and observed the presence of additional genes, such as hypothetical protein genes and the other genes: *parA*, *parB*, *xerD*, *kfrA*, *traH* and *acr2*. These data differ in part from the data of the present study, since the contig corresponding to Inc A/C additionally presented other genes. For example, the *repA* replication gene, corresponding to the Inc A/C typing sequence, accompanied by the *traG*, *traH*, *traF* genes, responsible for the conjugative transfer ability of the plasmid and several hypothetical proteins, in both isolates of the study.

With regard to Inc L/M, Adamczuk et al. (2015), observed that this group Inc has highly conserved regions, sharing about 20 genes. These genes were functionally classified as

proteinase genes involved in plasmid replication (*repA*, *repC*), stable plasmid maintenance (*resD*, *parA*), conjugation (*trbA*, *trbB*, *trbC*, *nika*, *mobA*, *traH*, *traI*, *traN*, *traN*, *traN*, *TraQ*, *traU*, *traW* and *traY*), and UV resistance (*mucA*). These data corroborate the present study, being also found in the two *E. aerogenes* isolates from the study.

The comparative analysis carried out between the two isolates showed high plasmidial similarity both to a general context and to the point-specific characteristics of the study, such as β -lactamases genes. However, despite the similarities (clonal relationship with ERIC-PCR, same hospital of origin, same sector and same site of infection), we should not forget the particularities detected for each isolate, especially in relation to the total number of genes, besides the genes that are unique to each isolate (Cabral et al., 2016).

The data from this study evidences the ability of *E. aerogenes* to accumulate resistance determinants through plasmids with the potential to perform the conjugation, due to the presence of *tra* genes. In addition, the presence of different resistance genes inserted in the identified Inc A/C₂ and L/M plasmids confirms the importance of monitoring the circulation of the Incs plasmids in the hospital environment and analyzing the gene sequences of these plasmids. Although the *bla*_{KPC-2} gene was encoded within the *Tn4401* element, several structural features, notably the loss of *tnpA* and *ISKpn7*, were found, suggesting that the *Tn4401* transposons of the two *E. aerogenes* isolates described in this work have no transposability. But this does not prevent it from being transferred through the plasmid transfer. These findings further emphasize the continued recombination and evolution of the *Tn4401* element encoding the *bla*_{KPC-2} gene.

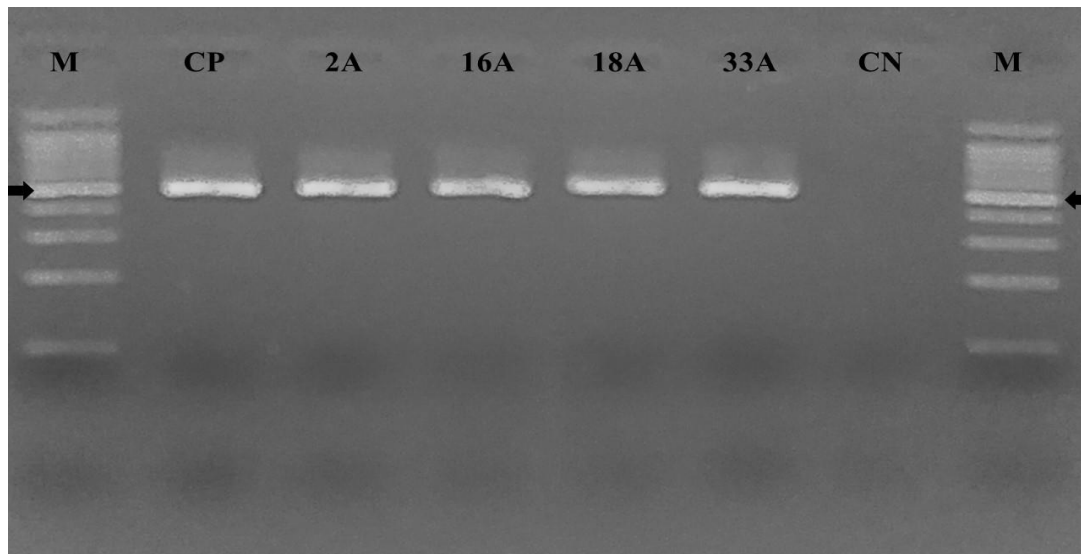
Table 1. Phenotypic characterization of resistance, collection sector and isolation source of the 17 *E. aerogenes* isolates from the *bla*_{KPC} gene from a public hospital in Recife, Brazil.

Identificação dos isolados	Setor	Fonte de Isolamento	Perfil de resistência
Ea2A	UCO1	Swab Retal	AMI, AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN, IMI, LEV, MER, PIPT, TOB, SULT
Ea4A	UC	Swab Retal	AMI, AMP, AMPS, CFZ, CFP, CFX, CEFT, CEFU, CIP, IMI, LEV, MER, PIPT, SULT
Ea6A	UTI	Swab Retal	AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN, IMI, LEV, MER, PIPT, TOB, SULT
Ea12A	UTI	Ponta de cateter	AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN, IMI, LEV, MER, PIPT, TOB, SULT
Ea13A	UCO	Swab Retal	AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP,

			ERT, IMI, LEV, MER, PIPT, TOB (int), SULT
Ea15A	UTI	Secreção traqueal	AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN, IMI, LEV, MER, PIPT, TOB, SULT
Ea16A	UCO1	Swab Retal	AMI, AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN, IMI, LEV, MER, PIPT, TOB
Ea18A	UTI	Sangue	AMI, AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN, IMI, LEV, MER, PIPT, TOB, SULT
Ea19A	UTI	Secreção Traqueal	AMI (int), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, IMI, LEV, MER, PIPT, TOB (int), SULT
Ea27A	UCO1	Sangue	AMI, AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN, IMI, LEV, MER, PIPT, TOB
Ea28A	UTI	Sangue	AMI (int), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, IMI, LEV, MER, PIPT, TOB (int), SULT
Ea29A	UCO1	Swab retal	AMI, AMP, AMPS, CFZ, CFP, CFX, CEFT, CEFU, CIP, IMI(int), LEV, MER, PIPT, TOB(int), SULT
Ea30A	UTI	Líquido ascético	AMI, AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, IMI, LEV, MER, PIPT, TOB (int), SULT
Ea31A	UC	Swab retal	AMI (int), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, GEN, IMI, LEV, MER, PIPT, TOB
Ea32A	UCO1	Sangue	AMI(int), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, IMI(int), LEV, MER, PIPT, SULT
Ea33A	UTI	Sangue	AMI, AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, IMI, LEV, MER, PIPT, TOB(int), SULT
Ea34A	UTI	Sangue	AMI (int), AMC, AMP, CFZ, CFP, CFT, CFX, CEFT, CIP, ERT, LEV, MER, PIPT, TOB(int), SULT

