

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

ÉRICA MARIA DE OLIVEIRA

**INVESTIGAÇÃO DE GENES PARA CARBAPENEMASES, GRUPOS DE
INCOMPATIBILIDADE PLASMIDIAL E RELAÇÃO CLONAL DE ISOLADOS
CLÍNICOS DE *Klebsiella pneumoniae* RESISTENTE AOS CARBAPENÊMICOS
PROVENIENTES DE COLONIZAÇÃO E INFECÇÃO EM UM HOSPITAL DE
RECIFE-PE**

Recife

2019

ÉRICA MARIA DE OLIVEIRA

INVESTIGAÇÃO DE GENES PARA CARBAPENEMASES, GRUPOS DE INCOMPATIBILIDADE PLASMIDIAL E RELAÇÃO CLONAL DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *Klebsiella pneumoniae* RESISTENTE AOS CARBAPENÊMICOS PROVENIENTES DE COLONIZAÇÃO E INFECÇÃO EM UM HOSPITAL DE RECIFE-PE

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

Área de concentração: Medicina Tropical.

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

Recife

2019

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa - CRB4-1010

- O48i Oliveira, Érica Maria de.
Investigação de genes para carbapenemases, grupos de incompatibilidade plasmidial e relação clonal de isolados clínicos de *klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos provenientes de colonização e infecção em um hospital de Recife-PE / Érica Maria de Oliveira. – 2019.
100 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, 2019.
Inclui referências e apêndices.
1. *Klebsiella pneumoniae*. 2. Antibióticos. 3. Plasmídeos. I. Lopes, Ana Catarina de Souza (Orientadora). II. Título.

618.988

CDD (20.ed.)

UFPE (CCS2020-021)

ÉRICA MARIA DE OLIVEIRA

INVESTIGAÇÃO DE GENES PARA CARBAPENEMASES, GRUPOS DE INCOMPATIBILIDADE PLASMIDIAL E RELAÇÃO CLONAL DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *Klebsiella pneumoniae* RESISTENTE AOS CARBAPENÊMICOS PROVENIENTES DE COLONIZAÇÃO E INFECÇÃO EM UM HOSPITAL DE RECIFE-PE.

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

Área de concentração: Medicina Tropical.

Aprovada em: 22/02/2019.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Fábio André Brayner dos Santos (Examinador Interno)
Instituto Aggeu Magalhães (IAM-FIOCRUZ)

Prof^a. Dr^a. Maria Betânia Melo de Oliveira (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof^a. Dr^a. Nilma Cintra Leal (Examinadora Externa)
Instituto Aggeu Magalhães (IAM-FIOCRUZ)

Dedico à minha mãe Maria Jovelina de Oliveira, ao meu pai Ademar Manoel de Oliveira (*in memorian*) e ao meu irmão José Ademar de Oliveira, por todo amor e alicerce.

AGRADECIMENTOS

À Deus que em sua infinita bondade, misericórdia e amor sempre se faz presente em minha vida;

À minha mãe, Maria Jovelina de Oliveira, e meu pai, Ademar Manoel de Oliveira (*in memorian*) por todo amor, educação, cuidado e por me transformar em quem eu sou;

Ao meu irmão, José Ademar de Oliveira, por se alegrar em cada vitória, pelo amor e cuidado;

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Ana Catarina de Souza Lopes, por todo conhecimento a mim transmitido, paciência, compreensão, apoio e dedicação. Agradeço por acolher e acreditar em mim;

Às amigas Alexsandra Maria Lima Scavuzzi, Elizabeth Bispo Beltrão e Elza Ferreira Firmo, pelo compartilhamento de conhecimentos no nosso grupo de pesquisa, por toda a ajuda prestada e pelos momentos de descontração;

As amigas que fazem parte do Departamento de Medicina Tropical, UFPE, Maria das Graças Câmara Antas e Mitaliene de Deus Soares Silva pela disponibilidade e apoio no setor de Microbiologia e pelos momentos de descontração;

Ao professor Valdir Queiroz Balbino e a Heidi Lacerda Alves da Cruz pela presteza no sequenciamento dos amplicons;

A Dra. Josineide Ferreira pela ajuda na obtenção dos isolados analisados do estudo;

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 funcionamento e melhoramento do curso;

Ao programa de Pós-graduação em Medicina Tropical nas pessoas dos professores Ricardo Arraes Ximenes, Daniel Udrisar, Bruno Severo, Vera Silveira, Heloisa Melo, Rosangela Coêlho e Ana Catarina S. Lopes, por suas aulas e ensinamentos;

Ao secretário do programa de Pós-graduação Sr. Valter por toda ajuda prestada ao longo do curso;

Aos amigos da pós-graduação Catarina, Cinthia, Fernanda e Jorge, pelo apoio.

Aos meus amigos de graduação, Isabella Ralph, Rafael Vinícius, Rayssa Pastick e Weverton Alves por todo o companheirismo e cumplicidade durante a graduação e mestrado. Amizade que torço para que permaneça por toda a minha trajetória;

Às minhas amigas de infância Lilia Nunes e Vanessa Almeida, por sempre acreditarem em mim e por ser meu apoio em muitos momentos da minha vida. Amo vocês meninas!

À Comunidade Católica Bento XVI MAANAIM por ser a presença viva de Jesus na minha caminhada cristã e por todos os membros da comunidade que me ajudam a crescer em Cristo.

RESUMO

O uso excessivo de antimicrobianos β -lactâmicos em pacientes hospitalizados favoreceu o surgimento e evolução genética de cepas de *Klebsiella pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos, sendo essa resistência mais relacionada com a produção de enzimas e mediada por plasmídeos conjugativos. Portanto, o objetivo desse estudo foi investigar a ocorrência de genes para carbapenemases, grupos de incompatibilidade plasmidial (Incs) e a relação clonal de isolados clínicos de *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos provenientes de colonização e infecção em pacientes de um hospital público de Recife-PE entre 2017 e 2018, como também analisar o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos desses isolados bacterianos. Foram analisados 27 isolados de *K. pneumoniae* resistentes a um ou mais carbapenêmicos, onde 12 eram provenientes de infecção (sangue e urina), 14 foram isolados provenientes de colonização (swab retal) e uma amostra de dreno cavitário. Os isolados foram submetidos à pesquisa de genes de resistência aos carbapenêmicos (*bla*_{KPC}, *bla*_{GES}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM} e *bla*_{IMP}), pesquisa de grupos de incompatibilidade plasmidial (FIB, Q, A/C, L/M, N, HI2 e HI1B) por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e confirmação através do sequenciamento de amplicons. Foi realizada a ERIC-PCR para avaliar a relação clonal dos isolados. Os antimicrobianos que apresentaram melhor atividade contra os isolados de *K. pneumoniae* foram amicacina e colistina. Os genes *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM} foram detectados, respectivamente, em 24 (88,8%) e 16 (59,2%) dos isolados de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos e 13 (48,1%) foram simultaneamente positivos para esses dois genes, tanto em isolados provenientes de infecção quanto de colonização. Não houve detecção dos genes *bla*_{GES}, *bla*_{VIM} e *bla*_{IMP}. Foram detectados cinco grupos de incompatibilidade plasmidial: IncFIB (92,6%), IncQ (88,8%), IncA/C (14,8%), IncHI1B (11,1%) e IncL/M (7,4%), mostrando a grande variabilidade plasmidial desses isolados. Foram encontrados, entre os isolados de *K. pneumoniae*, doze perfis genéticos distintos, e constatou-se que houve disseminação clonal dos isolados em diferentes setores do hospital de estudo. Podemos concluir que o acúmulo de determinantes de resistência e a variabilidade de Incs plasmidiais detectados nos isolados de *K. pneumoniae* provenientes de colonização e infecção, juntamente com a disseminação clonal, demonstram a capacidade desses isolados de apresentar e disseminar diferentes genes de resistência através de plasmídeos.

Palavras-chave: *Klebsiella pneumoniae*. Antibióticos. Plasmídeos.

ABSTRACT

The use excessive of β -lactam antibiotics in hospitalized patients favored the emergence and genetic evolution of strains of *Klebsiella pneumoniae* resistant to carbapenems, being this resistance more related to the production of enzymes and mediated by conjugative plasmids. Therefore, the objective of this study was to investigate the occurrence of genes for carbapenemases, plasmid incompatibility groups (Incs), and the clonal relationship of clinical isolates of carbapenem-resistant *K. pneumoniae* from colonization and infection in patients from a public hospital in Recife- PE between 2017 and 2018, as well as to analyze the antimicrobial susceptibility profile of these bacterial isolates. Twenty-seven isolates of *K. pneumoniae* resistant to one or more carbapenems were analyzed, 12 of which were from infection (blood and urine), 14 were isolated from colonization (rectal swab) and a cavitory drain sample. The isolates were submitted to the search of carbapenem resistance genes (*bla*_{KPC}, *bla*_{GES}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM} and *bla*_{IMP}), search for plasmid incompatibility groups (FIB, Q, A / C, L / M, N, HI2 and HI1B) by Polymerase Chain Reaction (PCR) and confirmation through amplicon sequencing. ERIC-PCR was performed to evaluate the clonal relationship of the isolates. The antimicrobials that showed the best activity against the isolates of *K. pneumoniae* were amikacin and colistin. The *bla*_{KPC} and *bla*_{NDM} genes were detected in 24 (88.8%) and 16 (59.2%) of the carbapenem resistant isolates of *K. pneumoniae*, respectively, and 13 (48.1%) were simultaneously positive for these two genes , both in infection and colonization isolates. There was no detection of the *bla*_{GES}, *bla*_{VIM} and *bla*_{IMP} genes. Five groups of plasmid incompatibility were detected: IncFIB (92.6%), IncQ (88.8%), IncA / C (14.8%), IncHI1B (11.1%) and IncL /), showing the great plasmidial variability of these isolates. Twelve distinct genetic profiles were found among *K. pneumoniae* isolates and it was found that there was clonal dissemination of the isolates in different sectors of the study hospital. We conclude that the accumulation of resistance determinants and the variability of plasmid Incs detected in *K. pneumoniae* isolates from colonization and infection, together with clonal dissemination, demonstrate the ability of these isolates to present and disseminate different resistance genes through plasmids.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*. Antibiotics. Plasmid.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão de Literatura

Figura 1 –	Isolado de <i>Klebsiella pneumoniae</i> em Ágar MacConkey.....	20
Figura 2 –	Imagem ilustrativa das principais resistências desenvolvidas pelas bactérias aos antimicrobianos.....	21

Artigo

Figura 1 –	Eletroforese em gel de agarose à 1,5% do produto da ERIC-PCR de isolados representativos de <i>K. pneumoniae</i> . Linha 1: marcador de peso molecular de 1Kb (promega), linhas 2-17: isolados de <i>K. pneumoniae</i>	45
Figura 2 –	Dendrograma gerado por ERIC-PCR utilizando o software Darwin 6.0, ilustrando a relação dos perfis dos 27 isolados de <i>K. pneumoniae</i> resistente aos carbapenêmicos provenientes de Recife-PE, Brasil.....	46

LISTA DE TABELAS

Metodologia

Tabela 1 –	Primers utilizados na PCR e sequenciamento do produto de PCR para detecção de genes para carbapenemases.....	36
Tabela 2 –	Primers utilizados na PCR e sequenciamento do produto de PCR para detecção dos Incs plasmidiais e ERIC-PCR nos isolados de <i>K. pneumoniae</i>	38

Artigo

Tabela 1 –	Primers utilizados na PCR e sequenciamento dos amplicons para detecção de genes para carbapenemases, Incs plasmidiais e ERIC-PCR nos isolados de <i>K. pneumoniae</i>	43
Tabela 2 –	Fonte de isolamento primário (colonização ou infecção), concentração inibitória mínima (CIM) para ertapenem, imipenem, meropenem, genes para carbapenemases, Incs plasmidiais, perfil de resistência (P.R) e perfil de ERIC-PCR de isolados de <i>K. pneumoniae</i> provenientes de um hospital de Recife-PE, Brasil.....	51

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

AMC	Amoxicilina/Ácido Clavulânico
AMI	Amicacina
AMO	Amoxicilina
AMP	Ampicilina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APS	Ampicilina/Sulbactam
ATM	Aztreonam
CAZ	Ceftazidima
CDC	Centers for Disease Control
CFL	Cefalotina
CFO	Cefoxitina
CIP	Ciprofloxacina
CLO	Clofanfenicol
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
COM	Cefepime
CTX	Cefotaxima
CCS	Centro de Ciências da Saúde
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
ESBL	Extended-Spectrum β -lactamase
ERIC-PCR	PCR de seqüências consenso intergênicas repetitivas de Enterobactérias
genes <i>bla</i>	Genes de β -lactamases
GEN	Gentamicina
GES	Guiana Extended Spectrum
h	Horas
IMP	Impipenemase
IMP	Imipenem
Inc	Grupo de incompatibilidade plasmidial
Int	Intermediário
IRAS	Infecções relacionadas à Assistência à Saúde

Kb	Quilo-base
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
MBL	Metalo- β -lactamase
MDR	Multidroga resistente
Mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MIC	Concentração Mínima Inibitória
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
M	Molar
MPM	Meropenem
NDM	Nova-Delhi Metalo- β -lactamase
Ng	Nanograma
Pb	Pares de bases
PBP _s	Proteínas de ligação à Penicilina
PBRT	Tipagem de replicon baseada em PCR
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PFGE	Pulsed-Field Gel Electrophoresis
pH	Potencial de Hidrogênio
PIT	Piperacilina/Tazobactam
Rpm	Rotações por minuto
sp.	Espécie
spp.	Espécies
SPM	São Paulo metalo- β -lactamase
ST	Sequence Typing
TBE	Tris-borato, ácido bórico, EDTA
TE	Tampão Tris-EDTA
TET	Tetraciclina
Tn	Transposon
TSU	Trimetoprim/Sulfa
U	Unidade
UTI	Unidades de terapia intensiva

UTI neo	Unidades de terapia intensiva neonatal
UV	Ultravioleta
V	Volts
VIM	Verona integron-encoded metalo- β -lactamase
Zn	Zinco
XDR	Bactéria Extensivamente Resistente
°C	Grau Celsius
μg	Micrograma
μl	Microlitro
μM	Micromolar
μmol	Micromol

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1	Klebsiella spp.....	18
2.2	Antimicrobianos beta-lactâmicos.....	20
2.3	Beta-lactamases.....	22
2.3.1	<i>Serino-carbapenemases: KPC e GES.....</i>	23
2.3.2	<i>Metalo-beta-lactamases: NDM, VIM e IMP.....</i>	26
2.4	Plasmídeos.....	28
2.4.1	<i>Grupo de Incompatibilidade Plasmidial.....</i>	29
2.5	Tipagem molecular de bactérias.....	31
3	OBJETIVOS.....	33
3.1	Geral.....	33
3.2	Específicos.....	33
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
4.1	Isolados bacterianos.....	34
4.2	Susceptibilidade antimicrobiana.....	34
4.3	Extração de DNA total.....	35
4.4	Condições de PCR para os genes <i>bla</i>_{KPC} e <i>bla</i>_{GES}.....	35
4.5	Condições de PCR para os genes <i>bla</i>_{NDM}, <i>bla</i>_{VIM} e <i>bla</i>_{IMP}.....	35
4.6	PCR para detecção dos Grupos de Incompatibilidade Plasmidial.....	36
4.7	Eletroforese em gel de agarose.....	37
4.8	ERIC-PCR.....	37
4.9	Sequenciamento dos amplicons.....	38
5	RESULTADOS.....	39
5.1	Alta variabilidade plasmidial em isolados clínicos de <i>Klebsiella pneumoniae</i> portadores de <i>bla</i>_{kpc} e <i>bla</i>_{ndm} provenientes de infecção e colonização em pacientes de um hospital público do brasil.....	53
6	CONCLUSÕES.....	59
6.1	Divulgação dos dados obtidos.....	60
	REFERÊNCIAS.....	61

APÊNDICE A - HIGH PLASMIDIAL VARIABILITY IN CLINICAL ISOLATES OF <i>Klebsiella pneumoniae</i> HARBORING <i>bla</i>_{KPC-2} AND <i>bla</i>_{NDM-1} FROM INFECTION AND COLONIZATION IN PATIENTS OF A PUBLIC HOSPITAL	IN
BRAZIL.....	76

1 INTRODUÇÃO

Klebsiella pneumoniae se destaca clinicamente por estar envolvida em uma variedade de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAs), causando infecções do trato urinário, respiratório, de feridas, como também septicemia (KUNTAMAN et al., 2018; SANTERRE et al., 2018; HONNEGOWDA et al., 2018). O uso excessivo e indiscriminado de antimicrobianos beta-lactâmicos, culminou no surgimento de cepas resistentes aos carbapenêmicos, sendo essa resistência mais relacionada à produção de beta-lactamases por essas bactérias e que são mediadas principalmente por plasmídeos conjugativos (ROZALES et al., 2014; SCAVUZZI et al., 2017; NODARI et al., 2017).

A resistência aos carbapenêmicos é um problema de saúde pública em todo o mundo, inclusive no Brasil. De acordo com o Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 14, publicado em dezembro de 2016 pela ANVISA, das 22.499 notificações de identificações de microrganismos causadores de infecção primária de corrente sanguínea em UTI adulto, a espécie *K. pneumoniae* foi a mais frequente com 3.805 (16,9%) dos casos (ANVISA, 2016).

A *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), está mais associada a amostras de *K. pneumoniae* e tem sido o principal determinante de resistência aos carbapenêmicos (TAVARES et al., 2015). Estas enzimas tornaram-se endêmicas em todo o mundo, inclusive no Brasil, sendo frequentemente detectada em isolados de *K. pneumoniae* provenientes de hospitais de Recife-PE (CABRAL et al., 2012; MELO et al., 2014; TUON et al., 2015; SCAVUZZI et al., 2017). O gene *bla*_{KPC} está frequentemente localizado no transposon Tn4401 (EILERTSON et al., 2019), que tem sido encontrado em uma variedade de plasmídeos transferíveis (PEREIRA et al., 2013; CERQUEIRA et al., 2017; ANDRADE et al., 2011; DALMOLIN et al., 2018;), o que garante a sua dispersão não só entre as espécies de *Klebsiella*, mas entre outros gêneros de bactérias gram-negativas (BELDER et al., 2018). O gene *bla*_{KPC} também pode se encontrar localizado em elementos não-Tn4401 (NTE_{KPC}) (CHEN et al., 2014). Estudo recente de Cerdeira et al. (2019), detectou o gene *bla*_{KPC} inserido no NTE_{KPC}-IId em plasmídeo IncQ1 no Brasil.

Além da enzima KPC, a resistência aos carbapenêmicos pode ser devido à produção de outras enzimas, como as metalo-beta-lactamases (sendo os tipos IMP, VIM e NDM as mais frequentes), e as serino carbapenemases (incluindo como mais comuns as do tipo KPC e GES) (CABRAL et al., 2017; BARBERINO et al., 2018; PERDERSEN et al., 2018). E apesar de serem detectadas em menor proporção do que KPC, já existem relatos dessas outras

carbapenemases em enterobactérias em vários países (DROPA et al., 2010; FIROOZEH et al., 2016; LOHR et al., 2017).

Entretanto, são necessários estudos que investiguem a ocorrência desses genes para carbapenemases em isolados clínicos de *K. pneumoniae* provenientes de hospitais de Recife-PE, considerando que os carbapenêmicos, como outros beta-lactâmicos, são os principais antimicrobianos para o tratamento de IRAs causadas por essas bactérias.