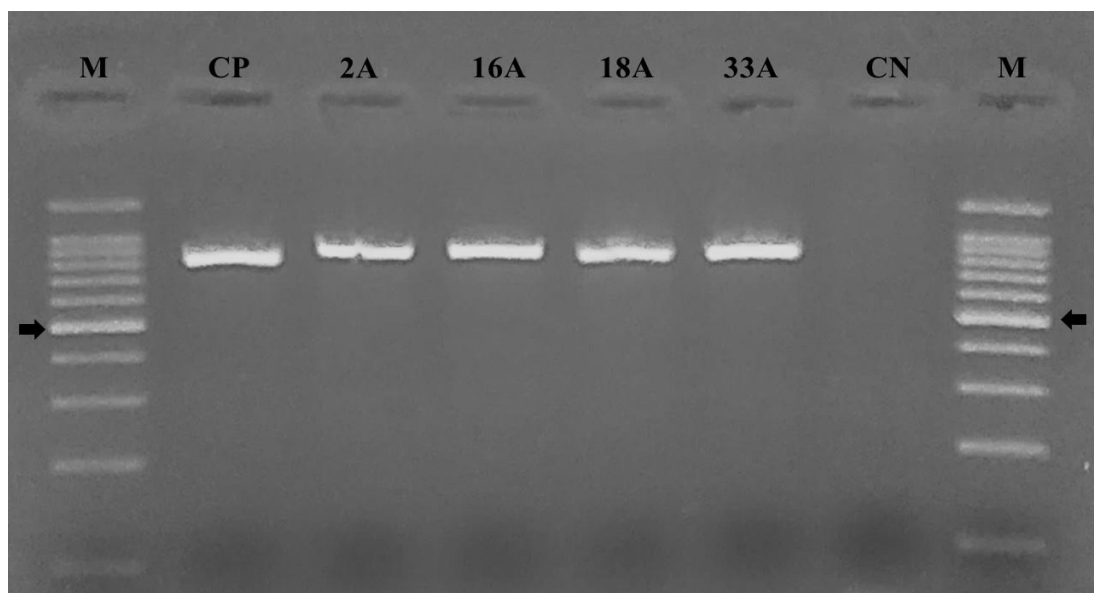
Ea – *Enterococcus aerogenes*; UC – Unidade de cardiologia; UCO – Unidade Coronariana; UCO1 – Unidade coronariana 1; UTI – Unidade de Terapia Intensiva; Sens. – sensível; Int – intermediário; AMI – Amicacina; AMC – Amoxicilina clavulanato; AMP – Ampicilina; CFZ - Cefazolina; CFP – Cefepime; CFT - Cefotaxima; CFX - Cefoxitina; CEFT - Ceftriaxona; CIP – Ciprofloxacina; ERT – Ertapenem; GEN – Gentamicina; IMI - Imipenem; LEV – Levofloxacina; MER – Meropenem; PIPT – Piperacilina-taobactam; TIG – Tigeciclina; TOB – Tobramicina; SULT – Sulfametoxazol-trimetoprim

Figure 1 Electrophoresis agarose gel of the PCR product for Inc A/C (465pb) in *E. aerogenes* isolates.



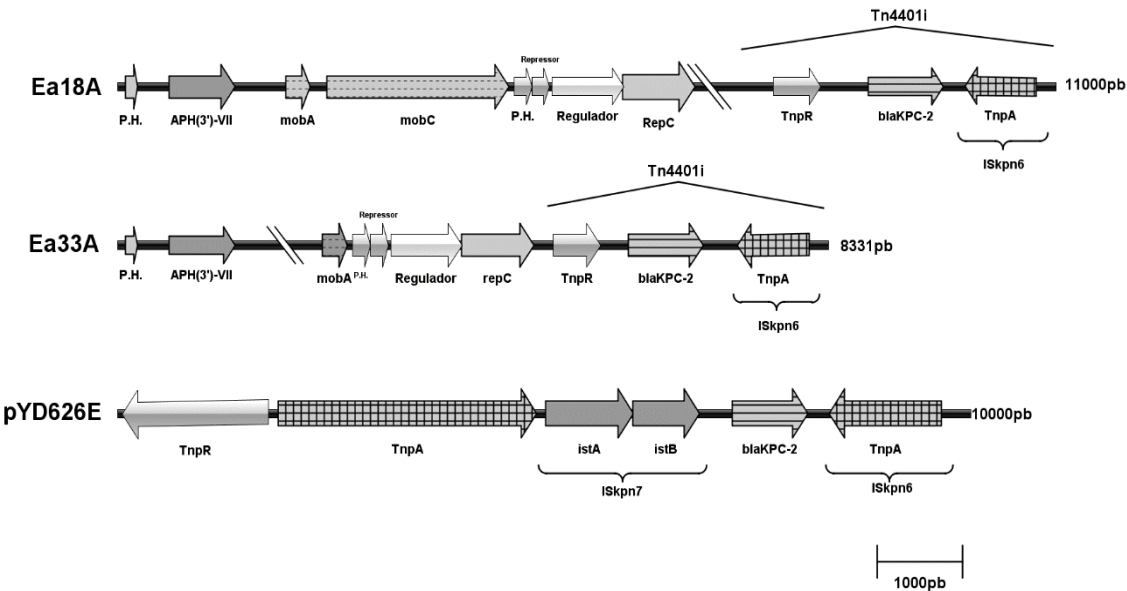
Lines: 1 and 8, molecular weight markers of 100bp; Line 2, Positive control - CP; Lines 3, 4, 5 and 6: representative isolates of *E. aerogenes*; Line 7; Negative control - CN; Arrows - indicate a 500bp fragment in the molecular weight marker.