É importante destacar que um dos principais fatores que favorece a infecção por *K. pneumoniae*, é a colonização intestinal, pois portadores colonizados podem servir como um importante reservatório para a disseminação de bactérias no hospital, e também de mecanismos de resistência, uma vez que podem abrigar genes de resistência e disseminar através de plasmídeos conjugativos, juntamente com transposons (TENOVER, 2006; BORER et al, 2012; ZHAO et al. 2014). Adicionalmente o processo de tipagem é importante epidemiologicamente, principalmente no reconhecimento de surtos de infecções e na detecção da disseminação da resistência bacteriana, portanto, se faz necessário à utilização de técnicas de tipagem molecular para se determinar a relação clonal entre as enterobactérias envolvidas em infecções e colonizando pacientes, como por exemplo, as técnicas de PFGE, MLST e ERIC-PCR, sendo essa última uma das mais utilizadas, pois por ser baseada na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é rápida e de fácil execução.

No Brasil, Andrade et al. (2011), identificaram a propagação de *bla*_{KPC-2} inseridos nos plasmídeos IncFII, IncN e IncL/M de *K. pneumoniae* em hospitais nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul. Adicionalmente, Pereira et al (2013), estudando a epidemiologia de 39 *K. pneumoniae* produtoras de KPC em 12 estados brasileiros, sendo quatro isoladas de Recife-PE, não conseguiram determinar o tipo de Inc responsável pela propagação do KPC em *K. pneumoniae* proveniente de Recife-PE, podendo o número de isolados analisados ser uma limitação do estudo. Conhecendo a variabilidade genética dessa espécie bacteriana (CABRAL et al., 2012; MELO et al., 2014; CABRAL et al., 2015; MARGATE et al., 2015; SCAVUZZI et al., 2016; CABRAL et al., 2017) e devido à importância epidemiológica no rastreamento desses plasmídeos que albergam e disseminam genes de resistência, são necessários estudos que caracterizem os grupos de incompatibilidade plasmidial em um maior número de isolados clínicos provenientes de Recife-PE.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Klebsiella* spp.

O gênero *Klebsiella* foi descrito primeiramente pelo microbiologista alemão Edwin Klebs no final do século XIX (KONEMAN et al., 2008). *Klebsiella* spp. são bacilos gram-negativos pertencentes à família Enterobacteriaceae, podem ser encontrados no solo, na água e em vegetais e são constituintes da microbiota intestinal da maioria dos animais, incluindo o homem (TORTORA et al., 2012). Comumente, colonizam o trato gastrointestinal, respiratório e geniturinário dos seres humanos, sendo também encontradas na superfície mucosa de outros mamíferos (KONEMAN et al., 2008).

Espécies do gênero *Klebsiella* estão emergindo como importantes patógenos causadores de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS), principalmente infecções envolvendo o trato urinário, trato respiratório baixo, pele e tecidos moles, feridas, sistema nervoso central e septicemia (LEE et al., 2010). São considerados microrganismos oportunistas que acometem indivíduos imunossuprimidos, pacientes internados não só em áreas de alto risco, mas também em áreas de menor risco, como as clínicas e asilos (PATERSON e BONOMO, 2005; KONEMAN et al., 2008; VELASCO et al., 2009; SHRESTHA et al., 2019).

Entre as espécies reconhecidas como membros desse gênero, *K. pneumoniae* é a mais frequente associada a doenças humanas. Na América Latina, foi o terceiro patógeno mais prevalente isolado do trato respiratório de pacientes hospitalizados com pneumonia (MARRA et al., 2011). No Brasil, em infecções de pele e tecidos moles foi à quarta (10,4%) espécie mais isolada, enquanto que em infecções da corrente sanguínea essa bactéria foi encontrada em 12,3% dos casos (GALES et.al., 2012; ANVISA, 2014). No Canadá e Estados Unidos, está entre os principais patógenos que causam bacteremias (MARRA et al., 2011). De acordo com o Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 14, publicado em dezembro de 2016 pela ANVISA, das 22.499 notificações de identificações de microrganismos causadores de infecção primária de corrente sanguínea em UTI adulto, a espécie *K. pneumoniae* foi a mais frequente com 3.805 (16,9%) dos casos (ANVISA, 2016).

Klebsiella pneumoniae possui algumas propriedades bioquímicas que proporcionam sua identificação, sendo, por exemplo, a reação de oxidase, indol, ornitina negativa, prova da lisina positiva, fermentação da glicose, lactose e sacarose, utilização do citrato e hidrólise da

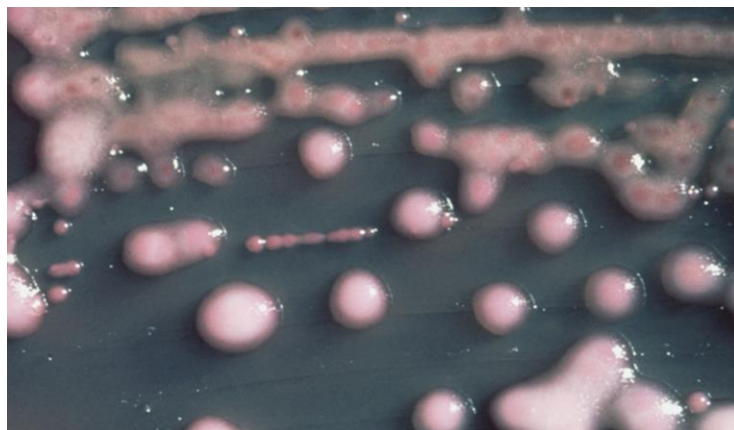
uréia positivas. Por ser fermentador de lactose, em meios de isolamentos diferenciais, como ágar MacConkey e Eosina Azul de Metileno (EMB) (Figura 1), *K. pneumoniae* produz colônias grandes, de cor rosa, brilhantes, quase sempre de aspecto mucóide em decorrência da presença de cápsula, constituída por polissacarídeos que confere virulência a esses microrganismos *in vivo* (TRABULSI et al., 2008). Testes bioquímicos para produção de indol a partir do triptófano pode ser utilizado para diferenciar as espécies *K. pneumoniae* (indol negativa) e *K. oxytoca* (indol positiva), ambas as espécies imóveis (KONEMAN et al., 2008).

A espécie *K. pneumoniae* possui uma grande capacidade na aquisição de plasmídeos de multirresistência, através da conjugação bacteriana, fazendo com que esses isolados apresentem resistência a várias classes de antimicrobianos dificultando na escolha da antibioticoterapia adequada (TRABULSI et al., 2008).

O uso excessivo de antimicrobianos β -lactâmicos em pacientes acometidos por *K. pneumoniae*, culminou no surgimento de cepas resistentes aos carbapenêmicos como imipenem, meropenem e ertapenem, sendo essa resistência bacteriana mais relacionada a produção de enzimas como KPC, GES, NDM, VIM e IMP (ZHAO et al., 2010; AIRES et al., 2013; DALMOLIN et al., 2017; YAMASAKI et al., 2017).

A colonização intestinal por enterobactérias é um dos principais fatores que favorecem a infecção, pois os portadores colonizados podem servir como um importante reservatório para a disseminação de bactérias resistentes dentro do hospital (TENOVER, 2006; BORER et al., 2012). ZHAO et al. (2014), investigando a presença de CRE em amostras fecais em um hospital chinês, detectaram os genes KPC-2, IMP-4, e KPC-2 co-produzindo NDM-1. Esses dados apontam a importância dessa vigilância de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos provenientes de colonização intestinal, devido a sua capacidade de disseminação de mecanismos de resistência por pacientes assintomáticos.

Figura 1. Isolado de *Klebsiella pneumoniae* em Ágar MacConkey.



Fonte: <http://en.academic.ru/dic.nsf/enwiki/10731639>; acesso 15.11.2017

2.2 Antimicrobianos β -lactâmicos

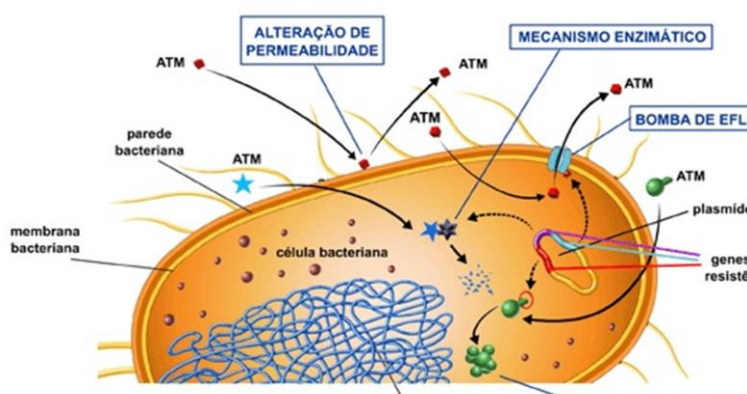
Antimicrobianos são fármacos que têm ação sobre microrganismos e que podem ter origem natural quando produzidos totalmente por microrganismos ou semi-sintética quando produzidos parcialmente, como também podem ser totalmente sintetizados em laboratório, neste caso são chamados quimioterápicos (RANG et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

Os antibióticos β -lactâmicos são caracterizados pela presença de um anel β -lactâmico que é composto de três átomos de carbono e um de nitrogênio, conferindo ação antimicrobiana. Nesse grupo estão incluídas as penicilinas, as cefalosporinas, os monobactâmicos e carbapenêmicos (TORTORA et al., 2012). São comumente utilizados na terapia clínica para o tratamento de infecções nosocomiais causadas por bactérias gram-negativas, como a *K. pneumoniae* (THAKURIA et al., 2013). Possuem como mecanismo de

ação a inibição da síntese da parede celular, ao interagir com as proteínas de ligação à penicilina (PBPs), localizada na membrana celular, inibem a enzima de transpeptidação que forma ligações cruzadas das cadeias peptídicas do peptidoglicano (ZEBA, 2005). Este processo de inativação interrompe a constituição fisiológica normal do peptidoglicano da parede celular e induz a lise e morte da célula bacteriana. Os β -lactâmicos são os antibióticos mais prescritos mundialmente devido à boa atividade, baixa toxicidade e grande variedade dos compostos disponíveis (THERRIEN; LEVESQUE, 2000).

A resistência aos antimicrobianos pode ser desenvolvida de variadas formas, mas no caso dos β -lactâmicos, as bactérias conseguem evitar os seus efeitos devido a quatro mecanismos principais: Alteração do alvo do antimicrobiano, devido à perda total da afinidade ou a sua simples redução; Redução da quantidade de beta-lactâmico que consegue atingir o alvo, por redução da sua entrada, devido a alterações na permeabilidade (mutações ou perdas de porinas); Expulsão do antimicrobiano causado pelo bombeamento por um transportador de efluxo; e Presença de mecanismos enzimáticos que inativam total ou parcialmente o beta-lactâmico e desenvolvimento de uma via metabólica alternativa envolvendo percursores (Figura 2) (FERNANDES et al., 2013; AZEVEDO et al., 2014).

Figura 2 - Imagem ilustrativa das principais resistências desenvolvidas pelas bactérias aos antimicrobianos.



Fonte: http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controlere/rede_rm/cursos/rm_controlere/opas_web/modulo3/mecanismos.htm; acesso 22.12.2018

2.3 Beta-lactamases

Beta-lactamases são enzimas bacterianas capazes de degradar o anel β -lactâmico dos antibióticos beta-lactâmicos transformando-os em produtos inativos (TRABULSI et al., 2008). São codificadas principalmente por genes plasmidiais que são encontrados com frequência entre as enterobactérias, representando uma séria ameaça a atual terapia por antibióticos β -lactâmicos (JEONG et al., 2004; WOODFORD et al., 2005). Essas enzimas constituem o principal mecanismo de resistência em bactérias gram-negativas, diminuindo a habilidade dos β -lactâmicos de se ligarem as proteínas ligadoras de penicilina (PBPs) na parede celular bacteriana (SANTOS et al., 2010). A maior utilização de β -lactâmicos no ambiente hospitalar resulta em pressão seletiva sobre a microbiota, o que favorece a seleção de sub-populações de micro-organismos com sensibilidade diminuída ou resistentes a esses antimicrobianos (MENDES et al., 2004a).

São bastante diversificadas, podendo ser categorizadas empregando critérios distintos, sendo as classificações de Ambler (1980) e Bush, Jacoby e Medeiros (1995) mais utilizadas. A classificação de Ambler baseia-se na estrutura molecular das enzimas e incluem todas as β -lactamases descritas em quatro classes: A, B, C e D, sendo as classes A, C e D compostas por enzimas com serina no sítio ativo, e a classe B composta por enzimas com zinco em seu sítio ativo. Já a classificação de Bush, Jacoby e Medeiros, agruparam as β -lactamases correlacionando seus substratos e perfis de inibição, em grupos de 1 a 4, com subdivisões nos mesmos. A correlação entre estas duas classificações, molecular e fenotípica, foi atualizada por Bush e Jacoby (2010). Desse modo, as carbapenemases fazem parte das classes A, B e D de Ambler (1980) e aos grupos 2df, 2f, 3a e 3b de Bush e Jacoby (2010).

2.3.1 Serina-carbapenemases: KPC E GES

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

A enzima KPC foi descrita primeiramente em uma amostra de *K. pneumoniae* oriunda da Carolina do Norte em 1996, por meio de um projeto de vigilância (ICARE- “Intensive

Care Antimicrobial Resistance Epidemiology”). Essa amostra era resistente a todos os beta-lactâmicos testados, mas na presença de ácido clavulânico observou-se uma redução da concentração inibitória mínima (CIM) dos carbapenêmicos (imipenem e meropenem) avaliados. A atividade da enzima foi associada a um plasmídeo não conjugativo codificada pelo gene *bla*_{KPC-1} (YIGIT et al., 2001). Logo em seguida, houve muitos relatos de uma KPC variante descoberta na costa leste dos Estados Unidos, sendo denominada KPC-2. Mais tarde, observou-se que KPC-1 é idêntica à KPC-2 através de sequenciamento, consequentemente, o KPC-1 já não é uma designação válida. (MIRIAGOU et al., 2003; MOLAND et al., 2003; YIGIT et al., 2008).

KPC é a carbapenemase mais associada a amostras de *K. pneumoniae* nas Américas do Norte e do Sul, mas também existem relatos de *K. pneumoniae* produtoras de KPC na Europa, Ásia e África (VILLEGAS et al., 2006; WEI et al., 2007; WOODFORD et al., 2008; CUZON et al., 2010; BRINK et al., 2011; MELO et al., 2014; BARANIAK et al., 2017; CALIA et al., 2017; TADA et al., 2017).

Os genes *bla*_{KPC} está frequentemente localizado no transposon Tn4401 (EILERTSON et al., 2019). Este transposon foi identificado em plasmídeos de diferentes tamanhos, sugerindo que o gene também pode se mover pela inserção do transposon em plasmídeos diferentes (RODRIGUES et al., 2017). Este perfil de disseminação tem limitado as chances de sucesso terapêutico contra estes microrganismos pan-resistentes (PDR) (resistentes a todos os antimicrobianos testados de acordo com as recomendações do CLSI) (LEAVITT et al., 2007). O gene *bla*_{KPC} também pode se encontrar localizado em elementos não-Tn4401 (NTE_{KPC}) (CHEN et al., 2014). Cerdeira et al. (2017), no Brasil, detectaram o IncX3 no NTE_{KPC} em *K. pneumoniae* produtora de KPC-2. Estudo recente de Cerdeira et al. (2019), também no Brasil, detectou o gene *bla*_{KPC} inserido no NTE_{KPC}-IId em plasmídeo IncQ1 no Brasil.

As variantes do gene *bla*_{KPC} são descritas predominantemente em isolados de *K. pneumoniae*, mas também são descritas em outras enterobactérias como *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Enterobacter spp*, *Proteus mirabilis* e *Serratia spp*.e também em bactérias não fermentadoras como *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* (JÁCOME et al., 2012; CABRAL et al., 2015; CARRARA et al., 2015; FIGUEIRAL et al., 2015; MARGATE et al., 2015; PILATO et al., 2016; DELPHINE et al., 2017; LIANG et al., 2017; ZHENG et al., 2017; RECHENCHOSKI et al., 2017).

No Brasil, o primeiro relato de cepas de *K. pneumoniae* produtoras de KPC-2 foi em 2006, e foram isoladas de quatro pacientes hospitalizados em uma unidade de cuidados intensivos de um hospital em Recife (MONTEIRO et al., 2009). Em seguida, houve relatos no

Rio de Janeiro (PEIRANO et al., 2009) e em São Paulo (PAVEZ et al., 2009). Isolados produtores desta enzima já são descritos nas cinco regiões brasileiras, inclusive em Recife-PE, e apesar de existir vinte e quatro variantes do gene *bla*_{KPC} (<http://www.lahey.org/studies/other.asp#table1>), apenas o alelo *bla*_{KPC-2} foi detectado até o momento no Brasil (CABRAL et al., 2012; CHANG et al., 2013; CABRAL et al., 2014; MELO et al., 2014; RIBEIRO et al., 2016; SCAVUZZI et al., 2017).

Dalmolin et al. (2018), identificaram um isolado clínico de *K. pneumoniae* que além de transportar o gene *bla*_{KPC-2} em um plasmídeo IncFIB, também abrigava o gene *mcr-1* em um plasmídeo da família IncX4 no sul do Brasil. Essas descobertas evidenciam que os isolados de *K. pneumoniae* que transportam tanto *mcr-1* como *bla*_{KPC-2} podem surgir como uma séria ameaça à terapia antimicrobiana.

A triagem fenotípica de KPC se dá pelo teste de Hodge modificado, conforme protocolo estabelecido pelo CLSI (2014). Esse teste é considerado positivo quando houver um alargamento da área de crescimento bacteriano na inserção com o limite externo do halo de inibição. Porém, podem existir falsos positivos ou amostras com resultados duvidosos, e por isso é indicado realizar uma metodologia por biologia molecular, que consiste na Reação em Cadeira da Polimerase (PCR) que faz a detecção do gene *bla*_{KPC} nas bactérias produtoras de KPC.

Trabalhos do nosso grupo de pesquisa têm demonstrado que as espécies *K. pneumoniae*, *S. marcescens*, *Enterobacter spp.* e *P. mirabilis* são enterobactérias que têm se destacado como produtoras de *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (KPC) em IRAS em Recife-PE, nos últimos anos (CABRAL et al., 2012; MELO et al., 2014; CABRAL et al., 2015; MARGATE et al., 2015; SCAVUZZI et al., 2016; SCAVUZZI et al., 2017; CABRAL et al., 2017). Esses dados ressaltam a necessidade de estudos adicionais sobre a identificação de outros mecanismos genéticos de resistência em *K. pneumoniae*, como também a compreensão do surgimento, propagação e a sua dispersão dessas bactérias.

A carbapenemase do tipo GES codificadas por variantes do gene *bla*_{GES} foi primeiramente descrita em 1998 na França, em um plasmídeo não transferível de 140 kb, em uma amostra de *K. pneumoniae* proveniente de um esfregaço retal de uma menina que havia sido hospitalizada na Guiana Francesa, daí a origem do nome GES. Essa cepa era resistente a cefalosporina de espectro estendido antagonizado pela adição de ácido clavulânico, tazobactam ou imipenem (POIREL et al., 1999). Posteriormente, o gene *bla*_{GES} foi identificado em isolado clínico de *P. aeruginosa*, resistente a todas as cefalosporinas e

aminoglicosídeos de espectro estendido, apresentando efeito sinérgico incomum entre ceftazidima e imipenem (DUBOIS et al., 2002)

Essas enzimas localizam-se como cassetes gênicos em integrons, transposons ou associados a sequências de inserção hospedado em plasmídeos (MARTÍNEZ-MARTÍNEZ; GONZÁLEZ-LÓPEZ, 2014). Existem 27 variantes do gene *bla*_{GES} descritas em todo o mundo até a presente data (novembro de 2018, acesso: <http://www.lahey.org/studies/other.asp#table1>) e embora raro, as enzimas GES têm sido identificadas mundialmente, com relatos na Grécia, França, Portugal, África do Sul, Guiana Francesa, Brasil, Argentina, Coreia, Japão e Irã (QUEENAN; BUSH, 2007; DROPA et al., 2010; FIROOZEH et al., 2016; NODARI et al., 2017; YAMASAKI et al., 2017)

No Brasil, variantes do gene *bla*_{GES} são relatadas, principalmente, em isolados de *P. aeruginosa* recuperados de pacientes internados em hospitais (CASTANHEIRA et al., 2004b; PELLEGRINO et al., 2006; FONSECA et al., 2007; POLOTTO et al., 2012). Entretanto, as variantes GES-5 e GES-7 já foram identificadas em cepas de *K. pneumoniae* no estado de São Paulo (DROPA et al., 2010; PICÃO et al., 2010). Nodari et al (2017), descreveram a variante GES-5, bem como outras β -lactamases (*bla*_{CTX-M-2} e *bla*_{OXA-2}) e enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (*aac*(3)-IIa e *aac*(6')-Ic) em um isolado clínico de *S. marcescens*, recuperado de fluido ascítico de uma paciente em um hospital terciário em Porto Alegre-RS. Contudo, até o momento em Recife, não existem relatos do gene *bla*_{GES} em isolados clínicos de *K. pneumoniae*.

2.3.2 Metallo-beta-lactamases: NDM, VIM e IMP

As carbapenemases do tipo metallo-beta-lactamases se diferem estruturalmente das outras β -lactamases pela exigência de um íon zinco no sítio ativo, consequentemente são inibidas por metais quelantes de íons tais como ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA), ácido dipicolínico, 1,10-o-fenantrolina e ácido 2-mercaptopropiônico (2-MPA) (MARCHIARO et al., 2008).

A enzima NDM foi detectada em 2008, no norte da Europa, em *K. pneumoniae* isolada de infecção do trato urinário de um paciente de origem indiana, que havia sido internado em Nova Delhi (YONG et al., 2009). Apesar de o continente indiano possuir altas taxas de prevalência desta enzima, detectadas em enterobactérias como *Escherichia coli*, *K. pneumoniae*, *E. cloacae* e também em não fermentadores como *A. baumannii* e *P. aeruginosa* (SOLGI et al., 2017; HOSSEINZADEH et al., 2017; LI et al., 2017; RAHMAN et

al., 2017), variantes do gene *bla*_{NDM} têm sido relatadas esporadicamente em todo o mundo, como por exemplo, na Europa (LOHR et al., 2017), Ásia (ZHAO et al., 2017; ZOU et al., 2017; LEUNGTONGKAM et al., 2017) e África (UWINGABIYE et al., 2017).

O gene *bla*_{NDM} é frequentemente localizado no cromossomo em não fermentadores como *Acinetobacter spp.*, ou em plasmídeos conjugativos de diferentes tamanhos e pertencentes a diferentes grupos de incompatibilidade em enterobactérias, podendo ser disseminado para outras cepas. Os plasmídeos que carregam o gene *bla*_{NDM} podem abrigar numerosos genes de resistência, que conferem inatividade a aminoglicosídeos, macrolídeos, sulfa e rifampicina (NORDMANN; POIREL, 2011; AREND, 2014; DORTET et al., 2014; LEUNGTONGKAM et al., 2017).

Na América Latina, o gene *bla*_{NDM} foi descrito pela primeira vez em 2011 em *K. pneumoniae*, na Guatemala e Colômbia (PASTERAN et al., 2012; ESCOBAR et al., 2013). No Brasil, os primeiros relatos de NDM-1 foram descritos em 2013, no Rio Grande do Sul, em isolados de *Providencia rettgeri* e *E. hormaechei*, isoladas do mesmo hospital (CARVALHO et al., 2013, 2014). Posteriormente, houve outros relatos de Enterobacteriaceae produtoras de NDM como *E. cloacae*, *Morganella morganii* em Porto Alegre (ROZALES et al., 2014), *E. coli* e *K. pneumoniae* no Rio de Janeiro e Brasília (CARNEIRO, et al., 2014). Diante desses relatos, a Anvisa passou a lançar notas técnicas relatando medidas de prevenção e controle de infecção por enterobactérias multirresistentes (ANVISA, 2013a; ANVISA 2013b).

Aires et al (2013), no Rio de Janeiro, identificaram a produção de NDM-1 em todos os 16 isolados de *K. pneumoniae* estudados, bem como a presença de outros genes de resistência incluindo *bla*_{KPC-2}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aadA*, *AADB*, *AAC (3) -IIa*, *AAC (6') -Ib*. Nesse mesmo estudo também foi detectado duas estirpes que transportavam os genes *bla*_{NDM-1} e *bla*_{KPC-2} em plasmídeos separados. Esses achados são preocupantes, visto que *K. pneumoniae*, produtor de KPC-2, já é endêmica no Brasil e a disseminação de *bla*_{NDM-1} pode ser facilitado quando associado a estes patógenos.

Barberino et al. (2018), relataram a presença de NDM em *K. pneumoniae* e *Citrobacter freundii*, em dois pacientes internados em um hospital público em Salvador, Bahia. Sendo esses achados os primeiros casos clínicos de NDM descritos em Enterobacteriaceae no nordeste do Brasil, ressaltando o risco de propagação de genes de resistência entre os isolados clínicos e a necessidade de prevenção e controle das infecções

causadas por esses microrganismos, cujas opções de tratamento estão cada vez mais limitadas e associadas a altas taxas de mortalidade.

O primeiro microrganismo relatado como produtor de VIM em um isolado clínico de *P. aeruginosa* foi coletado de um paciente no Hospital Universitário de Verona no Norte da Itália, em seguida nomeada como Verona Imipenemase (LAURETTI et al., 1999). São conhecidos até o momento (janeiro de 2019) 46 variantes do gene *bla*_{VIM}, classificados em ordem numérica de *bla*_{VIM-1} à *bla*_{VIM-46} (<https://www.lahey.org/Studies/other.asp#table1>).

O gene *bla*_{VIM} já foi encontrado em diferentes países espalhados por todo o mundo. Markovska et al. (2016), relataram o gene *bla*_{VIM-1} e CMY em clones de *P. mirabilis* na Bulgária. Já Martinez et al. (2015), em estudos com *Enterobacter cloacae*, relataram *bla*_{VIM-1} em isolados de um hospital na Venezuela. No Brasil, Balelo et al. (2017), relata a primeira cepa de *P. aeruginosa* extensivamente resistente albergando um plasmídeo carreador de *bla*_{VIM-7}.

Outro gene também relacionado às Metallo β -lactamase é o gene *bla*_{IMP}. A família Imipenema (IMP) foi descrita pela primeira vez em 1994 em uma cepa de *S. marsecens* (OSANO et al., 1994) conferindo resistência ao antimicrobiano Imipenem. O primeiro relato de *bla*_{IMP} em *K. pneumoniae* no Brasil foi em um paciente diabético e hipertenso no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo por Lincopan et al. (2005). São conhecidos 53 variantes deste gene, e classificados em ordem numérica de *bla*_{IMP-1} à *bla*_{IMP-53} (<https://www.lahey.org/Studies/other.asp#table1>). Os genes variantes para *bla*_{IMP} já foram descritos em diferentes espécies de bactérias gram-negativas, incluindo *S. marsecens* (OSANO et al., 1994), *A. baumannii* (SILVA et al., 2002), *P. aeruginosa* (XIONG et al., 2006), *P. putida* (DOCQUIER et al., 2003), *E. coli* (ZHAO et al., 2012), *K. pneumoniae* (ZHAO et al., 2012), *Aeromonas caviae* (NEUWIRTH et al., 2007) e *P. mirabilis* (DIXON et al., 2016).

2.4 Plasmídeos

Os plasmídeos bacterianos são pequenas moléculas circulares de DNA de dupla fita, presentes em bactérias gram-positivas e gram-negativas que se autorreplicam de maneira autônoma, independente do DNA cromossômico (TORTORA, 2005). Essas estruturas podem existir em número variável dentro da célula bacteriana e tendo funções diversas e seletivas. Podem ser classificados como plasmídeos conjugativos, mobilizáveis e não conjugativos (FROST et al., 2005; ANDRADE et al., 2011).

Os plasmídeos conjugativos, codificam um conjunto completo de genes de transferência (MOB + T4SS), com operons gênicos *tra* que codificam o pili sexual (F), além da presença das regiões *oriV* e *oriT* in cis, onde ele mesmo transfere-se para a outra célula bacteriana (ZAHA, 2003; CARATTOLI, 2009; CUZÓN et al., 2011). Exemplo: o IncN (CHAPARRO et al., 2014).

Quanto aos plasmídeos mobilizáveis apenas codificam um sistema MOB mínimo que codificam as proteínas de mobilidade (*mobA*, *mobB*, *mobC*) e replicação (*repA*, *repB* e *repC*), e possuem um sítio de origem de transferência (*oriT*) (FRANCES G. et al., 2015). Essas proteínas ligam-se a essa região específica *oriT* e podem ser transportados “in trans”, ou seja, através de um transposon conjugativo ou de um plasmídeo auxiliar conjugativo que transporta o plasmídeo mobilizável para outra célula bacteriana,

Os plasmídeos conjugativos podem ser incompatíveis entre eles, impedindo a coexistência de tipos iguais num mesmo hospedeiro. Os plasmídeos que são incompatíveis pertencem ao mesmo grupo de incompatibilidade (Inc) (SILVA et al., 2008). 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).

Os plasmídeos podem ser distinguidos pela diferença de peso molecular que é expresso em quilo base (Kb). Esse peso molecular é medido pela diferença na migração por eletroforese em gel de agarose (DOMENICO et al., 1992), no qual se obtém diferentes perfis plasmidiais (FEIZABADI et al., 2008). O perfil plasmidial por eletroforese juntamente com outras técnicas de tipagem, tem sido utilizado para estudar a epidemiologia das infecções por enterobactérias (CANTÓN et al., 2002; HOSSAIN et al., 2004; LOPES et al., 2005; CHMELNITSKY et al., 2008; MARCHAIM et al., 2008; PETRELLA et al., 2008; CHEN et al., 2009).

Outra forma de analisar os plasmídeos albergados por um isolado bacteriano é através da Tipagem de replicon baseada em PCR (PBRT) que detecta replicons dos principais grupos de incompatibilidade (inc/rep) dos plasmídeos (CARATTOLI et al., 2005).

2.4.1 Grupo de incompatibilidade plasmidial

Devido à variedade dos plasmídeos os mesmos eram classificados seguindo critérios definidos pela espécie ou gênero da bactéria que eles foram descobertos, bem como a sua capacidade de conjugação. No entanto, esses critérios começaram a se tornar insatisfatórios, uma vez que os mesmos plasmídeos eram encontrados em diversas espécies bacterianas e houve um aumento dos plasmídeos não conjugativos (ZAHA et al., 2003). Portanto, devido à crescente importância epidemiológica no rastreamento de plasmídeos que albergam genes de resistência, Carattoli et al. (2005), desenvolveram uma técnica de PCR baseado em replicons (inc/rep PCR) dos principais grupos de incompatibilidade plasmidial entre enterobactérias, que é definido pela inability de dois plasmídeos coexistirem na mesma célula bacteriana compartilhando o mesmo sítio de origem de replicação (*ori*) (CARATTOLI et al., 2015).

A identificação do grupo Inc tem sido frequentemente usada para classificar os plasmídeos. O método tem sido uma ferramenta importante para rastrear os plasmídeos que albergam genes de resistência e virulência bacteriana 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).

A especificidade do método foi testada e os resultados indicaram que a detecção do grupo Inc por PCR demonstra alta especificidade e sensibilidade na detecção de replicons em plasmídeos de referência. Estes resultados sugerem que o método é potencialmente aplicável a um grande número de estirpes para rastrear a difusão de plasmídeos de resistência a múltiplas drogas em ambientes diferentes. Esta técnica tem sido utilizada por diversos autores para identificar os grupos de incompatibilidade plasmidial.

Chen et al. (2013), analisando 318 isolados clínicos de *K. pneumoniae* positivas para KPC, em hospitais de Nova York e Nova Jersey (EUA), detectaram o plasmídeo tipo IncI2 em 46,2% dos isolados. Por outro lado, Tijet et al. (2014) no Canadá, em estudo com *K. pneumoniae* portadores de KPC-2 e KPC-3 detectaram o IncFIIA como o mais prevalente, sendo encontrado em 71% dos isolados. Já Gaibani et al. (2017) relataram um plasmídeo IncL/M de 49,257 pb portador do gene *bla_{OXA-48}* coletado de uma linhagem clínica de *K. pneumoniae* isolada na Itália. Em Pequim, Zhai et al (2016), determinando a sequência completa de um plasmídeo tipo IncHI2 isolado de uma amostra clínica de *K. pneumoniae*, observaram que esse plasmídeo transportava múltiplos genes de resistência a antibióticos, incluindo *catA2*, *aac* (6') - Ib, *strB*, *strA*, *dfrA19*, *bla_{TEM-1}*, *bla_{SHV-12}*, *sul1*, *qacE delta 1*, *ereA*, *arr2*, e *aac3*. Por outro lado, Anes et al (2017), na Irlanda, detectaram a

presença dos plasmídeos IncFIB, InFIA e IncR em 91%, 45% e 45% respectivamente nos isolados de *K. pneumoniae*.

Li et al. (2018) na China, detectaram o gene *bla*_{KLUC}, que codifica resistência à cefotaxima e é semelhante a outras enzimas da família *bla*_{CTX-M}, inserido em um plasmídeo tipo IncA/C em *K. pneumoniae*. Já Agel et al. (2018) estudando *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases isoladas de amostras clínicas na Jordânia, detectaram o gene *bla*_{NDM} inseridos em plasmídeos IncFIB e IncFII e *bla*_{OXA} inseridos em plasmídeos tipo IncL/M.

No Brasil são poucos estudos que caracterizam os Incs plasmidiais de *K. pneumoniae*, principalmente porque alguns deles determinaram plasmídeos não tipáveis (PEREIRA et al., 2013). Cuzon et al. (2010), com isolados de diferentes países como Estados Unidos, Grécia, Suécia, Colômbia, Brasil e Israel revelou também a prevalência dos Inc L/M, FII e N, sendo no Brasil o IncL/M prevalente. Adicionalmente, Andrade et al. (2011) utilizando isolados de São Paulo, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul, identificaram os Incs FII, L/M e N. Já Nicoletti et al (2015) com isolados de São Paulo identificaram o IncQ em *K. pneumoniae* carreando uma nova classe de carbapenemase BKC-1. Portanto, em Recife-PE, pelo nosso conhecimento, nenhum estudo conseguiu tipar os Incs plasmidiais de *K. pneumoniae*.

Estudos anteriores, detectaram o IncQ em diferentes isolados bacterianos como em *E. coli*, *Salmonella enterica* serovar, *P. aeruginosa* e *E. cloacae*, no Canadá, Reino Unido e Alemanha, e os genes acessórios de resistência encontrados foram para resistência a estreptomicina, sulfonamida, tobramicina, canamicina, como também para cefalosporinas (*bla*_{CMY-4} cefalosporinase) e a carbapenêmicos (*bla*_{GES-5}) (POIREL et al., 2009; LOFTIE-EATON et al., 2012; KOTSAKIS et al., 2015). No Brasil, são escassos estudos que relatem a presença do IncQ em isolados de *K. pneumoniae* (NICOLETTI et al., 2015; CERDEIRA et al., 2019).

2.5 Tipagem molecular de bactérias

Diferentes metodologias têm sido utilizadas para determinar a disseminação clonal de bactérias no ambiente hospitalar. O processo de tipagem é importante epidemiologicamente no reconhecimento de surtos de infecções, na detecção da disseminação da resistência bacteriana, na identificação de transmissão cruzada de patógenos e na determinação da fonte de infecção. Em termos epidemiológicos, os organismos envolvidos em surtos são relacionados clonalmente. Estes organismos são membros de uma mesma espécie e possuem fatores de virulência, de resistência e características bioquímicas e genéticas semelhantes. Por

outro lado, existe diversidade suficiente ao nível de espécie para que organismos isolados de diferentes fontes e regiões geográficas possam ser diferenciados ou classificados em subtipos ou linhagens. Estas diferenças entre linhagens da mesma espécie são reflexos do acúmulo de mutações aleatórias não letais, incluindo substituições de pares de bases, deleção de genes individuais, ou mesmo aquisição de DNA de outras espécies bacterianas, principalmente pela transferência de plasmídeos bacterianos.

Portanto, as técnicas de tipagem molecular são importantes para avaliar a dispersão de genes de resistência entre isolados de mesma espécie ou espécies diferentes; entre pacientes; entre setores dos hospitais; traçando o perfil clonal circulante na instituição, sendo possível adotar medidas adequadas de contenção. Dentre as técnicas para detecção da relação clonal podemos citar: análise plasmidial (CHEN et al., 2009), Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) (CHMELNITSKY et al., 2008), ribotipagem clássica (IVERSEN et al., 2007), Random-Amplified Polymorphic DNA (RAPD) (YE et al., 2010), polimorfismo de fragmento amplificado (AFLP) (IVERSEN et al., 2007), ribotipagem por PCR e tDNA-PCR (LOPES et al., 2007), MLST (MELETIS et al., 2018) e ERIC-PCR (DUAN et al., 2009).

Dentre estas se destacam o MLST e ERIC-PCR (DUAN et al., 2009). Esta última é uma técnica baseada em PCR, por isso é rápida e de fácil execução, que tem se mostrado eficiente para determinar o perfil genético de diferentes espécies de enterobactérias (HASHEMIZADEH et al., 2018), inclusive em *K. pneumoniae* provenientes de Recife-PE (MELO et al., 2014; SCAVUZZI et al., 2017; CABRAL et al., 2017). Por outro lado, o MLST é uma tipagem molecular por sequenciamento de múltiplos *loci* (MLST) que permite a possibilidade de analisar a filogenia das amostras testadas delineando a disseminação clonal. As técnicas de tipagem molecular são normalmente utilizadas para a compreensão da dinâmica da disseminação de microrganismos patogênicos, porém os resultados são restritos aos laboratórios onde foram realizados. A técnica MLST permite a comparação dos resultados entre diversos laboratórios através do banco de dados mundial (<https://pubmlst.org>), essa tem sido uma das técnicas mais consideradas e utilizadas para determinar os clones (ST) bacterianos mundialmente (DIANCOURT, 2005; PEREIRA et al., 2013; DE SOUZA DA SILVA et al., 2017; CUNHA et al., 2017; MELETIS et al., 2018).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Investigar a ocorrência de genes para carbapenemases, grupos de incompatibilidade plasmidial (Incs) e a relação clonal de isolados clínicos de *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos provenientes de colonização e de infecção de um hospital público em Recife-PE entre 2017 e 2018.

3.2 Específicos

- Analisar a susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados de *K. pneumoniae*;
- Verificar a ocorrência dos genes para carbapenemases (*bla*_{KPC}, *bla*_{GES}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM} e *bla*_{IMP}) nos isolados de *K. pneumoniae*;
- Determinar os grupos de incompatibilidade plasmidial (IncN, IncA/C, IncL/M, IncHI2, IncFIB, IncHI1B e IncQ) nos isolados;
- Comparar os isolados de *K. pneumoniae* provenientes de colonização e infecção com relação a presença dos genes para carbapenemases;
- Determinar a relação clonal dos isolados de *K pneumoniae*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Isolados bacterianos

Foram analisados 27 isolados de *K. pneumoniae* resistentes a um ou mais carbapenêmicos, provenientes de dois hospitais de Recife-PE entre agosto de 2017 e março de 2018. A identificação bioquímica e o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos foram realizados inicialmente nos hospitais através do sistema automatizado BD PhoenixTM. Em seguida, no Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular do Departamento de Medicina Tropical-UFPE, os isolados foram submetidos à identificação bioquímica convencional (SIM – Sulfeto, Indol e Motilidade; TSI – Tríplice açúcar-ferro; Prova do citrato, Prova da uréia; Prova da lisina e análise do aspecto da colônia em Ágar EMB) (KONEMAN et al., 2008), para confirmação da pureza da cultura bacteriana. Os isolados bacterianos foram conservados em estoque congelado com glicerol 15% a -70°C e fazem parte da coleção de culturas bacterianas do Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular (Departamento de Medicina Tropical, CCS, UFPE). Para as análises os isolados foram cultivados em Caldo Brain Heart Infusion (BHI) e plaqueados em Ágar Brain Heart Infusion.