Figure 2. Electrophoresis agarose gel of the PCR product for Inc L/M (785pb) in *E. aerogenes* isolates.



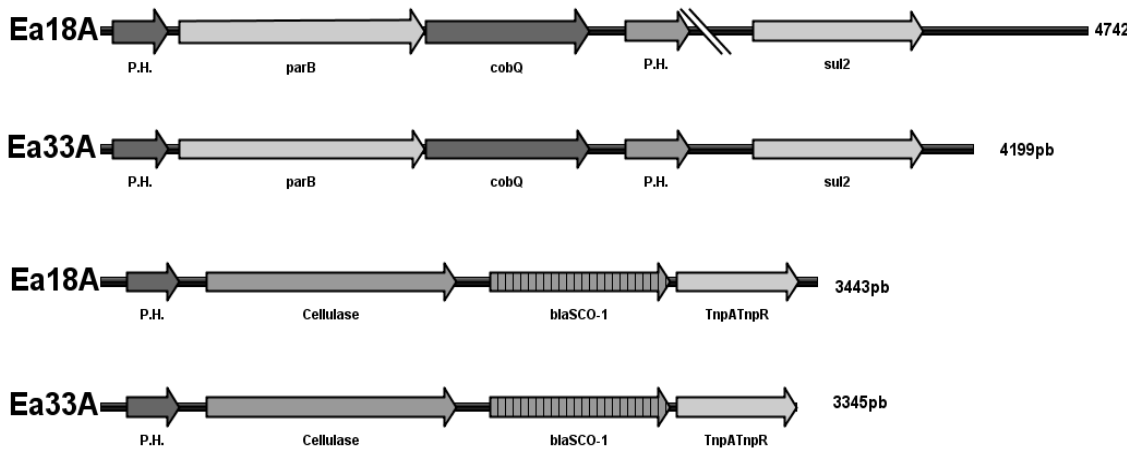
Lines: 1 and 8, 100bp molecular weight marker; Line 2, Positive control - CP; Lines 3, 4, 5 and 6: representative isolates of *E. aerogenes*; Line 7; Negative control - CN; Arrows - indicate a 500bp fragment in the molecular weight marker.

Figure 3. Comparison of the locus of the *bla*_{KPC-2} and *aph* (3')- VII genes of the *Enterobacter aerogenes* Ea18A and Ea33A isolates and a reference sequence deposited in the GeneBank database (accession no. KJ933392)



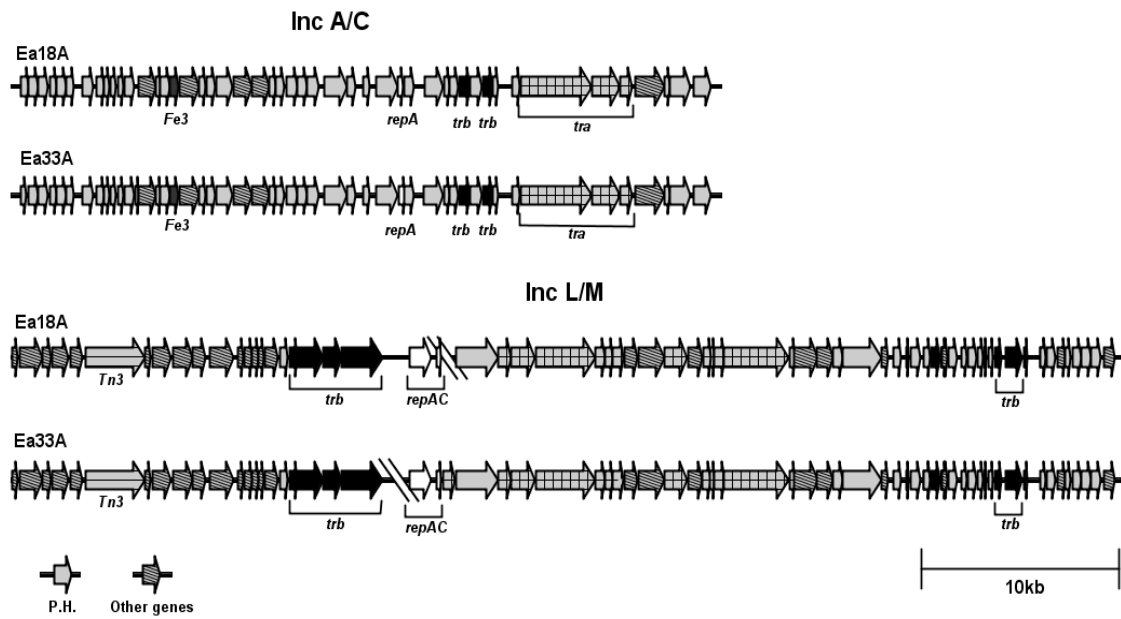
Hypothetical protein.

Figure 4. Genetic environment of the genes *sul2* and *bla*_{SCO-1} comparison of the locus of these genes between the isolates Ea18A and Ea33A.



P. H. - Hypothetical protein.

Figure 5. Comparison of the A/C and L/M Inc locus between the isolates Ea18A and Ea33A of *E aerogenes*.



REFERENCES

- ADAMCZUK, M. et al. Diversity and Global Distribution of IncL/M Plasmids Enabling Horizontal Dissemination of β -Lactam Resistance Genes among the *Enterobacteriaceae*. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.
- ADLER, A. et al. Dissemination of the *bla*_{KPC} gene by clonal spread and horizontal gene transfer: comparative study of incidence and molecular mechanisms. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, p. 1–4, 2016.
- AGEEVETS, V. et al. Genetic environment of the *bla*_{KPC-2} gene in *Klebsiella pneumoniae* isolate which may have been imported to Russia from Southeast Asia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, n. December, p. AAC.01856-16, 2016.
- ANDRADE, L. N. et al. Dissemination of *bla*_{KPC-2} by the Spread of *Klebsiella pneumoniae* Clonal Complex 258 Clones (ST258, ST11, ST437) and Plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among *Enterobacteriaceae* Species in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 7, p. 3579–3583, 2011.
- AZIMI, L. et al. Characterization of Carbapenemases in Extensively Drug Resistance *Acinetobacter baumannii* in a Burn Care Center in Iran. **International journal of molecular and cellular medicine**, v. 4, n. 1, p. 46–53, 2015.
- BERGER, S. et al. Characterization of a new *bla*_{OXA-48}-carrying plasmid in *Enterobacteriaceae*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 8, p. 4064–7, 2013.
- BIENDO, M. et al. Successive emergence of extended-spectrum β -lactamase-producing and carbapenemase-producing *Enterobacter aerogenes* isolates in a university hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 1037–1044, 2008.
- BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114–2120, 2014.
- BOSI, C. et al. Most *Enterobacter aerogenes* strains in France belong to a prevalent clone. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 7, p. 2165–2169, 1999.
- BRYANT, K. A. et al. KPC-4 Is Encoded within a Truncated Tn 4401 in an IncL / M Plasmid , pNE1280 , Isolated from *Enterobacter cloacae* and *Serratia marcescens*. v. 57, n. 1, p. 37–41, 2013.
- CABRAL, A. B. et al. KPC-2 in *Proteus mirabilis* in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 1, p. 94–95, 2015.
- CABRAL, A. B.; LOPES, A. C. DE S. *Klebsiella pneumoniae*: mecanismos de resistência aos B-lactâmicos. [s.l: s.n.].
- CABRAL, ADRIANE BORGES et al. Clonal spread and accumulation of Beta-lactams resistance determinants in *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae* complex isolates from infection and colonization in patients at a public hospital in Recife, Pernambuco, Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, 28 nov. 2016.
- CAMPOS, J. C. et al. Characterization of *Tn3000*, a transposon Responsible for *bla*_{NDM-1} Dissemination among *Enterobacteriaceae* in Brazil, Nepal, Morocco, and India. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 12, p. 7387–7395, 2015.

CANTÓN, R. et al. Epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacter* isolates in a Spanish hospital during a 12-year period. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 1237–1243, 2002.

CAO, G. et al. Draft genome sequences of eight *Salmonella enterica* serotype newport strains from diverse hosts and locations. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 18, p. 5146, 2012.

CARATTOLI, A. et al. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. **Journal of Microbiological Methods**, v. 63, n. 3, p. 219–228, 2005.

CARATTOLI, A. Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 2227–2238, 2009.

CARRARO, N. et al. Development of pVCR94X from *Vibrio cholerae*, a prototype for studying multidrug resistant IncA/C conjugative plasmids. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. FEB, p. 1–13, 2014.

CARVER, T. et al. Artemis and ACT: Viewing, annotating and comparing sequences stored in a relational database. **Bioinformatics**, v. 24, n. 23, p. 2672–2676, 2008.

CASTANHEIRA, M. et al. Molecular Characterization of a β -Lactamase Gene, bla GIM-1, Encoding a New Subclass of Metallo- β -Lactamase Molecular Characterization of a β -Lactamase Gene, bla GIM-1, Encoding a New Subclass of Metallo- β -Lactamase. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, n. 12, p. 4654–4661, 2004.

CASTANHEIRA, M. et al. First descriptions of bla_{KPC} in *Raoultella spp.* (*R. planticola* and *R. ornithinolytica*): Report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 12, p. 4129–4130, 2009.

CASTANHEIRA, M. et al. Evaluation of Clonality and Carbapenem Resistance Mechanisms among *Acinetobacter baumannii* - *Acinetobacter calcoaceticus* Complex and *Enterobacteriaceae* Isolates Collected in European and Mediterranean Countries and Detection of Two Novel β -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 12, p. 7358–7366, 2014.

CHEN, L. et al. Multiplex real-time PCR assay for detection and classification of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase gene (bla_{KPC}) variants. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 2, p. 579–585, 2011.

CHEN, L. et al. Partial excision of bla_{KPC} from Tn4401 in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 3, p. 1635–1638, 2012.

CHEN, L. et al. Complete nucleotide sequences of bla_{KPC-4}- and bla_{KPC-5}-harboring IncN and IncX plasmids from *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in New Jersey. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 269–76, 2013.

COIMBRA, D. G. **Identificação de bactérias patogênicas isolados na Unidade de Emergência do Agreste-AL, através de PCR de amplo espectro e sequenciamento de rRNA 16S.** [s.l.] Universidade Federal de Alagoas, 2011.

COUTURIER, M. et al. Identification and classification of bacterial plasmids. **Microbiological Reviews**, v. 52, n. 3, p. 375–395, 1988.

DA SILVA GRILLO, V. T. R. et al. Incidência bacteriana e perfil de resistência a antimicrobianos em pacientes pediátricos de um hospital público de Rondônia, Brasil.

Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada, v. 34, n. 1, p. 117–123, 2013.

DATTA, N.; HUGHES, V. M. **Plasmids of the same Inc groups in *Enterobacteria* before and after the medical use of antibiotics.** *Nature*, 1983.

DAVIN-REGLI, A.; PAGÈS, J. M. *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; Versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. MAY, p. 1–10, 2015.

DEL CASTILLO, C. S. et al. Comparative sequence analysis of a multidrug-resistant plasmid from *Aeromonas hydrophila*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 120–129, 2013.