4.2 Susceptibilidade antimicrobiana

A concentração inibitória mínima (CIM) para os antimicrobianos: Amicacina (AMI); Amoxicilina-ácido clavulânico (AMC); Ampicilina (AMP); Cefazolina (CFZ); Cefepime (CPM); Cefalotina (CFL); Cefotaxima (CTX); Cefoxitina (CFO); Ceftazidima (CAZ); Ceftriaxona (CRO); Cefuroxima (CRX); Ciprofloxacina (CIP); Colistina (COL); Ertapenem (ERT); Gentamicina (GEN); Imipenem (IMI); Levofloxacina (LEV); Meropenem (MER); Piperacilina-tazobactam (PIPT); Trimetoprim-sulfametaxazol (TRIS), foi determinada através do equipamento automatizado BD PhoenixTM. E o perfil de susceptibilidade foi interpretado de acordo com o CLSI (2019).

4.3 Extração de DNA total

A extração de DNA total foi realizada através de kit comercial Wizard genomic DNA purification kit (Promega), e os procedimentos foram de acordo com as instruções do

fabricante. Para o procedimento, os isolados de *K. pneumoniae* foram inicialmente cultivados em caldo BHI por 24 horas a 37°C.

4.4 Condições de PCR para os genes *bla*_{KPC} e *bla*_{GES} (serino-carbapenemases)

Os genes de resistência *bla*_{KPC} e *bla*_{GES}, foram investigados em todos os isolados de *K. pneumoniae* pela técnica de PCR, com iniciadores descritos na tabela 2. 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 (Ludwig Biotec), 25 mM de MgCl₂ e 10 µmol dos iniciadores. Em cada partida de amplificação foi incluso um controle negativo sem DNA (água Milli-Q estéril) e um positivo. Como controle positivo para o gene *bla*_{KPC}: isolado de *K. pneumoniae* K1P (CABRAL et al., 2011) e para o gene *bla*_{GES}: *P. aeruginosa* P119HC (dados não publicados). As amplificações do gene *bla*_{KPC} foram realizadas com ciclos de desnaturação inicial à 95 °C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos, consistindo cada ciclo de 1 minuto à 95°C para desnaturação, 1 minuto à 63°C para anelamento do primer e 1 minuto à 72°C para extensão. Após estes ciclos foi realizada uma etapa de alongamento final de 10 minutos a 72 °C. Para amplificação do gene *bla*_{GES} foram utilizadas as seguintes condições: 3 min a 93°C para desnaturação inicial; seguido de 40 ciclos de 1 min à 93°C, 1 min à 55°C e 1 min à 72°C, e 7 min à 72°C para extensão final.

4.5 Condições de PCR para os genes *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM} e *bla*_{IMP} (metalo-beta-lactamases)

A presença dos genes *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM} e *bla*_{IMP} foram investigados em todos os isolados utilizando os primers descritos na tabela 2 . As reações de amplificação foram as mesmas descritas anteriormente. Em cada partida de amplificação foi incluso um controle negativo sem DNA (água Milli-Q estéril) e um positivo. Como controles positivos para o gene *bla*_{NDM}: isolado de *K. pneumoniae* K2-R2 (Acesso Genbank: MH818328), para o gene *bla*_{VIM}: isolado de *P. aeruginosa* VIM-1 (JÁCOME et al., 2016) e para o gene *bla*_{IMP} isolado de *P. aeruginosa* 48-1997A (JÁCOME et al., 2016). A amplificação do gene *bla*_{NDM} foi realizada sob as seguintes condições térmicas de ciclagem: 10 min à 94° C para desnaturação inicial, 36 ciclos de amplificação consistindo em 30s à 94 °C, 40s à 52° C, 50s à 72° C e para a extensão final 5 min à 72° C. Para os genes *bla*_{VIM} e *bla*_{IMP} foram ciclos de desnaturação inicial à 95°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos, consistindo cada ciclo de 1 minuto à 95°C para

desnaturação, para anelamento dos primers: 1 minuto à 60°C para *bla*_{IMP} e 1 minuto à 62°C para *bla*_{VIM} e para extensão, 1 minuto à 68°C. Após estes ciclos será realizada uma etapa de alongamento final de 5 minutos à 68°C.

Tabela 1 – Primers utilizados na PCR e sequenciamento do produto de PCR para detecção de genes para carbapenemases.

Gene	Primer	Sequência (5' - 3')	Temp. ^(a)	Tamanho do amplicon (pb)	Referência
<i>bla</i> _{KPC}	KPC-1a	TGTCACGTGTATCGCCGTC	63°C	800	Yigit et al. (2001)
	KPC-1b	CTCAGTGCTCTACAGAAAACC			
<i>bla</i> _{GES}	GES-F	GAAACCAAACGGGAGACGC	60°C	207	Nordmann (2011)
	GES-R	CTTGACCGACAGAGGCAACT			
<i>bla</i> _{NDM}	NDM-Fm	TAAAATACCTTGAGCGGGC	52°C	439	Nordmann (2011)
	NDM-Rm	AAATGGAAACTGGCGACC			
<i>bla</i> _{VIM}	VIM-F	CAGATTGCCGATGGTGTGTTGG	62°C	600	Dong et al. (2008)
	VIM-R	AGG TGGGCCATTCAGCCAGA			
<i>bla</i> _{IMP}	IMP-F	GGAATAGAG TGG CTTAATTCTC	60°C	232	Dong et al. (2008)
	IMP-R	GTGATGCGTCYCCAAYTTCCT			

(a)Temp, temperatura de anelamento; Todos os nomes dos primer foram descritos de acordo com as respectivas referências F (Fom, 1a, F), sequência forward; R (Rem, 1b, R), sequência reverse.

4.6 PCR para identificação dos grupos de incompatibilidade plasmidial (Incs)

A identificação dos grupos de incompatibilidade plasmidial em todos os isolados de *K. pneumoniae* foi realizada pela técnica *Replicon Typing*, segundo Carattoli et al. (2005). As reações de amplificação foram as mesmas descritas anteriormente. Foram utilizados os iniciadores Incs N, L/M, A/C, FIB, HI2, HI1B e Q, descritos na tabela 4, por serem os grupos de incompatibilidade plasmidial mais descritos na literatura para *K. pneumoniae*. Em cada partida de amplificação foi incluso um controle negativo sem DNA (água Milli-Q estéril) e um positivo. Como controles positivos para o IncN: isolado de *P. mirabilis* P2-U (MEDEIROS et al., 2017), IncL/M e IncA/C: isolado de *E. aerogenes* Ea5A (CABRAL, 2016), IncFIB: isolado de *K. pneumoniae* K3-A3 (esse estudo), IncHI2: isolado *E. cloacae* Ec2A (CABRAL, 2016), IncHI1B: Isolado de *K. pneumoniae* K6-U (MEDEIROS et al., 2017) e IncQ: isolado de *Serratia marsces* S4-U (MEDEIROS et al., 2017). As condições de ciclagem foram de 5 minutos a 94°C, seguidos de 35 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 94°C, 1 minuto de anelamento com a temperatura específica de cada iniciador utilizado na

reação (tabela 3) e 1 minuto de extensão a 72°C. A extensão final foi realizada por 10 minutos a uma temperatura de 72°C.

4.7 Eletroforese em gel de agarose

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

4.8 ERIC-PCR

Para o método da ERIC-PCR foram utilizados os primers descritos na tabela 4. As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25 µl por tubo, compreendendo: 1µl de DNA genômico a 100ng/µl, 1,0U da enzima *Taq* DNA polimerase (Promega), 200 µM de dNTP (Ludwig Biotec), 1,52 mM de MgCl₂ e 0,4 µmol dos primers. Em cada partida de amplificação foi incluso um controle negativo (água Milli-Q estéril). As amplificações foram realizadas com ciclos de desnaturação inicial à 95 °C por 3 minutos, seguido de 40 ciclos, consistindo cada ciclo de 1 minuto à 92 °C para desnaturação, 1 minuto à 36°C para anelamento do primer e 8 minuto à 72°C para extensão. Após estes ciclos foi realizada uma etapa de alongamento final de 16 minutos à 72 °C (CABRAL et al., 2012). Oito microlitro dos produtos amplificados acrescidos de dois microlitros de Blue-green Loading Dye I (LGC biotecnologia) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE e voltagem constante de 100V. A análise dos fragmentos amplificados pela ERIC-PCR e a construção do dendrograma foram feitas utilizando o software DARwin 5.

4.9 Sequenciamento dos amplicons

Isolados representativos de produtos de PCR positivos para os genes de resistência e IncS foram purificados através de Kit comercializável Wizard Gel and PCR Clean-Up System (Promega) e sequenciados pelo método de terminação de cadeia de desoxirribonucleotídeo (Sanger et al., 1977), para a confirmação dos genes identificados, utilizando-se os primers

descritos nas tabelas 2 e 3. As seqüências de nucleotídeos foram analisadas pelo programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e serão depositadas no genbank.

Tabela 2 – Primers utilizados na PCR e sequenciamento do produto de PCR para detecção dos Incs plasmidiais e ERIC-PCR nos isolados de *K. pneumoniae*.

INC	Primer	Sequência (5`- 3`)	Temp. ^(a)	Tamanho do amplicon (pb)	Referência
HI-2	IncHI-2-F	GGAGCGATGGATTACTTCAGTAC	64°C	644	Caratolli et al. (2005)
	IncHI-2-R	GGCTCACTACCGTTGTCATCCT			
L/M	IncL/M-F	GGATGAAAACATCAGCATCTGAG	62°C	758	Caratolli et al. (2005)
	IncL/M-R	CTGCAGGGGCGATTCTTTAGG			
A/C	IncA/C-F	GAGAACCAAAGACAAAGACCTGA	62°C	465	Caratolli et al. (2005)
	IncA/C-R	ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTT			
N	IncN-F	GTCTAACGAGCTTACCGAAG	62°C	559	Caratolli et al. (2005)
	IncN-R	GTTTCAACTCTGCCAAGTTC			
HI1B	HI1B-Fw	CAA AAC GAG AGA TAT TCAACCC	63°C	900	Dorted et al. (2012)
	HI1B-Rw	CTG ATT CTT GAT GAT ACA GGG			
FIB	IncFIB-F	GGAGTTCTGACACACGATTTTCTG	62°C	702	Caratolli et al. (2005)
	IncFIB-R	CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT			
Q	Ori-V-F	CTCCCGTACTAACTGTCACG	61°C	436	Smalla et al. (2001)
	Ori-V-R	ATCGACCGAGACAGGCCCTGC	64°C	1.160	
	Rep-B-F	TCGTGGTCGCGTTCAAGGTACG			
	Rep-B-R	CTGTAAGTCGATGATCTGGGCGTT	63°C	191	
	Ori-T-F	TTCGCGCTCGTTGTTCTTCGAGC			
	Ori-T-R	GCCGTTAGGCCAGTTTCTCG	36°C		
NA	ERIC-1	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAAC			
	ERIC-2	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG			

5 RESULTADOS

5.1 ALTA VARIABILIDADE PLASMIDIAL EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* PORTADORES DE *bla*_{KPC-2} E *bla*_{NDM-1} PROVENIENTES DE INFECÇÃO E COLONIZAÇÃO EM PACIENTES DE UM HOSPITAL PÚBLICO DO BRASIL.

Resumo

O uso excessivo de antimicrobianos β -lactâmicos em pacientes hospitalizados favoreceu o surgimento e evolução genética de cepas de *Klebsiella pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos, sendo essa resistência mais relacionada com a produção de enzimas e mediada por plasmídeos conjugativos. Portanto, o objetivo desse estudo foi investigar a ocorrência de genes para carbapenemases, grupos de incompatibilidade plasmidial (Incs) e a relação clonal de isolados clínicos de *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos provenientes de colonização e infecção em pacientes de um hospital público de Recife-PE entre 2017 e 2018. Foram analisados 27 isolados de *K. pneumoniae* resistentes a um ou mais carbapenêmicos provenientes de colonização e infecção. Os isolados foram submetidos à pesquisa de genes de resistência aos carbapenêmicos (*bla*_{KPC}, *bla*_{GES}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM} e *bla*_{IMP}), pesquisa de grupos de incompatibilidade plasmidial (FIB, Q, A/C, L/M, N, HI2 e HI1B) por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Os antimicrobianos que apresentaram melhor atividade contra os isolados de *K. pneumoniae* foram amicacina e colistina. Os genes *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM} foram detectados, respectivamente, em 24 (88,8%) e 16 (59,2%) dos isolados de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos e 13 (48,1%) foram simultaneamente positivos para esses dois genes, tanto em isolados provenientes de infecção quanto de colonização. Não houve detecção dos genes *bla*_{GES}, *bla*_{VIM} e *bla*_{IMP}. Foram detectados cinco grupos de incompatibilidade plasmidial: IncFIB (92,6%), IncQ (88,8%), IncA/C (14,8%), IncHI1B (11,1%) e IncL/M (7,4%), mostrando a grande variabilidade plasmidial desses isolados. Podemos concluir que o acúmulo de determinantes de resistência e a variabilidade de Incs plasmidiais detectados nos isolados de *K. pneumoniae* provenientes de colonização e infecção, juntamente com a disseminação clonal, demonstram a capacidade desses isolados de apresentar e disseminar diferentes genes de resistência através de plasmídeos.

1 INTRODUÇÃO

Klebsiella pneumoniae se destaca clinicamente por estar envolvida em uma variedade de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAs), causando infecções do trato urinário, respiratório, de feridas, como também sepse. (KUNTAMAN et al., 2018; SANTERRE et al., 2018). É importante destacar que um dos principais fatores que favorece a infecção por *K. pneumoniae*, é a colonização intestinal, pois portadores colonizados podem servir como um importante reservatório para a disseminação de bactérias no ambiente hospitalar, e também de mecanismos de resistência, uma vez que podem abrigar genes de resistência e disseminar através de plasmídeos conjugativos, juntamente com transposons (TENOVER, 2006; BORER et al, 2012; ZHAO et al. 2014).

O uso excessivo e indiscriminado de antimicrobianos beta-lactâmicos, culminou no surgimento de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos (SCAVUZZI et al., 2017; ALVES et al., 2018; 2018; MELGAREJO et al., 2018; NAVA et al., 2018), sendo essa resistência mais relacionada à produção de beta-lactamases por essas bactérias e que são mediadas principalmente por plasmídeos conjugativos (ROZALES et al., 2014; NODARI et al., 2017; AL BALOUSHI et al., 2018; PASKOVA et al.; 2018).

A *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) é uma beta-lactamase que se tornou endêmica em vários países, sendo frequentemente detectada em isolados de *K. pneumoniae* provenientes de hospitais brasileiros (MONTEIRO et al., 2009; CABRAL et al., 2012; MELO et al., 2014; TUON et al., 2015; SCAVUZZI et al., 2017; CERDEIRA et al., 2019). Além da enzima KPC, a resistência aos carbapenêmicos pode ser devido à produção de outras enzimas, como as metalo-beta-lactamases (sendo os tipos IMP, VIM e NDM as mais frequentes), e as serino carbapenemases (incluindo como mais comuns as do tipo KPC e GES) (ZHÃO et al., 2012; CABRAL et al., 2017; BARBERINO et al., 2018; PERDERSEN et al., 2018). E apesar de serem detectadas em menor proporção do que KPC, já existem relatos dessas outras carbapenemases em enterobactérias em vários países (DROPA et al., 2010; FIROOZEH et al., 2017; LOHR et al., 2017).

O gene *bla*_{KPC} está frequentemente localizado no transposon Tn4401 (EILERTSON et al., 2019), que tem sido encontrado em uma variedade de plasmídeos transferíveis (PEREIRA et al., 2013; ANDRADE et al., 2011; DALMOLIN et al., 2018;), o que garante a sua dispersão não só entre as espécies de *Klebsiella*, mas entre outros gêneros de bactérias gram-negativas (BELDER et al., 2018). O gene *bla*_{KPC} também pode se encontrar localizado em elementos não-Tn4401 (NTE_{KPC}) (CHEN et al., 2014). Estudo recente de Cerdeira et al. (2019), detectou o gene *bla*_{KPC} inserido no NTE_{KPC}-IId em plasmídeo IncQ1 no Brasil.

Também no Brasil, Andrade et al. (2011), identificaram a presença de *bla*_{KPC-2} inserido nos plasmídeos IncFII, IncN e IncL/M de *K. pneumoniae* em hospitais nos estados de São Paulo e Rio de Janeiro. Adicionalmente, Pereira et al (2013), estudando a epidemiologia de 39 isolados clínicos *K. pneumoniae* produtoras de KPC em 12 estados brasileiros, sendo quatro isolados de Recife-PE, não conseguiram determinar o tipo de Inc responsável pela disseminação de KPC em *K. pneumoniae* proveniente de Recife-PE, Brasil, podendo o número de isolados analisados ser uma limitação do estudo. Conhecendo a variabilidade genética dessa espécie bacteriana (DE SOUZA LOPES et al., 2005; MELO et al., 2014; CABRAL et al., 2015; PEREIRA et al.; 2015; SCAVUZZI et al., 2016; BARBERINO et al.; 2018) e devido à importância epidemiológica no rastreio desses plasmídeos que albergam e disseminam genes de resistência, são necessários estudos que caracterizem os grupos de incompatibilidade plasmidial em um maior número de isolados clínicos provenientes de Recife-PE.

Levando em consideração que os primeiros relatos do gene *bla*_{KPC} em *K. pneumoniae* no Brasil, foram em hospitais de Recife e que esse gene pode ser facilmente disseminado por plasmídeos conjugativos (MONTEIRO et al., 2009; PEREIRA et al., 2013), esse estudo tem por objetivo investigar genes de resistência aos carbapenêmicos (*bla*_{KPC}, *bla*_{GES}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM} e *bla*_{IMP}), Incs plasmidiais mais relatados em *K. pneumoniae* (FIB, Q, A/C, L/M, N, HI2 e HI1B) e analisar a relação clonal de isolados clínicos de *K. pneumoniae* provenientes de Recife-PE, Brasil, entre 2017 e 2018.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Isolados bacterianos

Vinte e sete isolados de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos, provenientes de diferentes pacientes e sítios de infecção ou de colonização (swab retal), foram obtidos da demanda espontânea do laboratório de um hospital público da cidade de Recife-PE, Brasil, durante os anos de 2017 e 2018. A identificação bioquímica dos isolados foi realizada através do sistema automatizado BD PhoenixTM. Os isolados foram mantidos em estoque congelado à -70°C com glicerol a 15%.

2.1 Susceptibilidade antimicrobiana

A concentração inibitória mínima (CIM) para os antimicrobianos: Amicacina (AMI); Amoxicilina-ácido clavulânico (AMC); Ampicilina (AMP); Cefazolina (CFZ); Cefepime (CPM); Cefalotina (CFL); Cefotaxima (CTX); Cefoxitina (CFO); Ceftazidima (CAZ); Ceftriaxona (CRO); Cefuroxima (CRX); Ciprofloxacina (CIP); Colistina (COL); Ertapenem (ERT); Gentamicina (GEN); Imipenem (IMI); Levofloxacina (LEV); Meropenem (MER); Piperacilina-tazobactam (PIPT); Trimetoprim-sulfametaxazol (TRIS), foi determinada através do equipamento automatizado VITEK 2 (bioMérieux). E o perfil de susceptibilidade foi interpretado de acordo com o CLSI (2019).