DEL FRANCO, M. et al. Molecular epidemiology of carbapenem resistant Enterobacteriaceae in Valle d'Aosta region, Italy, shows the emergence of KPC-2 producing *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 101 (ST101 and ST1789). **BMC microbiology**, v. 15, n. 1, p. 260, 2015.

DIAS, D. J. A. Estudo dos Principais Mecanismos de Resistência aos Antibióticos beta-lactâmicos em Bactérias Patogênicas de Gram negativo. **Departamento De Ciências Da Vida**, v. Mestrado, 2009.

DIENE, S. M. et al. 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, n. 2, p. 369–383, 2013.

DING, B. et al. In vivo acquisition of carbapenemase gene *bla*_{KPC-2} in multiple species of enterobacteriaceae through horizontal transfer of insertion sequence or plasmid. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. OCT, p. 1–8, 2016.

FERNÁNDEZ-ALARCÓN, C.; SINGER, R. S.; JOHNSON, T. J. Comparative genomics of multidrug resistance-encoding incA/C plasmids from commensal and pathogenic escherichia coli from multiple animal sources. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, 2011.

FRANCIA, M. V. et al. A classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 28, n. 1, p. 79–100, 2004.

GEORGHIOU, P. R. et al. Molecular epidemiology of infections due to enterobacter aerogenes: Identification of hospital outbreak-associated strains by molecular techniques. **Clinical Infectious Diseases**, v. 20, n. 1, p. 84–94, 1995.

GOUVÊA, A. Controlo da Replicação de Plasmídeos. 2005.

GRATTARD, F. et al. Characterization of Nosocomial Strains of *Enterobacter aerogenes* by Arbitrarily Primed-PCR Analysis and Ribotyping Published by : Cambridge University Press. v. 16, n. 4, p. 224–230, 1995.

HAMMOUDI, D. et al. Spread of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* co-expressing OXA-23 and GES-11 carbapenemases in Lebanon. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 36, p. e56–e61, 2015.

HANCOCK, S. J. et al. Identification of IncA/C Plasmid Replication and Maintenance Genes and Development of a Plasmid Multi-Locus Sequence-Typing Scheme. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, n. November, p. AAC.01740-16, 2016.

HARMER, C. J.; HALL, R. M. The A to Z of A/C plasmids. **Plasmid**, v. 80, p. 63–82, 2015.

- HIDALGO-GRASS, C. et al. KPC-9, a novel carbapenemase from clinical specimens in Israel. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 11, p. 6057–6059, 2012.
- HUANG, X.; MADAN, A. CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome Research**, v. 9, n. 9, p. 868–877, 1999.
- JACOBY, G. A et al. qnrB , Another Plasmid-Mediated Gene for Quinolone Resistance **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, n. 4, p. 1178–1182, 2006.
- JÁCOME, P. R. L. DE A. et al. First report of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 9, p. 4990, 2012.
- KIM, M. J. et al. Complete DNA sequence and analysis of the transferable multiple-drug resistance plasmids (R plasmids) from *Photobacterium damsela* subsp. piscicida isolates collected in Japan and the United States. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 2, p. 606–611, 2008.
- KTARI, S. et al. Molecular epidemiology and genetic environment of acquired bla ACC-1 in *Salmonella enterica* serotype Livingstone causing a large nosocomial outbreak in Tunisia. **Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)**, v. 15, n. 4, p. 279–86, 2009.
- LAMOUREAUX, T. L. et al. Antibiotic resistance and substrate profiles of the class a carbapenemase KPC-6. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 11, p. 6006–6008, 2012.
- LASCOLS, C. et al. Using nucleic acid microarrays to perform molecular epidemiology and detect novel β -lactamases: A snapshot of extended-spectrum β -lactamases throughout the world. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 5, p. 1632–1639, 2012.
- LI, J. J. et al. Complete sequence of a conjugative IncN plasmid harboring *bla*_{KPC-2}, *bla*_{SHV-12}, and qnrS1 from an *Escherichia coli* sequence type 648 Strain. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 11, p. 6974–6977, 2014.
- LIMA, A. M. DA S. et al. Investigation of class 1 integrons in *Klebsiella pneumoniae* clinical and microbiota isolates belonging to different phylogenetic groups in Recife, State of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 2, p. 165–169, 2014.
- LINDSEY, R. L. et al. Microarray-based analysis of incA/C plasmid-associated genes from multidrug-resistant *Salmonella enterica*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 19, p. 6991–6999, 2011.
- LOPES, A. C. S. et al. *Blactx-M-2* and *blactx-M-28* extended-spectrum β -lactamase genes and class 1 integrons in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 2, p. 163–167, 2010.
- MACHADO, E. et al. High diversity of extended-spectrum β -lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* from Portugal. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, n. 6, p. 1370–1374, 2007.
- MARGATE, E. et al. KPC-PRODUCING *Serratia marcescens* IN A HOME-CARE PATIENT FROM RECIFE , BRAZIL. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 57, n. 4, p. 359–360, 2015.
- MARTINEZ, T. et al. Genetic environment of the KPC gene in *Acinetobacter baumannii* ST2 clone from Puerto Rico and genomic insights into its drug resistance. **Journal of Medical**

Microbiology, v. 65, n. 8, p. 784–792, 2016.

MENDES, R. E. et al. Metallo- β -lactamases. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 2, p. 103–113, 2006.

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

NAAS, T. et al. Genetic Structures at the Origin of Acquisition of the β -Lactamase. v. 52, n. 4, p. 1257–1263, 2008.

NORDMANN, P. et al. Global Spread of Carbapenemase- producing *Enterobacteriaceae*. v. 17, n. 10, p. 1791–1798, 2011.

NORDMANN, P.; CUZON, G.; NAAS, T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 9, n. 4, p. 228–36, abr. 2009.

OZGUMUS, O. B. et al. Horizontal Dissemination of Tem- and Shv-Type Beta-Lactamase Genes- Carrying Resistance Plasmids Amongst Clinical Isolates of. p. 636–643, 2008.