2.3 Extração de DNA, PCR para os genes de resistência, Incs Plasmidiais e sequenciamento de amplicons

O DNA genômico foi extraído através de kit comercial (Wizard genomic DNA purification - Promega). A PCR foi realizada para detectar os genes de resistência *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{GES}, *bla*_{VIM} e *bla*_{IMP}, usando primers descritos na tabela 2. Para detecção dos Incs plasmidiais, foram utilizados os iniciadores IncA/C, IncL/M, IncN, IncHI2, IncFIB, IncHI1B e IncQ, descritos na tabela 2, por serem grupos de incompatibilidade plasmidial mais descritos na literatura para *K. pneumoniae*. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,0% em tampão TBE (Tris-Borato 0,089M e EDTA 0,002M) e voltagem constante de 100 v. Os géis foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de fotodocumentação (Photocap, Vilber Lourmat). Amplicons

positivos representativos, previamente identificados por PCR, foram purificados e submetidos ao sequenciamento de DNA pelo método de Sanger et al. (1997). As sequências de nucleotídeos foram analisadas pelos programas BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e serão depositadas no genbank.

2.4 Tipagem molecular

Para avaliar a relação clonal dos isolados, foi realizada a ERIC-PCR de acordo com Duan et al. (2009) e Cabral et al. (2012). O padrão de bandas foi analisado de acordo com Tenover et al. 1995 e o software DARWIN 6.0 foi usado para gerar o dendrograma.

Tabela 1 – Primers utilizados na PCR e sequenciamento dos amplicons para detecção de genes para carbapenemases, Incs plasmidiais e ERIC-PCR nos isolados de *K. pneumoniae*.

Gene	Primer	Sequência (5' - 3')	Tem p. ^(a)	Tamanho do amplicon (pb)	Referência
<i>bla</i> _{KPC}	KPC-1a	TGTCAGTGTATCGCCGTC	63°C	800	Yigit et al. (2001)
	KPC-1b	CTCAGTGCTCTACAGAAAACC			
<i>bla</i> _{GES}	GES-F	GAAACCAAACGGGAGACGC	60°C	207	Nordmann (2011)
	GES-R	CTTGACCGACAGAGGCAACT			
<i>bla</i> _{NDM}	NDM-Fm	TAAAATACCTTGAGCGGGC	52°C	439	Nordmann (2011)
	NDM-Rm	AAATGGAAACTGGCGACC			
<i>bla</i> _{VIM}	VIM-F	CAGATTGCCGATGGTGTGTTGG	62°C	600	Dong et al. (2008)
	VIM-R	AGG TGGGCCATTCAGCCAGA			
<i>bla</i> _{IMP}	IMP-F	GGAATAGAG TGG CTTAATTCTC	60°C	232	Dong et al. (2008)
	IMP-R	GTGATGCGTCYCCAAYTTCCT			
HI-2	IncHI-2-F	GGAGCGATGGATTACTTCAGTAC	64°C	644	Caratolli et al. (2005)
	IncHI-2-R	GGCTCACTACCGTTGTCATCCT			
L/M	IncL/M-F	GGATGAAAACCTATCAGCATCTGG	62°C	758	Caratolli et al. (2005)
	IncL/M-R	CTGCAGGGGCGATTCTTTAGG			
A/C	IncA/C-F	GAGAACCAAAGACAAAGACCTA	62°C	465	Caratolli et al. (2005)
	IncA/C-R	ACGACAAACCTGAATTGCCTCCT			
N	IncN-F	GTCTAACGAGCTTACCGAAG	62°C	559	Caratolli et al. (2005)
	IncN-R	GTTTCAACTCTGCCAAGTTC			

HI1B	HI1B-Fw	CAA AAC GAG AGA TAT	63°C	900	Dorted et al. (2012)
	HI1B-Rw	TCAACCC CTG ATT CTT GAT			
		GAT ACA GGG			
FIB	IncFIB-F	GGAGTTCTGACACACGATTTTCG	62°C	702	Caratolli et al. (2005)
	IncFIB-R	CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT			
Q	Ori-V-F	CTCCCGTACTAACTGTCACG	61°C	436	Smalla et al. (2001)
	Ori-V-R	ATCGACCGAGACAGGCCCTGC			
	Rep-B-F	TCGTGGTCGCGTTCAAGGTACG	64°C	1.160	
	Rep-B-R	CTGTAAGTCGATGATCTGGGCGT			
	Ori-T-F	T	63°C	191	
	Ori-T-R	TTCGCGCTCGTTGTTCTTCGAGC			
		GCCGTTAGGCCAGTTTCTCG			
NA	ERIC-1	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAAC	36°C		Duan et al., (2009)
	ERIC-2	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG			

3 RESULTADOS

3.1 Perfil de resistência antimicrobiana

Os antimicrobianos que apresentaram melhor atividade contra os isolados de *K. pneumoniae* foram amicacina (96,2%) e colistina (88,9%). A maioria dos isolados foram resistentes aos três carbapenêmicos testados (ertapenem, imipenem e meropenem), com exceção do isolado K5-A3 que foi sensível ao imipenem e intermediário ao meropenem e do isolado K6-A3 que foi intermediário ao imipenem.

3.2 Genes para beta-lactamases

Os genes *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}* foram detectados em 24 (88,8%) e 16 (59,2%) dos isolados de *K. pneumoniae* respectivamente (Tabela 1), amplificando os fragmentos esperados de 800pb e 621pb, respectivamente. Os genes *bla_{GES}*, *bla_{VIM}* e *bla_{IMP}* não foram detectados em nenhum dos isolados. As variantes *bla_{KPC-2}* e *bla_{NDM-1}* foram confirmadas por sequenciamento do produto de PCR de isolados representativos. Os genes *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}* foram simultaneamente positivos em 13 (48,1%) dos isolados analisados.

3.3 Grupos de Incompatibilidade Plasmidial

Os Incs FIB, Q, A/C, HI1B e L/M foram detectados em 25 (92,6%), 24 (88,8%), 4 (14,8%), 3 (11,1%) e 2 (7,4%) dos isolados de *K. pneumoniae* respectivamente. Os produtos de PCR positivos foram sequenciados para confirmação do Inc. Os Incs N e HI2 não foram detectados em nenhum dos isolados. Dois isolados (K16-A3 e K20-A3) apresentaram somente o IncFIB (tabela 1), no entanto, os outros 25 isolados apresentaram mais de um Inc investigado nesse estudo.

3.4 Tipagem molecular

Foram encontrados entre os 27 isolados de *K. pneumoniae* analisados, 12 perfis genéticos (Figura 1 e 2). Onze isolados foram relacionados com 80% de similaridade (perfil E1a), dentro desse perfil oito isolados foram relacionados com 100% de similaridade (perfil E1), onde quatro isolados apresentaram perfil de resistência idênticos (presença do gene *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}*) e presença dos mesmos Incs plasmidiais (Q e FIB). O perfil E2 agrupou três isolados que foram diferentes tanto no perfil de resistência quanto na presença dos Incs plasmidiais. O perfil E4 agrupou dois isolados que apresentaram perfil de resistência idêntico (apenas o gene *bla_{KPC}* detectado) e Incs plasmidiais (Q, FIB e HI1B). O perfil E7 agrupou três isolados, onde dois isolados foram idênticos tanto no perfil de resistência (gene *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}*) quando na presença de Incs plasmidiais (Q e FIB), um isolado desse perfil apresentou apenas o gene *bla_{KPC}*, porém os mesmos Incs plasmidiais. Os isolados que não foram relacionados clonalmente apresentaram perfil de resistência e presença de Incs plasmidiais distintos.

3.5 Análise comparativa da presença de genes para carbapenemases, Incs e ERIC-PCR, de acordo com a fonte de isolamento: colonização ou infecção

Dos 27 isolados de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos, 12 eram provenientes de infecção (sangue e urina), 14 foram isolados provenientes de colonização (swab retal) e 1 isolado foi proveniente de dreno cavitário (tabela 1). A maioria dos isolados provenientes de infecção que apresentavam o gene *bla_{NDM}*, albergavam também o gene *bla_{KPC}*, com exceção do isolado K16-A3 que albergou somente o *bla_{NDM}*. Analisando os isolados provenientes de colonização, foi observado que seis isolados foram positivos para os genes *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}*, simultaneamente, enquanto sete isolados de infecção apresentaram

concomitantemente esses dois genes. Os Incs FIB, Q, A/C e HI1B foram detectados tanto em isolados de infecção quanto de colonização. O IncL/M foi detectado apenas em dois isolados provenientes de colonização. Os isolados relacionados clonalmente pela ERIC-PCR foram provenientes de pacientes diferentes, de setores hospitalares diferentes e provenientes tanto de colonização quanto de infecção.

Figura 1. Eletroforese em gel de agarose à 1,5% do produto da ERIC-PCR de isolados representativos de *K. pneumoniae*. Linha 1: marcador de peso molecular de 1Kb (promega), linhas 2-17: isolados de *K. pneumoniae*.

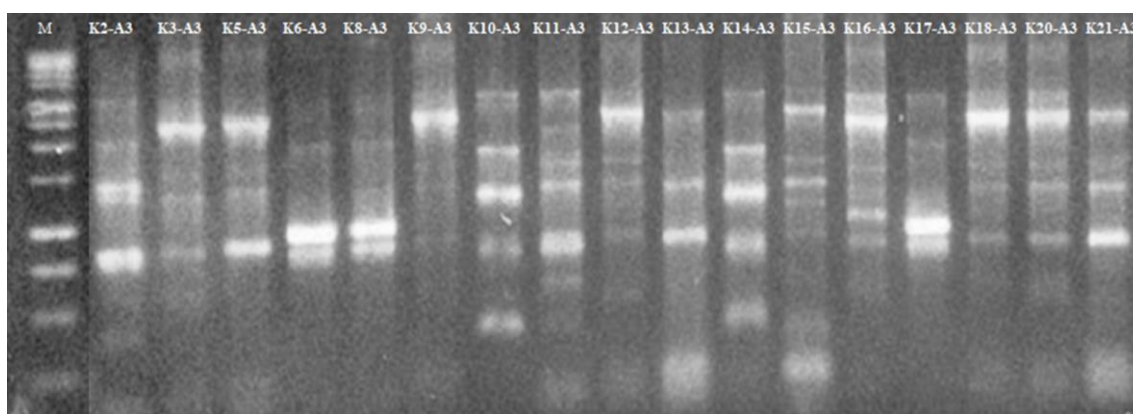
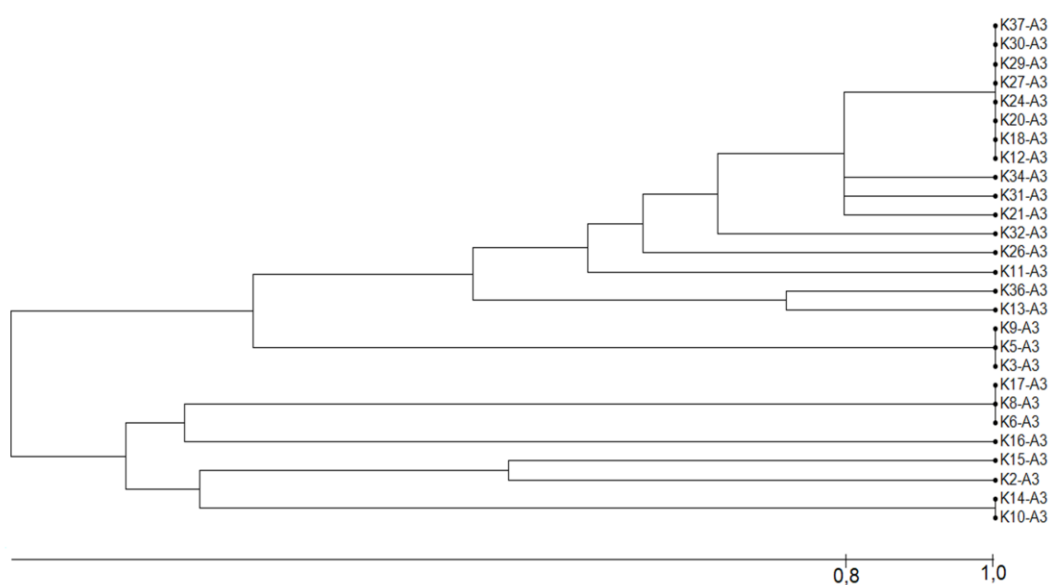


Figura 2. Dendrograma gerado por ERIC-PCR utilizando o software Darwin 6.0, ilustrando a relação dos perfis dos 27 isolados de *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos provenientes de Recife-PE, Brasil.



4 DISCUSSÃO

A maioria dos isolados de *K. pneumoniae* avaliados nesse estudo foram resistentes a todos os beta-lactâmicos testados. Esses dados justificam o alerta publicado pela CDC, desde 2013, mostrando que as enterobactérias produtoras de carbapenemases são uma ameaça mundial urgente, devido às altas taxas de resistência aos antimicrobianos, necessitando de ações urgentes e efetivas para seu controle. No presente estudo, amicacina e colistina foram os antimicrobianos com melhor atividade contra os isolados analisados. Lorenzoni et al. (2017) em estudos com enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos provenientes de um hospital no Rio Grande do Sul, Brasil, detectaram altas taxas de sensibilidade à colistina e à amicacina em isolados de *K. pneumoniae*, sendo o gene *bla_{KPC}* detectado em 80% dos isolados, corroborando com os dados do presente estudo.

A taxa de serino-carbapenemases em *K. pneumoniae* detectada nesse estudo foi de 88,8%, que corresponde à positividade para *bla_{KPC}*, sendo 12 isolados provenientes de infecção e oito provenientes de colonização. Esses dados ressaltam a permanência do gene *bla_{KPC}* em *K. pneumoniae*, que desde a sua detecção em Recife, Brasil, em 2006 (MONTEIRO et al., 2009), continua sendo a principal carbapenemase associada a amostras de *K. pneumoniae* resistentes ao carbapenêmicos em vários estados brasileiros, inclusive em Recife-PE (CABRAL et al., 2015; SCAVUZZI et al., 2017; ALVES et al., 2018; DE OLIVEIRA SANTOS et al., 2018).

Adicionalmente, a presença do gene *bla_{NDM}* nesse estudo merece destaque, pois é o primeiro relato de isolados produzindo NDM-1 em Recife-PE. Desde sua detecção em 2008 em Nova Delhi, na Índia (YONG et al., 2009) cepas produtoras de NDM-1 foram relatadas em muitos países, inclusive no Brasil (CARVALHO et al., 2013, 2014; ROZALES et al., 2017; NAVA et al., 2018; MELGAREJO et al., 2018), e geralmente associadas à disseminação intra e inter-hospitalar, juntamente com as relações epidemiológicas relacionadas a viagens. Barberino et al. (2018), foram os primeiros a relatar o gene *bla_{NDM}* no nordeste brasileiro, em isolados clínicos de *K. pneumoniae* e *Citrobacter* em dois pacientes internados em um hospital público em Salvador, Bahia. Recentemente, Silva et al. (2019), detectaram o gene *bla_{NDM-1}* em diferentes espécies (*K. pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Proteus stuartii*, *P. rettger*, *P. mirabilis*, *Morganella morganii*, *Acinetobacter bereziniae* e *A. baumannii* oriundas de nove estados brasileiros, mas não incluía o estado de Pernambuco.

A taxa de ocorrência do gene *bla_{NDM}* nesse estudo, é similar a do gene *bla_{KPC}*. A concomitância dos genes *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}* merece destaque pelo acúmulo desses mecanismos

genéticos de resistência em uma mesma espécie bacteriana. No Brasil, o acúmulo de determinantes de resistência em *K. pneumoniae* tem sido citado por outros autores. Nava et al. (2018), detectaram a positividade simultânea dos genes *bla*_{NDM}, *bla*_{KPC} e *bla*_{TEM} em isolados clínicos de *K. pneumoniae* em um hospital universitário em Londrina-PR. A presença concomitante de *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM} também em isolados de colonização detectada nesse estudo é preocupante e reforça a necessidade das culturas de vigilância, uma vez que pacientes colonizados são um importante reservatório para a disseminação de mecanismos de resistência dentro do ambiente hospitalar e são a principal porta de entrada para o desenvolvimento de infecção. A OMS (2017) ressalta que a prevenção e controle eficazes de IRAs é a base da ação para combater a resistência bacteriana, sendo a identificação e isolamento do paciente colonizado umas das principais estratégias. Portanto, identificar pacientes colonizados com cepas portadoras desses genes e isolar estes pacientes é uma importante etapa para prevenir a transmissão.

Foi observado no presente estudo que isolados de *K. pneumoniae* que apesar de serem relacionados clonalmente pela ERIC-PCR apresentaram diferentes tipos de plasmídeos e diferentes genes de resistência. Isso pode ocorrer porque a técnica de ERIC-PCR amplifica regiões intergênicas repetitivas do cromossomo bacteriano, não amplificando necessariamente regiões plasmidiais, onde estão localizados a maioria dos genes de resistência. Foi observada disseminação clonal dos isolados em diferentes setores do hospital de estudo e entre pacientes colonizados e infectados, esse dado é importante, pois torna visível o potencial de disseminação da *K. pneumoniae* no ambiente hospitalar.

A persistência dos genes que conferem resistência aos carbapenêmicos se dá pela disseminação clonal dos isolados e principalmente pela dispersão desses genes por meio de plasmídeos conjugativos ou mobilizáveis. No presente estudo, foi detectado cinco tipos de Incs que de acordo com a literatura podem ser responsáveis pela disseminação de *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM} nos isolados de *K. pneumoniae*, pois todos os Incs detectados nesse estudo, já foram descritos albergando genes de resistência, incluindo *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM} (ANDRADE et al., 2011; PEREIRA et al., 2013; PEREIRA et al., 2015; DALMOLIN et al., 2018; MATSUMURA et al., 2018; CERDEIRA et al., 2019). Os Incs FIB e Q foram os plasmídeos mais detectados no presente estudo. Este é o primeiro relato do IncFIB em Recife-PE, Brasil. O IncFIB é um plasmídeo conjugativo que já foi associado a disseminação do gene *bla*_{IMP} em *E. cloacae* no Japão (AOKI et al., 2018), como também reportado na África em isolados de *E. coli* portadores do gene *bla*_{TEM} (SANA et al., 2018), e na Europa, responsáveis pela disseminação de *bla*_{NDM-1}, *bla*_{SHV-12}, *bla*_{CTXM-15} e *bla*_{OXA-1} em *K. pneumoniae* (PASKOVA et al., 2018).

Adicionalmente, o IncFIB já foi relatado por Ruichao et al. (2016), na China, em uma amostra de *E. coli* de origem animal produtora de *mcr-1*. O gene *mcr-1* é disseminado por meio de plasmídeos e confere resistência a polimixina, um dos antibióticos considerados como último recurso para infecções contra bactérias gram-negativas resistentes a múltiplos fármacos. No Brasil, apenas Dalmolin et al. (2018), identificaram um isolado clínico de *K. pneumoniae* portadora dos genes *mcr 1*, inserido no plasmídeo IncX4 e *bla*_{KPC-2} inserido no plasmídeo IncFIB.

O segundo Inc mais detectado nos isolados de *K. pneumoniae* foi o IncQ, plasmídeo que vem ganhando destaque em algumas regiões do Brasil, albergando genes de resistência aos carbapenêmicos. Nicoletti et al. (2015), identificaram o gene *bla*_{BKC} inserido em um plasmídeo IncQ em *K. pneumoniae*. Recentemente, Cerdeira et al (2019) no Brasil, detectaram dois isolados de *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos portadores de *bla*_{KPC} inseridos em plasmídeos IncQ. Segundo Smalla et al. (2000), O IncQ é um plasmídeo pequeno que pode variar entre 5.1- 14.2 kb, que pode ser encontrado em diversas células bacterianas hospedeiras e não é conjugativo, mas é mobilizável e promíscuo, podendo ser transferido de uma bactéria para outra por plasmídeos conjugativos presentes na mesma célula bacteriana. Tendo em vista a variabilidade plasmidial, inclusive de plasmídeos conjugativos, detectada no presente estudo nos isolados de *K. pneumoniae*, provavelmente o IncQ pode ser facilmente disseminado para outras espécies, como também possuir um importante papel na potencialização da disseminação do gene *bla*_{KPC} no Brasil (Cerdeira et al., 2019)

Os Incs A/C e L/M apesar de serem detectados em um menor número de isolados no presente estudo, já foram descritos carreando genes de resistência em diferentes espécies de enterobactérias no Brasil, inclusive em *K. pneumoniae* (Andrade et al. 2011). Pereira et al. (2015), no Rio de Janeiro, detectaram a presença simultânea dos genes *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM} em *E. hormaechei*, sendo o *bla*_{NDM} inserido no IncA/C. Entretanto, apenas um estudo investigou Incs em isolados de *K. pneumoniae* provenientes de Recife-PE, Brasil, porém os plasmídeos não foram tipados, podendo o número de isolados analisados (apenas três) ter sido uma limitação do estudo (Pereira et al., 2013).

Outro plasmídeo detectado no presente estudo foi o IncHI1B. Pelo nosso conhecimento, esse é o primeiro relato do IncHI1B no Brasil. Esse plasmídeo conjugativo já foi relatado em isolados clínicos de *E. cloacae*, *K. pneumoniae*, *E. coli* e *C. freundii* portadores do gene *bla*_{NDM} em hospitais dos Estados Unidos da América (SONNEVEND et al., 2013). Adicionalmente, Al Baloushi et al. (2018), também detectaram isolados de *K. pneumoniae* carreando *bla*_{NDM} em IncHI1B na Arábia. Matsumura et al.

(2018), realizando experimento de conjugação e transformação em isolados provenientes de programas de vigilância, identificaram o gene *bla_{VIM}* em plasmídeos IncL/M, IncN2, IncHI1B e IncFIB em *K. pneumoniae* provenientes da Grécia e Espanha. Esses trabalhos mostram a capacidade do IncHI1B em albergar genes para carbapenemases em diferentes espécies.

Podemos concluir que o acúmulo de determinantes de resistência e a variabilidade de Incs plasmidiais detectados nesse estudo, tanto nos isolados de *K. pneumoniae* provenientes de infecção quanto de colonização, juntamente com a disseminação clonal desses isolados, demonstram a capacidade dessa espécie em adquirir genes de resistência, bem como disseminá-los com mais facilidade, tendo em vista o arsenal de plasmídeos conjugativos e mobilizáveis que esses isolados apresentaram. Deve-se destacar a importância da identificação fenotípica e genética precoce de mecanismos de resistência em isolados bacterianos não somente de infecção, mas também e principalmente de colonização, por serem o principal fator que favorecem o desenvolvimento de infecção nos pacientes imunodeprimidos hospitalizados

Tabela 1. Fonte de isolamento primário (colonização, infecção e dreno cavitário), concentração inibitória mínima (CIM) para ertapenem, imipenem, meropenem, genes para carbapenemases, Incs plasmidiais e perfil de ERIC-PCR de isolados de *K. pneumoniae* provenientes de um hospital de Recife-PE, Brasil.

Isolados	Setor	Tipo de amostra	CIM(ERT)	CIM(IMI)	CIM(MER)	Genes de resistência	Incs	ERIC-PCR
K5-A3	UTI	Dreno cavitário	>4(R)	<=1(S)	2(I)	<i>bla_{KPC}</i>	Q, FIB	E7
K6-A3	UCO2	Sangue	>4(R)	2(I)	4(R)	<i>bla_{KPC}</i>	Q, FIB	E2
K8-A3	UTI	Urina	>4(R)	>8(R)	>8(R)	<i>bla_{KPC}, bla_{NDM}</i>	Q, FIB	E2
K9-A3	EG	Sangue	>4(R)	>8(R)	>8(R)	<i>bla_{KPC}, bla_{NDM}</i>	Q, FIB	E7
K10-A3	UTI	Sangue	>4(R)	>8(R)	>8(R)	<i>bla_{KPC}</i>	Q, FIB, HI1B	E4
K11-A3	UCO1	Sangue	>4(R)	8(R)	4(R)	<i>bla_{KPC}</i>	Q, HI1B	E12
K12-A3	UTI	Sangue	>4(R)	>8(R)	>8(R)	<i>bla_{KPC}, bla_{NDM}</i>	Q, FIB	E1
K16-A3	Cardiologia	Urina	>4(R)	>8(R)	>8(R)	<i>bla_{NDM}</i>	FIB	E3
K24-A3	UTI	Urina	>4(R)	>8(R)	>8(R)	<i>bla_{KPC}, bla_{NDM}</i>	Q, FIB, A/C	E1
K26-A3	EG	Urina	>4(R)	8(R)	4(R)	<i>bla_{KPC}, bla_{NDM}</i>	Q, FIB	E11
K27-A3	CM	Urina	>4(R)	>8(R)	>8(R)	<i>bla_{KPC}, bla_{NDM}</i>	Q, FIB	E1
K30-A3	UCO1	Sangue	>4(R)	>8(R)	>8(R)	<i>bla_{KPC}, bla_{NDM}</i>	Q, FIB	E1
K31-A3	UTI	Urina	>4(R)	>8(R)	>8(R)	<i>bla_{KPC}</i>	FIB, A/C	E1a
K2-A3	Cardiologia	Swab retal	>4(R)	(R)	(R)	<i>bla_{KPC}</i>	Q, FIB, L/M	E5
K3-A3	UCO2	Swab retal	>4(R)	>8(R)	>8(R)	<i>bla_{KPC}, bla_{NDM}</i>	Q, FIB	E7
K13-A3	UCO1	Swab retal	>4(R)	>8(R)	>8(R)	<i>bla_{KPC}</i>	Q, FIB, A/C	E10
K14-A3	UCO2	Swab retal	>1(R)	>8(R)	>32(R)	<i>bla_{KPC}</i>	Q, FIB, HI1B	E4
K15-A3	Cardiologia	Swab retal	>1(R)	>8(R)	>32(R)	<i>bla_{KPC}</i>	Q, FIB	E6
K17-A3	UTI	Swab retal	>4(R)	>8(R)	>8(R)	<i>bla_{KPC}, bla_{NDM}</i>	Q	E2
K18-A3	UCO1	Swab retal	>4(R)	>8(R)	>8(R)	<i>bla_{KPC}</i>	Q, FIB	E1
K20-A3	UCO1	Swab retal	>4(R)	>8(R)	>8(R)	<i>bla_{NDM}</i>	FIB	E1
K21-A3	Cardiologia	Swab retal	>4(R)	>8(R)	>8(R)	<i>bla_{KPC}</i>	Q, FIB, A/C	E1a

K29-A3	UCO	Swab retal	>4(R)	>8(R)	>8(R)	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{NDM}	Q, FIB	E1
K32-A3	UTI	Swab retal	>4(R)	>8(R)	>8(R)	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{NDM}	Q, FIB	E8
K34-A3	UTI	Swab retal	>4(R)	>8(R)	>8(R)	<i>bla</i> _{NDM}	Q, FIB	E1a
K36-A3	UCO2	Swab retal	>4(R)	>8(R)	>8(R)	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{NDM}	Q, FIB, L/M	E9
K37-A3	UTI	Swab retal	>4(R)	>8(R)	>8(R)	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{NDM}	Q, FIB	E1

K, *Klebsiella pneumoniae*; EG, Emergência Geral; CM, Clínica Médica; UTI, Unidade de tratamento intensivo; UCO, Unidade coronariana; CIM, Concentração Inibitória Mínima; ERT, Ertapenem, IMI, Imipenem, MER, Meropenem, R, Resistente; I, Intermediário; S, Sensível; +, presença do gene; -, ausência do gene; Texto sombreado: isolados clínicos provenientes de colonização.

REFERÊNCIAS

- AL-BALOUSHI, A.E.; et al. Genetic support of carbapenemases in double carbapenemase producer *Klebsiella pneumoniae* isolated in the Arabian Peninsula. **Acta Microbiologica et immunologica Hungarica**, v. 23, p. 1-16, 2018.
- ALVES, D. P.; et al. *Enterobacter cloacae* harbouring *bla*_{KPC-2} and *qnrB-1* isolated from a cystic fibrosis patient: a case report. **New Microbes New Infect.** v, 25, p. 49-51, 2018.
- 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 Chemother.** v. 55, p. 3579-3583, 2011.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. Brasília, 29 de Janeiro de 2019. [Internet]. Disponível em: https://clsi.org/media/2663/m100ed29_sample.pdf
- AOKI, K.; HARADA, S.; YAHARA, K. et al. Molecular Characterization of IMIP-1-producing *Enterobacter cloacae* complex isolates in Tokyo. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. V, 62(3). 2018.
- BARBERINO, M. G.; et al. Isolation of bla_{NDM}-producing Enterobacteriaceae in a public in Salvador, Bahia, Brazil. **The Brazilian Journal of infectious diseases**. v. 17, p. 30-32, 2018.
- BELDER, D.; et al. Genetic diversity of KPC-producing *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia marcescens* and *Citrobacter freundii* isolates from Argentina. **Microbial Drug Resistance**. v, 24(7). p, 958-965, 2018.
- BORER, A.; et al. Risk factors for developing clinical infection with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in hospital patients initially only colonized with carbapenem resistant *K. pneumoniae*. **American Journal Infection Control**, v.40, p. 421-5, 2012.
- CABRAL, A. B, et al. Detection of *bla*_{KPC-2} in *Proteus mirabilis* in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, (1), p. 94-95, 2015.
- CABRAL, A. B.; et al. Clonal spread and accumulation of β -lactam 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**, v. 66, p. 70-77, 2017.
- CABRAL, A. B.; et al. Multidrug resistance genes, including *bla*_{KPC} and *bla*_{CTX-M-2}, among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45(5), p.572-578, 2012.
- CARATOLLI, A. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. **Antimicrobial Agents Chemother.** V, 53(6). P, 2227-2238, 2009.

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

CARVALHO-ASSEF, A. P. D.; et al. Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. **J. Antimicrob. Chemother**, v. 68, p. 2956–2957, 2013.

CARVALHO-ASSEF, A. P. et al .Detection of NDM-1-, CTX-M-15-, and qnrB4-producing *Enterobacter hormaechei* isolates in Brazil. **Antimicrobial Agents Chemother**, v. 58, p. 2475–2476, 2014.

CERDEIRA, L. T.; et al. Small IncQ-1 and Col-like Plasmids Harboring *bla*_{KPC-2} and non-Tn4401 Elements (NTE_{kpc-1ld}) in high-risk lineages of *Klebsiella pneumoniae* CG258. **Antimicrobial Agents Chemother**. 2019.

CHEN, L.; et al. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: molecular and genetic decoding. **Trends in Microbiology**. v, 22(12). p, 686–696, 2014.

DA SILVA, I. R.; et al. Distribution of Clinical NDM-1-Producing Gram-Negative Bacteria in Brazil. **Microbial Drug Resistance**. v. 0, 2019.

DALMOLIN, T. V.; et al. Acquisition of the *mcr-1* gene by a high-risk clone of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST437/CC258, Brazil. **Diagnostic Microbiology na Infectious Disease**. V, 90(2). P, 132-133, 2018.

DE OLIVEIRA SANTOS, I. C.; et al. Draft genome sequence of KPC-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* recovered from a bloodstream infection sample in Brazil. **Jornal of Global Antimicrobial Resistance**. v, 15. p, 99-100, 2018.

DE SOUZA LOPES, A. C.; et al. Molecular typing of *Klebsiella pneumoniae* isolates from public hospitals in Recife, Brazil. **Microbiological Research**. v, 160(1). p, 37-46, 2005.

DONG, F.; et al. Characterization of multidrug-resistant and metallo-betalactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a paediatric clinic in China. **Chinese Medical Journal**, v.121, p.1611-1616, 2008.

DORTET, L.; et al. NDM-1, OXA-48 and OXA-181 carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Sultanate of Oman. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 18, p. 144-148, 2012.

DROPA, M.; et al. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carrying the novel extended-spectrum β -lactamase gene variants *bla*_{SHV-40}, *bla*_{TEM-116} and the class 1 integron-associated *bla*_{GES-7} in Brazil. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16(6), p. 630-632, 2010.

DUAN, H.; et al. Source identification of airborne *Escherichia coli* of swine house surroundings using ERIC-PCR and REP-PCR. **Environmental Research**, v.109, p.511-517, 2009.

EILERTSON, B.; et al. CG258 *Klebsiella pneumoniae* isolates without β -lactam resistance at the onset of the carbapenem-resistant Enterobacteriaceae epidemic in New York City. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 74(11), p. 17-21, 2019.

FIROOZEH, F.; et al. New Delhi metallo- β -lactamase-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in hospitalized patients in Kashan, Iran. **Iran Journal Microbiology**. v. 9(5), p. 283-287, 2017.

FORDE, B. M.; et al. Discovery of mcr-1-mediated colistin resistance in a highly virulent *Escherichia coli* lineage. **American Society for Microbiology**. V, 3(5). P, 36-38, 2018.

KUNTAMAN, K.; et al. Occurrence and characterization of carbapenem-resistant Gram-negative bacilli: A collaborative study of antibiotic-resistant bacteria between Indonesia and Japan. **International Journal of Urology**. V. 10, p. 13787, 2018.

LOHR, B.; et al. High prevalence of multidrug-resistant bacteria in Libyan war casualties admitted to a tertiary care hospital, Germany. **Microb. Drug Resist.** v, 24(5). p, 578-584. 2017.

LORENZONI, V. V.; et al. Evaluation of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in a tertiary-level reference hospital in Rio Grande do Sul, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. V, 50. P, 5, 2017.

MARGATE, E.; et al. KPC-producing *Serratia marcescens* in a home-care patient from Recife, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical Sao Paulo**, v. 57, (4), p. 359–360, 2015.

MATSUMURRA, Y.; et al. Genomic characterization of IMP and VIM carbapenemase-encoding transferable plasmids of Enterobacteriaceae. **Journal Antimicrobial Chemother.** v, 73(11). p, 3034-3038, 2018.

MELGAREJO, J. L.; et al. Identification, molecular characterization, and structural analysis of the blaNDM-1 gene/enzyme from NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates. v. 72(3), p. 155-163, 2018. **The Journal of Antibiotics**.

MELO, R. C. A.; et al. Presence of *fimH*, *mrkD* and *irp2* virulence genes in KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Recife-PE, Brazil. **Current Microbiology** v, 69 (6), p. 824-831, 2014.

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.

MULVEY, M.R.; et al. Characterization of a colistin-resistant *Salmonella enterica* 4,[5],12:i:- harbouring mcr-3.2 on a variant IncHI-2 plasmid identified in Canada. **Journal of Medical Microbiology**. V, 67(12), p. 1673-1675, 2018.

NAVA, R. G.; et al. New sequence type in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* harboring the blaNDM-1-encoding gene in Brazil. **International Journal Infectious diseases**. v, 79, p-101-103, 2018.

NICOLETTI, A. G.; et al. Characterization of BKC-1 class A carbapenemase from *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in Brazil. **Antimicrobial Agents Chemother.** V, 59(9). P, 5159-5164, 2015.

NODARI, S. C.; et al. Draft genome sequence of a GES-5- producing *Serratia marcescens* isolated in southern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, p. 191-192, 2017.

NORDMANN, P.; NAAS, T.; POIREL, L. Global Spread of Carbapenemase producing Enterobacteriaceae. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 10, p. 1791, 2011.

PASKOVA, V.; et al. Characterization of NDM-Enconding plasmids from Enterobacteriaceae recoverd from Czech hospitals. *Frontiers in Microbiology*. V, 9. P, 1549, 2018.

PEDERSEN, T.; et al. Spread of plasmid-encoded NDM-1 and GES-5 carbapenemases among extensively drug-resistant and pandrug-resistant clinical Enterobacteriaceae in Durban, South Africa. **Antimicrobial Agents Chemother.** V, 62(5). 2018.

PEREIRA, P. S.; et al. Coproduction of NDM-1 and KPC-2 in *Enterobacter hormaechei* from Brazil. *Microbial Drug Resistance*. V, 21(2). P, 234-236, 2015.

PEREIRA, P. S; et al. Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: spread of clonal complex 11 (ST11, ST437 and ST340). **Journal Antimicrobial Chemother.** v. 68, p. 312-316, 2013.

POIREL et al. A novel IncQ plasmid type harbouring a class 3 integron from *Escherichia coli*. **Jornal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 65.n. 5. p. 1594–1598. 2009.

ROZALES, F. P.; et al. Emergence of NDM-1-producing *Enterobacteriaceae* in Porto Alegre, Brazil. **Int J InfectDis**. v. 25, p. 79–81, 2014.

ROZALES, F. P.; et al. Characterization of transformants obtained from NDM-1-producing Enterobacteriaceae in Brazil. **Infection Control & Hospital Epodemiology**. V, 38(5), p, 634-636, 2017.

RUICHÃO, L.; et al. Complete genetic analysis of plasmids carrying mcr-1 and other resistance genes in an *Escherichia coli* isolate of animal origin. *Journal of Antimicrobia Chemotherapy*. V, 72. P, 696–699, 2016.

SANA, F.; et al. *Escherichia coli* colonizing healthy children in Tunisia: High prevalence of extra-intestinal pathovar and occurrence of non-extended-spectrum- β -lactamase-producing ST131 clone. **International Journal of Antimicrobial Agents**. V, 52. P, 878-885, 2018.

SANTERRE H. A, et al. Susceptibility to ceftobiprole of respiratory-tract pathogens collected in the United Kingdom and Ireland during 2014-2015. **Infect Drug Resist.** V. 11. P, 1309-1320, 2018.

SCAVUZZI, A. M. et al. Ultrastructural changes caused by polymyxin B and meropenem in multiresistant *Klebsiella pneumoniae* carrying *blaKPC-2* gene, **Journal of Medical Microbiology**, v.65, p. 1–8, 2016.

SCAVUZZI, A. M.; et al. Ultrastructural changes caused by polymyxin B and meropenem in multiresistant *Klebsiella pneumoniae* carrying *bla*_{KPC-2} gene. **Microbiology society**. v. 65(12), p. 1370-1377, 2017.

SMALLA et al. Exogenous Isolation of Antibiotic Resistance Plasmids from Piggery Manure Slurries Reveals a High Prevalence and Diversity of IncQ-Like Plasmids. **Applied and environmental microbiology**. 2000; v. 66, n. 11. p. 4854–4862.

SONNEVEND, A.; et al. Emergence and spread of NDM-1 producer Enterobacteriaceae with contribution of IncX3 plasmids in the United Arab Emirates. **Journal of Medical Microbiology**. V, 62. P, 1044-1050, 2013.

TAVARES, C. P.; et al. P. Molecular epidemiology of KPC-2-producing Enterobacteriaceae (non-*Klebsiella pneumoniae*) isolated from Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, V.82, P.326-330, 2015.

TENOVER, F.C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **American Journal of Medicine**. v. 119, p. 3-10, 2006.

TUON, F. F.; et al. KPC-producing *Enterobacter aerogenes* infection, **The Brazilian Journal of Infectious diseases**, v.19(3), p. 324-327, 2015.

YIGIT, H.; et al. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 4, p. 1151-1161, 2001.

YONG, D.; et al. Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, blaNDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 12, p. 5046-5054, 2009.

ZHAO, Z. C.; et al. Fecal carriage of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in a Chinese university hospital. **American journal of infection control**, v. 42, p. 61-64, 2014.