PAPAGIANNITSIS, C. C. et al. Sequence of pR3521, an IncB plasmid from *Escherichia coli* encoding ACC-4, SCO-1, and TEM-1 β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 1, p. 376–381, 2011.

PEREIRA, P. S. et al. Coproduction of NDM-1 and KPC-2 in *Enterobacter hormaechei* from Brazil. **Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)**, v. 21, n. 2, p. 234–6, 2015.

PINTO, F. D. M. et al. Prevalence of carbapenemases in carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in four tertiary care hospitals in Porto Alegre. **Clin Biomed Res**, v. 34, n. 1, p. 47–52, 2014.

POIREL, L. et al. Identification of the novel narrow-spectrum β -lactamase SCO-1 in *Acinetobacter* spp. from Argentina. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 6, p. 2179–2184, 2007.

POIREL, L. et al. Genetic Features of *bla*_{NDM-1}-Positive *Enterobacteriaceae*. **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**, v. 55, n. 11, p. 5403–5407, 2011.

POLLETT, S. et al. Phenotypic and molecular characteristics of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in a health care system in Los Angeles, California, from 2011 to 2013. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 11, p. 4003–4009, 2014.

PRESTON, K. E. et al. The complete nucleotide sequence of the multi-drug resistance-encoding IncL/M plasmid pACM1. **Plasmid**, v. 76, p. 54–65, 2014.

QUILES, M. G. et al. Unusual association of NDM-1 with KPC-2 and *armA* among Brazilian *Enterobacteriaceae* isolates. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 2, p. 174–177, 2015.

RIBEIRO, V. B. et al. Molecular characterization of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing isolates in southern Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. PART 11, p. 1721–1727, 2013.

ROBERT, J. et al. Incidence rates of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* clinical

isolates in France: A prospective nationwide study in 2011-12. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 10, p. 2706–2712, 2014.

RODRIGUES, C. et al. KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* in Portugal linked to previously circulating non-CG258 lineages and uncommon genetic platforms (Tn4401d-IncFIA and Tn4401d-IncN). **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. JUN, 2016.

RODRÍGUEZ, E.; BAUTISTA, A.; BARRERO, L. First report of a *Salmonella enterica* serovar typhimurium isolate with carbapenemase (KPC-2) in Colombia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 2, p. 1263–1264, 2014.

ROGERS, E. E.; STENGER, D. C. A Conjugative 38 kB Plasmid Is Present in Multiple Subspecies of *Xylella fastidiosa*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, 2012.

SAKABE, D.; DEL FIOL, F. DE S. Profile of infections and antimicrobial treatment among burn-injury patients. **American Journal of Infection Control**, v. 44, n. 8, p. 950–952, 2016.

SCHWARZ, S.; JOHNSON, A. P. Transferable resistance to colistin: A new but old threat. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 8, p. 2066–2070, 2016.

SHEPPARD, A. E. et al. Nested Russian Doll-Like Genetic Mobility Drives Rapid Dissemination of the Carbapenem Resistance Gene *bla*_{KPC}. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 60, n. 6, p. 3767–78, 2016.

TIJET, N. et al. Lateral dissemination and inter-patient transmission of *bla*_{KPC-3}: Role of a conjugative plasmid in spreading carbapenem resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 2, p. 344–347, 2016.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. [s.l: s.n.].

TUON, F. F. et al. KPC-producing *Enterobacter aerogenes* infection. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 19, n. 3, p. 324–327, 2015.

VANEGAS, J. M. et al. Similar frequencies of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing KPC and VIM carbapenemases in diverse genetic clones at tertiary-care hospitals in Medellín, Colombia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 11, p. 3978–3986, 2014.

VOULGARI, E. et al. First report of an NDM-1 Metallo-β-lactamase-producing *Acinetobacter baumannii* clinical isolate in Greece. **International Journal of Antimicrobial Agents**, set. 2016.

WAILAN, A. M. et al. Mechanisms involved in acquisition of *bla*_{NDM} genes by IncA/C₂ and IncFII_Y plasmids. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. April, p. AAC.00368-16, 2016.

WANG, D. et al. Phenotypic and enzymatic comparative analysis of the KPC variants, KPC-2 and its recently discovered variant KPC-15. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. 1–8, 2014.

WELCH, T. J. et al. Multiple antimicrobial resistance in plague: An emerging public health risk. **PLoS ONE**, v. 2, n. 3, 2007.

WITCHITS, J. L.; CHABBERTY, Y. A. High Level Transferable Resistance to Gentamicin. v. XXIV, n. 2, p. 4–6, 1972.

WU, S. et al. Prevalence and characterization of plasmids carrying sulfonamide resistance genes among *Escherichia coli* from pigs, pig carcasses and human. **Acta veterinaria Scandinavica**, v. 52, p. 47, 2010.

WYRES, K. L.; HOLT, K. E. *Klebsiella pneumoniae* Population Genomics and Antimicrobial-Resistant Clones. **Trends in Microbiology**, v. 24, n. 12, p. 944–956, 2016.

YAO, Y. et al. Complete Nucleotide Sequence of a *Citrobacter freundii* Plasmid Carrying KPC-2 in a Unique Genetic Environment. **Genome announcements**, v. 2, n. 6, p. e01157-14, 2014.

YIGIT, H. et al. Carbapenem-Resistant Strain of. **Society**, v. 47, n. 12, p. 3881–3889, 2003.

ZERBINO, D. R. Using the Velvet de novo assembler for short-read sequencing technologies. **Curr. Protoc. Bioinforma.**, p. 1–13, 2011.

ZERBINO, D. R.; BIRNEY, E. Velvet: Algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. **Genome Research**, v. 18, n. 5, p. 821–829, 2008.