6 CONCLUSÕES

- Os antimicrobianos de melhor atividade contra os isolados de *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos provenientes de um hospital público de Recife-PE, foram amicacina e colistina;
- Esse estudo confirma a persistência de *bla*_{KPC} em *K. pneumoniae* em Recife-PE, como também a emergência de *bla*_{NDM}. Adicionalmente, a positividade para ambos os genes, tanto nos isolados provenientes de infecção quanto de colonização, mostram o acúmulo de genes de resistência aos carbapenêmicos, como também a importância de culturas de vigilância no paciente hospitalizado e o isolamento de pacientes colonizados para prevenir a transmissão dessa espécie bacteriana e seus genes;
- Esse é o primeiro estudo que consegue tipar uma variedade de plasmídeos (IncQ, IncFIB, IncA/C, IncL/M e IncHI1B) em isolados *K. pneumoniae* provenientes de Recife-PE, mostrando a alta variabilidade plasmidial desses isolados. Ressaltando que esses plasmídeos estavam presentes tanto em isolados de infecção quanto de colonização, indicando o potencial da transmissão desses plasmídeos entre diferentes isolados bacterianos.
- Foi observada disseminação clonal dos isolados em diferentes setores do hospital de estudo e entre pacientes colonizados e infectados, esse dado mostra a capacidade de disseminação da *K. pneumoniae* no ambiente hospitalar, sendo necessário o desenvolvimento de estratégias que possam reduzir a entrada e propagação de enterobactérias resistentes nos hospitais e UTIs.

6.1 Divulgação dos dados obtidos

A presença dos genes *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM} detectada por PCR e sequenciamento dos amplicons nos 27 isolados de *K. pneumoniae* analisados, bem como a relação clonal pela ERIC-PCR, técnicas não realizadas nos hospitais, foram divulgadas periodicamente ao laboratório de análises clínicas e a CCIH do hospital público em estudo, para conhecimento do perfil molecular dessas bactérias e a adoção de medidas de prevenção e controle da resistência bacteriana.

REFERÊNCIAS

- AGEL, A. A.; et al. Characterization of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae from patients in Amman, Jordan. **Microbial Drug Resistance**. v, 24(8), p. 1121-1127, 2018.
- AIRES, C. A.; et al. Multiclonal Expansion of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing NDM-1 in Rio de Janeiro, Brazil. **Antimicrobial Agents Chemother**. V. 61, p. 32-35, 2017.
- AL-BALOUSHI, E. A.; et al. Genetic support of carbapenemases in double carbapenemase producer *Klebsiella pneumoniae* isolated in the Arabian Peninsula. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*. v, 65(2). p, 135-150, 2018.
- ALVES, D. P.; et al. *Enterobacter cloacae* harbouring *bla*_{KPC-2} and *qnrB-1* isolated from a cystic fibrosis patient: a case report. **New Microbes New Infect**. v, 25, p. 49-51, 2018.
- AMBLER, P. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. **Biochemical Journal**, London, v. 276 (pt-1). p. 269-270. 1991.
- 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 Chemother**. v. 55, p. 3579-3583, 2011.
- ANES, J.; HURLY, M.; FANNING, S. Exploring the genome and phenotype of multi-drug resistant *Klebsiella pneumoniae* on clinical origin. **Frontiers in microbiology**. v. 8, p. 1-15, 2017.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 14: Avaliação dos indicadores nacionais das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e Resistência microbiana do ano de 2015**. Brasília, 30 de dezembro de 2016. [Internet]. Disponível em: <https://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/publicacoes/item/boletim-de-seguranca-do-paciente-e-qualidade-em-servicos-de-saude-n-13-avaliacao-dos-indicadores-nacionais-das-infecoes-relacionadas-a-assistencia-a-saude-iras-e-resistencia-microbiana-do-ano-de-2015>
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Nota técnica nº 01/2013 medidas de prevenção e controle de infecções por enterobactérias multiresistentes**. Brasília, 17 de abril de 2013. [Internet]. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33852/271858/Nota+t%C3%A9cnica+n%C2%BA+01+de+2013/5be89853-7eca-4b4b-98e4-5096b9f5a2ec>.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Plano Nacional para a Prevenção e o Controle da Resistência Microbiana nos Serviços de Saúde**. Brasília, 15 de maio de 2017. [Internet]. Disponível em: <https://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/publicacoes/item/plano-nacional-para-a-prevencao-e-o-controle-da-resistencia-microbiana-nos-servicos-de-saude>
- ANVISA. **Comunicação de Risco Nº 001/2013 - GVIMS/GGTES-ANVISA - Circulação de micro-organismos com mecanismo de resistência denominado "New Delhi"**

"Metalobetalactamase" ou NDM no Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2013b.

ANVISA. Nota Técnica Nº 01/2013 - **Medidas de prevenção e controle de infecções por enterobactérias multiresistentes.** Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2013a.

AOKI, K.; HARADA, S.; YAHARA, K. et al. Molecular Characterization of IMIP-1-producing *Enterobacter cloacae* complex isolates in Tokyo. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. V, 62(3). 2018.

AREND, L. N. V. S. Caracterização molecular, fenotípica e epidemiológica de micro-organismos produtores de carbapenemase KPC isolados no Estado do Paraná. 2014. 68 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Interna), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

AZEVEDO, S.M.M. **Farmacologia dos Antibióticos Betalactâmicos.** Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Ciências da Saúde - Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2014.

BALELO, P. S.; et al. Detection of blaVIM-7 in an extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate belonging to ST1284 in Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. V, 89(1), p. 80-82, 2017.

BARANIAK, A.; et al. Multiregional dissemination of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* ST258/ST512 genotypes in Poland, 2010-14. **Journal Antimicrobiology Chemother.** v. 72, p. 1610-1616, 2017.

BARBERINO, M. G.; et al. Isolation of blaNDM-producing Enterobacteriaceae in a public in Salvador, Bahia, Brazil. **The Brazilian Journal of infectious diseases**. v. 17, p. 30-32, 2018.

BELDER, D.; et al. Genetic diversity of KPC-producing *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia marcescens* and *Citrobacter freundii* isolates from Argentina. **Microbial Drug Resistance**. v, 24(7). p. 958-965, 2018.

BORER, A.; et al. Risk factors for developing clinical infection with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in hospital patients initially only colonized with carbapenem resistant *K. pneumoniae*. **American Journal Infection Control**, v.40, p. 421-5, 2012.

BRINK, A.J. et al. Emergence of New Delhi Metallo-Beta-Lactamase (NDM-1) and *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC-2) in South Africa. **Journal Of Clinical Microbiology**, Africa, v. 2, n. 50, p.525-527, 23 nov. 2011.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of β -lactamases. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.54, p.969-976, 2010.

CABRAL, A. B.; et al. Detection of bla_{KPC-2} in *Proteus mirabilis* in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, (1), p. 94-95, 2015.

CABRAL, A. B.; et al. Clonal spread and accumulation of β -lactam 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**, v. 66, p. 70-77, 2017.

CABRAL, A. B.; et al. Multidrug resistance genes, including *bla*_{KPC} and *bla*_{CTX-M-2}, among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45(5), p.572-578, 2012.

CALIA, C.; et al. Carbapenemases-producing *Klebsiella pneumoniae* in hospitals of two regions of Southern Italy. **Journal of pathology, microbiology and immunology**. V. 125, p. 491-498, 2017.

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 (4), p. 1237–1243, 2002.

CARATOLLI, A. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. **Antimicrobial Agents Chemother.** V, 53(6). P, 2227-2238, 2009.

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

CARNEIRO, M.; et al. New carbapenases in Brazil. **Expert Rev Anti Infect Ther.** v. 12, p. 155–156, 2014.

CARRARA, M. F. E.; et al. Emergence and spread of KPC-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a Brazilian teaching hospital. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**.v. 3, p. 304-306, 2015.

CASTANHEIRA, M.; et al. Emergence of the Extended-Spectrum β -Lactamase GES-1 in a *Pseudomonas aeruginosa* Strain from Brazil: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48(6), p. 2344-2345, 2004b.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. ANTIBIOTIC RESISTANCE THREATS in the United States, 2013. [Internet]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>

CERDEIRA, L. T.; LAM, M. M. C.; WYRES, R. R.; Small IncQ-1 and Col-like Plasmids Harboring *bla*_{KPC-2} and non-Tn4401 Elements (NTE_{kpc-1ld}) in high-risk lineages of *Klebsiella pneumoniae* CG258. **Antimicrobial Agents Chemother.** 2019.

CERQUEIRA, G.C. Multi-institute analysis of carbapenem resistance reveals remarkable diversity, unexplained mechanisms, and limited clonal outbreaks, vol. 114, n. 5, p. 1135-1140, 2017.

CHANG, M. R.; et al. The first report of infection with *Klebsiella pneumoniae* carrying the *bla*(*kpc*) gene in State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 46, p. 114-5, 2013.

CHAPARRO, P. J. P. Complete Nucleotide Sequences of Two blaKPC-2-Bearing IncN Plasmids Isolated from Sequence Type 442 *Klebsiella pneumoniae* Clinical Strains Four Years Apart. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 58. n. 05. p. 2958-2960. 2014.

CHEN, L. R.; et al. Detection of plasmid-mediated IMP-1 metallo- β -lactamase and quinolone resistance determinants in an ertapenem-resistant *Enterobacter cloacae* isolate. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 10(5), p.348-354, 2009.

CHEN, L.; et al. Complete nucleotide sequence of a blaKPC harboring IncL2 plasmid and its dissemination in New Jersey and New York hospitals. **Antimicrobial Agents Chemother.** v, 10(57). p. 5019-5022, 2013.

CHEN, L.; et al. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: molecular and genetic decoding. **Trends in Microbiology**. v, 22(12). p. 686–696, 2014.

CHMELNITSKY, I. et al. Plasmid-mediated qnrB2 and carbapenemase gene *bla*_{KPC-2} carried on the same plasmid in carbapenem-resistant ciprofloxacin-susceptible *Enterobacter cloacae* isolates. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v, 52 (8), p. 2962–2965, 2008.

CUNHA, M. P. V.; et al. Pandemic extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) clonal group O6-B2-ST73 as a cause of avian colibacillosis in Brazil. **PLoS One**. 12(6), p. 8, 2017.

CUZON, G. et al. Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produce beta-lactamase blaKPC-2 gene. **Emerging Infectious Diseases**. v. 16, n. 9, p. 1349-1356, 2010.

DA SILVA, I. R.; et al. Distribution of Clinical NDM-1-Producing Gram-Negative Bacteria in Brazil. **Microbial Drug Resistance**. v. 0, 2019.

DALMOLIN, T. V.; et al. Acquisition of the mcr-1 gene by a high-risk clone of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST437/CC258, Brazil. **Diagnostic Microbiology na Infectious Disease**. V, 90(2). P, 132-133, 2018.

DE CÁSSIA ANDRADE MELO, R. et al. Presence of fimH, mrkD, and irp2 virulence genes in KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Recife-PE, Brazil. **Current Microbiology**, v.69(6), p.824-831, 2014.

DE OLIVEIRA SANTOS, I. C.; et al. Draft genome sequence of KPC-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* recovered from a bloodstream infection sample in Brazil. **Jornal of Global Antimicrobial Resistance**. v, 15. p, 99-100, 2018.

DE SOUZA DA SILVA, A.P.; et al. *Escherichia coli* sequence type 73 as a cause of community acquired urinary tract infection in men and women in Rio de Janeiro, Brazil. **Diagnostic Microbiology & Infectious Disease**. V. 88(1), p. 69-74, 2017.

DELPHINE, G.; et al. Promoter characterization and expression of the blaKPC-2 gene in *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 72, p. 1597-1601, 2017.

- DIANCOURT, L.; et al. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. **Journal Clinical Microbiology** 43(8): p.4178-82. 2005.
- DIXON, N. et al. IMP-27, a Unique Metallo- β -Lactamase Identified in Geographically Distinct Isolates of *Proteus mirabilis*. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 60, n. 10, p. 6418–6421, 2016.
- DOCQUIER, J. D. et al. IMP-12, a new plasmid-encoded metallo-beta-lactamase from a *Pseudomonas putida* clinical isolate. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 47, n. 5, p. 1522–8, 2003.
- DOMENICO, P.; et al. Rapid plasmid DNA isolation from mucoid Gram-negative bacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, v.30, p.2859-2863, 1992.
- DONG, F.; et al. Characterization of multidrug-resistant and metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a paediatric clinic in China. **Chinese Medical Journal**, v.121, p.1611-1616, 2008.
- DORTET, L.; et al. NDM-1, OXA-48 and OXA-181 carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Sultanate of Oman. **Clinical Microbiology and Infection.** v. 18, p. 144-148, 2012.
- DROPA, M.; et al. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carrying the novel extended-spectrum β -lactamase gene variants *bla*_{SHV-40}, *bla*_{TEM-116} and the class 1 integron-associated *bla*_{GES-7} in Brazil. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16(6), p. 630-632, 2010.
- DUAN, H.; et al. Source identification of airborne *Escherichia coli* of swine house surroundings using ERIC-PCR and REP-PCR. **Environmental Research**, v.109, p.511-517, 2009.
- EILERTSON, B. et al. CG258 *Klebsiella pneumoniae* isolates without β -lactam resistance at the onset of the carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* epidemic in New York City. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy.** v. 74(11), p. 17-21, 2019.
- ESCOBAR P. J.A.; et al. Outbreak of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal unit in Colombia. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 57, p. 1957–1960, 2013.
- FEIZABADI, M. M.; et al. Phenotypic characterization and plasmid analysis of *Klebsiella pneumoniae* strains from Iranian patients **R. Ci. méd. biol., Salvador**, v.7, p.273-279, 2008.
- FERNANDES, R.; AMADOR, P. E PRUDÊNCIO, C. β -Lactams: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance. **Reviews in Medical Microbiology.** v.24, p.7-17, 2013.
- FIGUEIRAL, A. C. D.; FARIA, M. G. I. *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase: an unsolvable problem? **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 9, n. 1, p. 45-48, 2015.

FIROOZEH, F.; et al. New Delhi metallo- β -lactamase-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in hospitalized patients in Kashan, Iran. **Iran Journal Microbiology**. v. 9(5), p. 283-287, 2017.

FONSECA, L. É.; et al. Emergence of blaGES-5 in clinical colistin-only-sensitive (COS) *Pseudomonas aeruginosa* strain in Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. V.59, p. 576-577, 2007.

FORDE, B. M.; et al. Discovery of mcr-1-mediated colistin resistance in a highly virulent *Escherichia coli* lineage. **American Society for Microbiology**. V, 3(5). P, 36-38, 2018.

FROST, L., et al. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. **Nature Reviews Microbiology**. V.3. p. 722–732. 2005.

GAIBANI, P.; et al. Characterization of na IncL/M plasmid carrying blaOXA-48 in a *Klebsiella pneumoniae* strain from Italy. **New microbiológica**. v. 40. p. 284-285, 2017.

GALES, A. C.; al. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008–2010). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 73, p. 354-360, 2012.

HASHEMIZADEH, Z.; KALANTAR-NEYESTANAKI, D.; MANSOURI, S. Clonal relationships, antimicrobial susceptibilities, and molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from urinary tract infections and fecal samples in Southeast Iran. **RevSocBrasMed Trop**. 51(1):44-51, 2018.

HONNEGOWDA, T. M.; et al. Epidemiological study of burn patients hospitalised at a burns centre, Manipal. **International Wound Journal**. v, 16(1). p, 79-83, 2018.

HOSSAIN, A.; et al. Plasmid-Mediated Carbapenem-Hydrolyzing Enzyme KPC-2 in an *Enterobacter* sp. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48 (11), p. 4438–4440, 2004.

HOSSEINZADEH, Z.; et al. Emerge of blaNDM-1 and blaOXA-48-like harboring carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from hospitalized patients in southwestern Iran. **Journal of the Chinese Medical Association**. V. 17, 2017.

IVERSEN, C.; et al. The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov. *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter genomospecies* 1. **BMC Evolutionary Biology**, v. 17, p.7-64, 2007.

JÁCOME, P. R.; et al. Phenotypic and molecular characterization of antimicrobial resistance and virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Recife, State of Pernambuco, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.45(6), p. 707-712, 2012.

JÁCOME, P. R. L. A.; et al. Detection of blaSPM-1, blaKPC, blaTEM and blaCTX-M genes in isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter spp.* and *Klebsiella spp.* from cancer patients with healthcare-associated infections. **Journal Medical Microbiology**. v, 65(7). p, 658-665, 2016.

JEONG, S. H.; et al. Molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamases produced by clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* from a Korean Nationwide survey. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, p.2902-2906, 2004.

KONEMAN, E.W.; ET AL. **Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido**. 6. ed. Rio de Janeiro: MEDSI Editora Médica e Científica, 2008.

KUNTAMAN, K.; et al. Occurrence and characterization of carbapenem-resistant Gram-negative bacilli: A collaborative study of antibiotic-resistant bacteria between Indonesia and Japan. **International Journal of Urology**. V. 10, p. 13787, 2018.

LAURETTI, L.; et al. Cloning and characterization of bla_{VIM}, a new integron-borne metallo-β-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.43, p.1584-1590, 1999.

LEUNGTONGKAM, U.; et al. Dissemination of blaOXA-23, blaOXA-24, blaOXA-58, and blaNDM-1 genes of *Acinetobacter baumannii* isolates from four tertiary hospitals in Thailand. **Microb. Drug Resist.** 2017.

LI, P.; et al. Characterization of a novel blaKLUC variant with reduced β-lactam resistance from an IncA/C group plasmid in a clinical *Klebsiella pneumoniae* isolate. **Frontiers Microbiology**. V, 15. P, 1908, 2018.

LI, X.; et al. Draft genome sequence of *Enterobacter cloacae* ST128, a clinical strain coproducing KPC-2 and NDM-1 carbapenemases. **Journal Globo Antimicrob. Resist.** 2017.

LIANG, W. J.; et al. Emergence and mechanism of carbapenem-resistant *Escherichia coli* in Henan, China, 2014. **Journal of Infection and Public Health**. v. 9, n. 1, p. 45-48, 2017.

LINCOPAN, N.; et al. First isolation of metallo-β-lactamase-producing multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from a patient in Brazil. **Journal of clinical microbiology**. V, 43.p, 516-519, 2005.

LOHR, B.; et al. High prevalence of multidrug-resistant bacteria in Libyan war casualties admitted to a tertiary care hospital, Germany. **Microb. Drug Resist.** v, 24(5). p, 578-584. 2017.

LOPES, A. C. S.; et al. Molecular typing of *Klebsiella pneumoniae* isolates from public hospitals in Recife, Brazil.. **Microbiological Research**. , v.160, p.37 - 46, 2005.

LOPES, A. C. S.; et al. Application of PCR ribotyping and tDNA-PCR for *Klebsiella pneumoniae* identification. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz (Impresso)**, Holanda, v. 102, p. 827-832, 2007.

LORENZONI, V. V.; et al. Evaluation of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in a tertiary-level reference hospital in Rio Grande do Sul, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. V, 50. P, 5, 2017.

MARCHAIM, D. et al. Isolation of imipenem-resistant enterobacter species: emergence of KPC-2 carbapenemase, molecular characterization, epidemiology, and outcomes. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**. [S. L.], 52 (4), p. 1413–1418, 2008.

MARCHIARO, P.; et al. Convenient microbiological assay employing cell-free extracts for the rapid characterization of Gram-negative carbapenemase producers. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.62, p.336-344, 2008.

MARGATE, E. et al. KPC-producing *Serratia marcescens* in a home-care patient from Recife, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical Sao Paulo**, v. 57, (4), p. 359–360, 2015.

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

MARRA, A. R.; et al. The Brazilian SCOPE Study Group Nosocomial Bloodstream Infections in Brazilian Hospitals: Analysis of 2,563 Cases from a Prospective Nationwide Surveillance Study. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 49, n. 5, p.1866–1871, 2011.