APÊNDICE B

Condições da PCR para os Incs HI-2, L/M e A/C

Primer For (20pmol) (IDT) – 2,5µL

Primer Rev (20pmol) (IDT) – 2,5µL

dNTP (8mM) (Promega)– 0,7µL

Tampão (5X) - (Promega) 5µL

MgCl₂ (25mM) – (Promega) 1,5µL

Taq DNA polimerase (Promega) (1U) – 0,2µL

Água Mili Q estéril – 11,7µL

Condições de Ciclagem:

1 ciclo de desnaturação de 94°C por 1 min

30 ciclos 

- Desnaturação de 94°C por 1 min
- Anelamento de 62°C por 1 min
- Alongamento de 72°C por 1 min

Conclui com 1 extensão de 1 ciclo de 72°C por 5 min

Eletroforese em gel de agarose a 1%

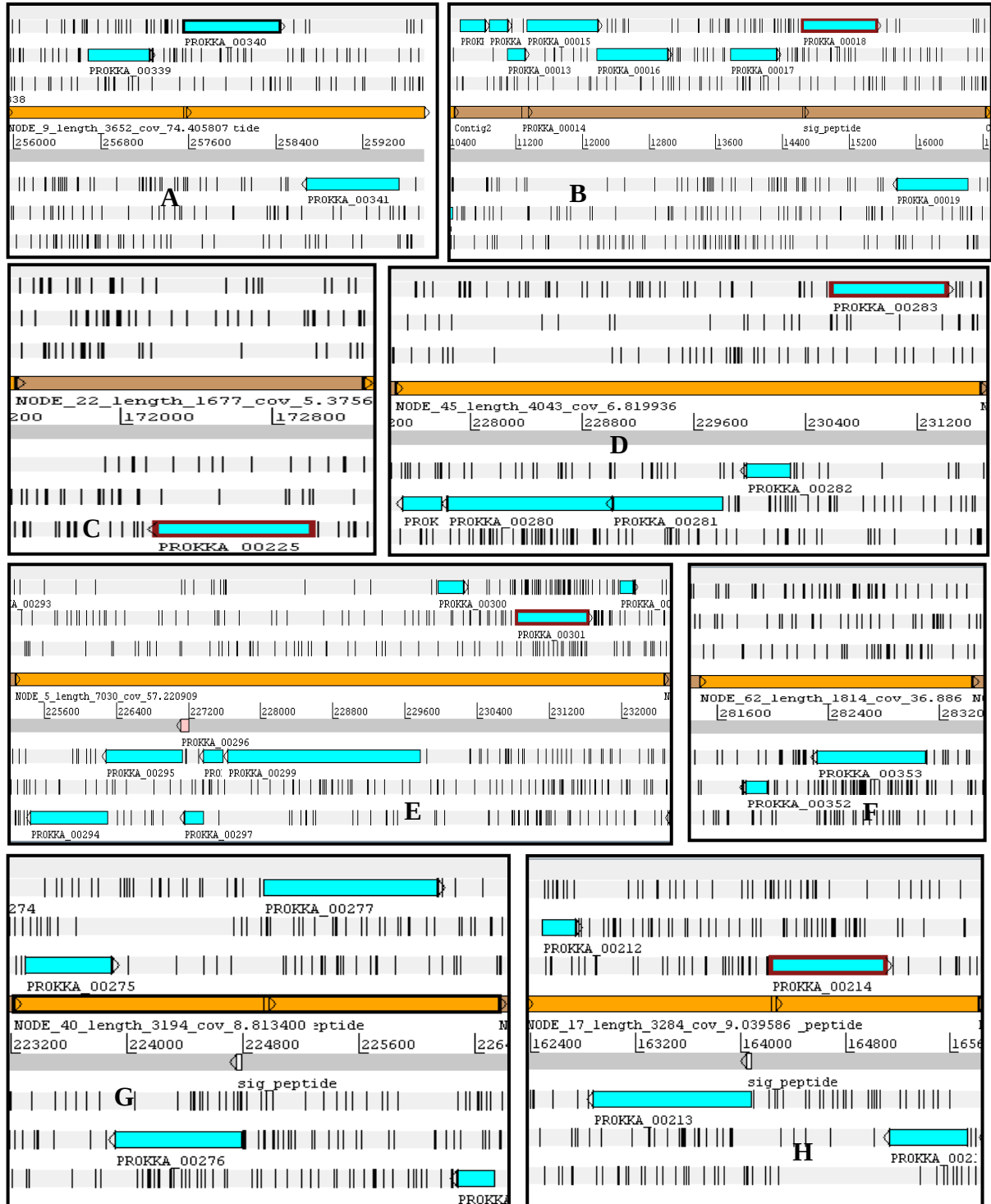
Marcador (**Promega**)

Blue Green Loading Dye (**LGC**)

Agarose (**Promega**)

APÊNDICE C

Visualização pelo programa Artemis, mostrando a localização do gene *bla*_{KPC-2}, *sul2*, *aph* (3') Vli e *bla*_{SCO-1} nos isolados Ea18A e Ea33A.



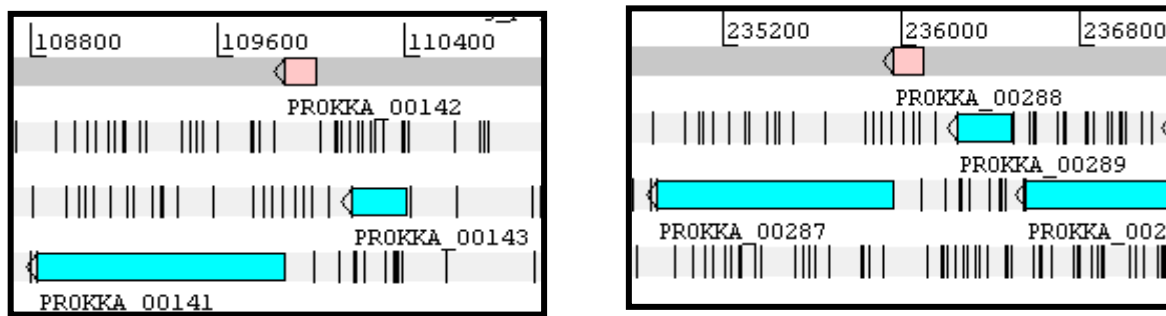
Visualização dos genes: *bla*_{KPC-2} (A) isolado Ea18A inserido no locus PROKKA 00340 do contig NODE_9, (B) isolado Ea33A inserido no locus PROKKA_00018 do contig 2; *sul2* (C) isolado Ea18A inserido no locus PROKKA 00225 do contig NODE_22, (D) isolado Ea33A inserido no locus PROKKA_00283 do contig

NODE_45; *aph* (3') VIa (**E**) isolado Ea18A inserido no locus PROKKA_00301 do contig NODE_5, (**F**) isolado Ea33A inserido no locus PROKKA_00283 do contig NODE_45, *bla*_{SCO-1} (**G**) isolados Ea18A inserido no locus PROKKA_00214 do contig NODE17, (**H**) isolado Ea33A inserido no locus PROKKA_00276 do contig NODE 40.

Fonte: Autor desta monografia

APÊNDICE D

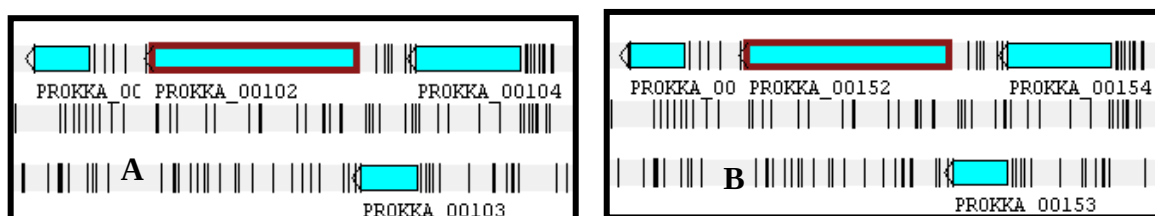
Visualização pelo programa Artemis, mostrando a localização das sequências correspondentes a tipagem do Inc L/M nos isolados Ea18A e Ea33A, respectivamente.



Localização das sequências correspondente a tipagem do Inc L/M_A, os genes *repA*, *miRNA* *repAB* e *repC* nos isolados: (A) Ea18A nos locus PROKKA 00141, 00142 e 00143, inserido no contig; (B) Ea33A nos locus PROKKA 00287, 00288 e 00289.

APÊNDICE E

Visualização pelo programa Artemis, mostrando a localização das sequências correspondentes a tipagem do Inc A/C nos isolados Ea18A e Ea33A, respectivamente.



Localização das sequências correspondente a tipagem do Inc A/C, os genes *repA* nos isolados: (A) Ea18A no locus PROKKA 00102, inserido no contig; (B) Ea33A no locus PROKKA 00152, inserido no contig.

APÊNDICE F

Extração de DNA por Boiling (Fervura)

- Inocular duas colônias de tamanho médio em meio Ágar Luria Bertani (LB) a 37°C por 24 horas;
- Centrifugar 1mL por 5min a 1.500rpm;
- Descartar o sobrenadante;
- Resuspender o pellet em 200µL de H₂O Mili Q estéril;
- Aquecer a 100°C por 10min (Termociclador - Boiling);
- Centrifugar por 5min a 15.000 rpm;
- Retirar 150µL do sobrenadante e transferir para um tubo para microcentrífuga e armazenar a -20°C.

APÊNDICE G

Contigs obtidos no sequenciamento do DNA plasmidial do isolado Ea18A

Contigs	Tamanho
Contig 1	4574pb
Contig 2	43849pb
Contig 3	4315pb
NODE 1	2723pb
NODE 3	9452pb
NODE 5	7189pb
NODE 6	12535pb
NODE 7	5674pb
NODE 8	5262pb
NODE 9	3811pb
NODE 10	36098pb
NODE 11	21606pb
NODE 14	34789pb
NODE 15	1153pb
NODE 16	15976pb
NODE 18	2906pb
NODE 17	3443pb
NODE 22	1836pb
NODE 27	1270pb
NODE 30	1046pb
NODE 33	78359pb
TOTAL	21
	294.233pb

APÊNDICE H

Contigs obtidos no sequenciamento do DNA plasmidial do isolado Ea33A

Contigs	Tamanho
Contig 1	2661pb
Contig 2	6366pb
Contig 3	47377pb
Contig 4	15915pb
Contig 5	19514pb
Contig 6	36114pb
Contig 7	4565pb
Contig 8	9444pb
Contig 9	11613pb
Contig 10	3770pb
Contig 11	835pb
Contig 12	2130pb
Contig 13	1063
NODE 5	36850
NODE 36	724pb
NODE 40	3345pb
NODE 45	4194pb
NODE 49	630pb
NODE 56	467pb
NODE 58	1558pb
NODE 102	31106pb
NODE 103	504pb
NODE 105	498pb
NODE 106	487pb
NODE 109	522pb
NODE 111	3809pb
NODE 112	912pb
NODE 114	574pb

NODE 115	524pb
NODE 118	565pb
NODE 120	558pb
NODE 121	1350pb
NODE 122	531pb
NODE 124	648pb
NODE 128	904pb
NODE 129	559pb
NODE130	731pb
NODE 131	537pb
NODE 132	468pb
NODE 133	520pb
NODE 134	683pb
NODE 137	462pb
NODE 139	638pb
NODE 141	558pb
NODE 144	486pb
NODE 145	872pb
NODE 146	477pb
NODE 148	524pb
NODE 150	515pb
NODE 152	1414pb
NODE 153	770pb
NODE 154	670pb
NODE 155	681pb
NODE 156	465pb
NODE 158	657pb
NODE 159	504pb
NODE 160	489pb
NODE 162	616pb
NODE 163	462pb

NODE 164	641pb
NODE 166	548pb
NODE 168	479pb
NODE 171	508pb
NODE 174	641pb
NODE 182	304pb
TOTAL	76
	259.754pb

APÊNDICE I

Dados gerais do sequenciamento plasmidial, gerados pela ferramenta Rast.