MATSUMURRA, Y.; et al. Genomic characterization of IMIP and VIM carbapenemase-encoding transferable plasmids of Enterobacteriaceae. **Journal Antimicrobial Chemother.** v, 73(11). p, 3034-3038, 2018.

MEDEIROS, R. D. A. Fatores de risco para a mortalidade em pacientes infectados por enterobactérias portadoras do gene blaKPC internados em um Hospital terciário de Recife-PE. 2017. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2017.

MELETIS, G.; et al. Whole Genome Sequencing of NDM-1-Producing ST11 *Klebsiella pneumoniae* Isolated in a Private Laboratory in Greece. **Microbial Drug Resistance**. V. 0, 2018.

MELGAREJO, J. L.; et al. Identification, molecular characterization, and structural analysis of the blaNDM-1 gene/enzyme from NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates. **The Journal of Antibiotics**.

MELO, R. C. A.; et al. Presence of *fimH*, *mrkD* and *irp2* virulence genes in KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Recife-PE, Brazil. **Current Microbiology** v, 69 (6), p. 824-831, 2014.

MENDES, C.; et al. *Klebsiella pneumoniae* with multiple antimicrobial resistance. **The Brazilian Journal of infectious Diseases**, v.8, p.109-111, 2004a.

MIRIAGOU, V.; et al. Imipenem Resistance in a *Salmonella* Clinical Strain Due to Plasmid-Mediated Class A Carbapenemase KPC-2. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, p.1297-1300, 2003.

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.

MULVEY, M.R.; et al. Characterization of a colistin-resistant *Salmonella enterica* 4,[5],12:i:- harbouring mcr-3.2 on a variant IncHI-2 plasmid identified in Canada. **Journal of Medical Microbiology**. V, 67(12), p. 1673-1675, 2018.

NAVA, R. G.; et al. New sequence type in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* harboring the blaNDM-1-encoding gene in Brazil. **International Journal Infectious diseases**. v, 79, p-101-103, 2018.

NEUWIRTH, C. et al. First occurrence of an IMP metallo- β -lactamase in *Aeromonas caviae*: IMP-19 in an isolate from France. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 12, p. 4486–4488, 2007.

NICOLETTI, A. G.; et al. Characterization of BKC-1 class A carbapenemase from *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in Brazil. **Antimicrobial Agents Chemother.** V, 59(9). P, 5159-5164, 2015.

NODARI, S. C.; et al. Draft genome sequence of a GES-5- producing *Serratia marcescens* isolated in southern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, p. 191-192, 2017.

NORDMANN, P.; NAAS, T.; POIREL, L. Global Spread of Carbapenemase producing Enterobacteriaceae. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 10, p. 1791, 2011.

PASKOVA, V.; et al. Characterization of NDM-Enconding plasmids from Enterobacteriaceae recovered from Czech hospitals. **Frontiers in Microbiology**. V, 9. P, 1549, 2018.

PASTERAN, F.; et al. Emergence of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Guatemala. **J. Antimicrob. Chemother.** v. 67, p. 1795–1797, 2012.

PATERSON, D. L.; BONOMO, R. A. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. **Clinical Microbiology Reviews**, v.18, p.657-686, 2005.

PAVEZ, M.; et al. Early dissemination of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.53, n. 6, p. 2702, 2009.

PEDERSEN, T.; et al. Spread of plasmid-encoded NDM-1 and GES-5 carbapenemases among extensively drug-resistant and pandrug-resistant clinical Enterobacteriaceae in Durban, South Africa. **Antimicrobial Agents Chemother.** V, 62(5). 2018.

PEIRANO, G.; et al. Carbapenem-hydrolysing beta-lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.63, n.2, p.265-268, 2009.

PELLEGRINO, F. L. P. C.; et al. *bla*_{GES} carrying *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a public hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian Journal of Infection Disease**, v.10(4), pp. 251-253, 2006.

PEREIRA, P. S.; et al. Coproduction of NDM-1 and KPC-2 in *Enterobacter hormaechei* from Brazil. **Microbial Drug Resistance**. V, 21(2). P, 234-236, 2015.

PEREIRA, P. S.; et al. Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: spread of clonal complex 11 (ST11, ST437 and ST340). **Journal Antimicrobial Chemother**. v. 68, p. 312-316, 2013.

PETRELLA, S.; et al. Genetic and structural insights into the dissemination potential of the extremely-broad-spectrum class A beta-lactamase (ESBL) KPC-2 identified in two strains of *Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae* isolated from the same patient in France. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.52, p.3725–3736, 2008.

PICÃO, R. C.; et al. Detection of GES-5-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, v. 65, n. 4, p. 796-807, 2010.

PILATO, D. V.; et al. Complete genome sequence of the first KPC-type carbapenemase-positive *Proteus mirabilis* strain from a Bloodstream infection. **American society for microbiology**. v. 4, p. 26-29, 2016.

POIREL et al. A novel IncQ plasmid type harbouring a class 3 integron from *Escherichia coli*. **Jornal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 65.n. 5. p. 1594–1598. 2009.

POLOTTO, M.; et al. Detection of *P. aeruginosa* harboring blaCTX-M-2, blaGES-1 and blaGES-5, blaIMP-1 na blaSPM-1 causing infections in Brazilian tertiary-care hospital. **BMC Infectious Diaseases**. v. 12, p. 176, 2012.

QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 20, n. 3, p. 440-458, Jul 2007.

RAHMAN, M.; et al. Prevalence and Molecular Characterization of new delhi metallo-beta-lactamases in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* from India. **Microb. Drug. Resist.** 2017.

RANG, H. P.; et al. **Farmacologia** 6°ed., Elsevier, 2006, 920p.

RECHENCHOSKI, Z. D.; et al. Antimicrobial activity evaluation and comparison of methods of susceptibility for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Enterobacter* spp. Isolates. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 48, p. 209-514, 2017.

RODRIGUES, C.; et al. KPC-3-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Portugal linked to previously circulating non-CG258 lineages and uncommon genetic platforms (Tn4401d-InFIA and Tnn4401d-IncN). **Frontiers in Microbiology**. V. 7, p. 56-59. 2017.

ROZALES, F. P.; et al. Emergence of NDM-1-producing *Enterobacteriaceae* in Porto Alegre, Brazil. **Int J InfectDis**. v. 25, p. 79–81, 2014.

ROZALES, F. P.; et al. Characterization of transformants obtained from NDM-1-producing Enterobacteriaceae in Brazil. **Infection Control & Hospital Epidemiology**. V, 38(5), p, 634-636, 2017.

RUICHÃO, L.; et al. Complete genetic analysis of plasmids carrying mcr-1 and other resistance genes in an *Escherichia coli* isolate of animal origin. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. V, 72. P, 696–699, 2016.

SANA, F.; et al. *Escherichia coli* colonizing healthy children in Tunisia: High prevalence of extra-intestinal pathovar and occurrence of non-extended-spectrum- β -lactamase-producing ST131 clone. **International Journal of Antimicrobial Agents**. V, 52. P, 878-885, 2018.

SANGER, F. et al. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. **Nature**, v. 265, n. 5596, p. 687–695, 1977.

SANTERRE, H. A. et al.; Susceptibility to ceftobiprole of respiratory-tract pathogens collected in the United Kingdom and Ireland during 2014-2015. **Infect Drug Resist.** V. 11. P, 1309-1320, 2018.

SCAVUZZI, A. M. et al. Ultrastructural changes caused by polymyxin B and meropenem in multiresistant *Klebsiella pneumoniae* carrying blaKPC-2 gene, **Journal of Medical Microbiology**, v.65, p. 1–8, 2016.

SCAVUZZI, A. M.; et al. Ultrastructural changes caused by polymyxin B and meropenem in multiresistant *Klebsiella pneumoniae* carrying bla_{KPC-2} gene. **Microbiology society**. v. 65(12), p. 1370-1377, 2017.

SELIEM, W. A.; SULTAN, A. M. Etiology of early onset neonatal sepsis in neonatal intensive care unit - Mansoura, Egypt. **Jornal of Neonatal-Perinatal Medicine**. V, 11(3), p. 323-330, 2018.

SMALLA et al. Exogenous Isolation of Antibiotic Resistance Plasmids from Piggery Manure Slurries Reveals a High Prevalence and Diversity of IncQ-Like Plasmids. **Applied and environmental microbiology**. 2000; v. 66, n. 11. p. 4854–4862.

SOLGI, H.; et al. Emergence of carbapenem resistant *Escherichia coli* isolates producing blaNDM and blaOXA-48 like carried on IncA/C and IncL/M plasmids at two Iranian university hospitals. **Elsevier**. V. 55. P. 318-323, 2017.

SONNEVEND, A.; et al. Emergence and spread of NDM-1 producer Enterobacteriaceae with contribution of IncX3 plasmids in the United Arab Emirates. **Journal of Medical Microbiology**. V, 62. P, 1044-1050, 2013.

TADA, T.; et al. Dissemination of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates with various combinations of carbapenemases (KPC, NDM-1, NDM-4, and OXA-48) and 16S rRNA methylases (RmtB and RmtC) in Vietnam. **BMC Infectious Diseases**. v 17(1), p. 467, 2017.

TAVARES, C. P.; et al. P. Molecular epidemiology of KPC-2-producing Enterobacteriaceae (non-Klebsiella pneumoniae) isolated from Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, V.82, P.326-330, 2015.

TENOVER, F.C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **American Journal of Medicine**. v. 119, p. 3-10, 2006.

THAKURIA et al. Profile of infective microorganisms causing ventilator-associated pneumonia: A clinical study from resource limited intensive care unit. **Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology**. v. 29.n. 3. p. 361-366. 2013.

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

TIJET, N.; et al. Molecular characterization of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing Enterobacteriaceae in Ontario, Canada, 2008-2011. **Open Access Journal**. v. 9, p. e116421, 2014.

TORTORA, G.J.; et al. **Microbiologia**. 8.ed. Porto Alegre: Artmed, 2012, 894 p.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. Microbiologia. 5ª ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

TUON, F. F.; et al. KPC-producing Enterobacter aerogenes infection, **The Brazilian Journal of Infectious diseases**, v.19(3), p. 324-327, 2015.

UWINGABIYE, J.; et al. Clonal diversity and detection of carbapenem resistance encoding genes among multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates recovered from patients and environment in two intensive care units in a Moroccan hospital. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**. v. 6, p. 99, 2017.

VELASCO, C.; et al. Eradication of an extensive outbreak in a neonatal unit caused by two sequential *Klebsiella pneumoniae* clones harbouring related plasmids encoding an extended-spectrum β -lactamase. **Journal of Hospital Infection**. v. 73, p. 157-163. 2009.

VILLEGAS, M. V.; et al. First detection of the plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2 in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.50, n.8, p. 2880-2882, 2006.

WEI, Z. Q.; et al. Plasmid-mediated KPC-2 in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from China. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 51, n. 2, p.763-5, 2007.

WOODFORD, N.; et al. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum β -lactamases. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, v.57, p.154-155, 2005.

WOODFORD, N.; et al. Arrival of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC carbapenemase in the United Kingdom. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, n. 6, p.1261-1264, 2008.

XIONG, J.; et al. bla IMP-9 and Its Association with Large Plasmids Carried by *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from the People ' s **Republic of China. Society**, v. 50, n. 1, p. 355–358, 2006.

YE, Y.; et al. The phenotypic and genotypic characterization of *Enterobacter sakazakii* strains from infant formula milk. **Journal of Dairy Science**. v. 93(6), p. 2315-2320, 2010.

YIGIT, H.; et al. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 2, p. 809, 2008.

YIGIT, H.; et al. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 4, p. 1151-1161, 2001.

YONG, D.; et al. Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, blaNDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 12, p. 5046-5054, 2009.

ZAHA, A. Biologia Molecular Básica. 3a Edição. Editora **Mercado Aberto** Ltda, Porto Alegre - RS. 421 páginas. 2003.

ZHAI, Y.; et al. Complete nucleotide sequence of pH11, an IncHI2 plasmid conferring multi-antibiotic resistance and multi-heavy metal resistance genes in a clinical *Klebsiella pneumoniae*. **Elsevier**. v. 86, p. 26-31, 2016.

ZHAO, W. H. et al. Identification of a plasmid-borne blaIMP-11 gene in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 61, n. 2, p. 246–251, 2012.

ZHAO, X. F.; et al. Drug resistance and dissemination of new delhi metallo- β -lactamase 1 positive bacteria in a patient. v. 51, p. 890-895, 2017.

ZHENG, B.; et al. Complete nucleotide sequences of two KPC-2-encoding plasmids from the same *Citrobacter freundii* isolate. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 7, n. 1, p. 49-56, 2017.

ZOU, D.; et al. Complete sequences of two novel blaNDM-1-harboring plasmids from two *Acinetobacter towneri* isolates in China associated with the acquisition of tn125. **A nature research journal**, 2017.

APÊNDICE A - ARTIGO - HIGH PLASMIDIAL VARIABILITY IN CLINICAL ISOLATES OF *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* HARBORING *bla*_{KPC-2} AND *bla*_{NDM-1} FROM INFECTION AND COLONIZATION IN PATIENTS OF A PUBLIC HOSPITAL IN BRAZIL.

Érica Maria de Oliveira ⁽¹⁾

Elisabeth Maria Bispo Beltrão ⁽²⁾

Alexsandra Maria Lima Scavuzzi ⁽³⁾

Elza Ferreira Firmo ⁽⁴⁾

Ana Catarina de Souza Lopes ⁽⁵⁾

Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco, Brasil

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

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

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

The overuse of β -lactam antimicrobials in hospitalized patients favored the emergence and genetic evolution of strains of *Klebsiella pneumoniae* resistant to carbapenems, being this resistance more related to the production of enzymes and mediated by conjugative plasmids. Therefore, the objective of this study was to investigate the occurrence of genes for carbapenemases, plasmid incompatibility groups (Incs), and the clonal relationship of clinical isolates of carbapenem-resistant *K. pneumoniae* from colonization and infection in patients from a public hospital in Recife- PE between 2017 and 2018. We analyzed 27 isolates of *K. pneumoniae* resistant to one or more carbapenems from colonization and infection. The isolates were submitted to the search of carbapenem resistance genes (*bla*_{KPC}, *bla*_{GES}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM} and *bla*_{IMP}), search for plasmid incompatibility groups (FIB, Q, A / C, L / M, N, HI2 and HI1B) by Polymerase Chain Reaction (PCR). The antimicrobials that showed the best activity against the isolates of *K. pneumoniae* were amikacin and colistin. The *bla*_{KPC} and *bla*_{NDM} genes were detected in 24 (88.8%) and 16 (59.2%) of the carbapenem resistant isolates of *K. pneumoniae*, respectively, and 13 (48.1%) were simultaneously positive for these two genes, both in infection and colonization isolates. There was no detection of the *bla*_{GES}, *bla*_{VIM} and *bla*_{IMP} genes. Five groups of plasmid incompatibility were detected: IncFIB (92.6%), IncQ (88.8%), IncA / C (14.8%), IncHI1B (11.1%) and IncL /), showing the great plasmidial variability of these isolates. We conclude that the accumulation of resistance determinants and the variability of plasmid Incs detected in *K. pneumoniae* isolates from colonization and infection, together with clonal dissemination, demonstrate the ability of these isolates to present and disseminate different resistance genes through plasmids.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*. Antibiotics. Plasmids.

INTRODUCTION

Klebsiella pneumoniae is clinically prominent because it is involved in a variety of Health Care Related Infections (IRAs), causing infections of the urinary tract, respiratory tract, wounds, as well as sepsis. (KUNTAMAN et al., 2018; SANTERRE et al., 2018). It is important to emphasize that one of the main factors favoring *K. pneumoniae* infection is

intestinal colonization, since colonized carriers may serve as an important reservoir for the dissemination of bacteria in the hospital environment, as well as mechanisms of resistance, since can harbor resistance genes and disseminate through conjugative plasmids, along with transposons (TENOVER, 2006; BORER et al, 2012; ZHAO et al., 2014). In addition, the use of antimicrobial agents in the treatment of acute myocardial infarction, particularly in patients with acute myocardial infarction, , and this resistance is more related to the production of beta-lactamases by these bacteria and that are mediated mainly by conjugative plasmids (Rozales et al., 2014; NODARI et al., 2017; ALBALOUSHI et al., 2018, PASKOVA et al. ; 2018).

Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC) is a beta-lactamase that has become endemic in several countries and is frequently detected in isolates of *K. pneumoniae* from Brazilian hospitals (MONTEIRO et al., 2009; CABRAL et al., 2012; (1998) found that the effect of the enzyme activity on the enzyme activity of the enzyme was similar to that of other enzymes. In addition to the KPC enzyme, resistance to carbapenems may be due to the production of other enzymes, such as metallo-beta-lactamases (IMP, VIM and NDM being the most frequent), and serine carbapenemases (including as common (Kersted et al., 2008), and the results obtained in this study are presented in Fig. Although they are detected to a lesser extent than KPC, there are reports of these other carbapenemases in enterobacteria in several countries (DROPA et al., 2010, FIROOZEH et al., 2017, LOHR et al., 2017).

The *bla_{KPC}* gene is often located on transposon Tn4401 (EILERTSON et al., 2019), which has been found in a variety of transferable plasmids (PEREIRA et al., 2013; ANDRADE et al., 2011; DALMOLIN et al., 2018;), which ensures its dispersion not only among *Klebsiella* species, but among other genera of gram-negative bacteria (Belder et al., 2018). The *bla_{KPC}* gene may also be located in non-Tn4401 (NTEKPC) elements (CHEN et al., 2014). A recent study by Cerdeira et al. (2019), detected the *bla_{KPC}* gene inserted in NTEKPC-IIId in plasmid IncQ1 in Brazil.

Also in Brazil, Andrade et al. (2011), identified the presence of *bla_{KPC}* inserted in the Incumi, IncN and IncL / M plasmids of *K. pneumoniae* in hospitals in the states of São Paulo and Rio de Janeiro. In addition, Pereira et al. (2013), studying the epidemiology of 39 KPC-producing *K. pneumoniae* clinical isolates from 12 Brazilian states, four of which were isolated from Recife-PE, were unable to determine the type of Inc responsible for the dissemination of KPC in *K. pneumoniae* from Recife-PE, Brazil, and the number of isolates analyzed could be a limitation of the study. In order to determine the genetic variability of this bacterial species, it is necessary to evaluate the genetic variability of this bacterial species

(Silva et al., 2005) and Melo et al. 2018), and due to the epidemiological importance in the screening of these plasmids harboring and disseminating resistance genes, studies characterizing the groups of plasmidial incompatibility in a larger number of clinical isolates from Recife-PE are necessary.

In the present study, it was observed that the first reports of the *bla*_{KPC} gene in *K. pneumoniae* in Brazil were in hospitals in Recife and that this gene can be easily disseminated by conjugative plasmids (Monteiro et al., 2009; Pereira et al., 2009). (*bla*_{KPC}, *bla*_{GES}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM} and *bla*_{IMP}), plasmid Incs most reported in *K. pneumoniae* (FIB, Q, A / C, L / M, N, HI2 and HI1B), and to investigate genes of resistance to carbapenems to analyze the clonal relationship of clinical isolates of *K. pneumoniae* from Recife-PE, Brazil, between 2017 and 2018.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial isolates

Twenty-seven carbapenem resistant isolates of *K. pneumoniae* from different patients and sites of infection or colonization (rectal swab) were obtained from the spontaneous demand of the laboratory of a public hospital in the city of Recife, Brazil, during the 2017 and 2018. The biochemical identification of the isolates was performed using the automated BD Phoenix™ system. The isolates were kept in frozen stock at -70 ° C with 15% glycerol.

Antimicrobial susceptibility

The minimum inhibitory concentration (MIC) for antimicrobials: Amikacin (AMI); Amoxicillin-clavulanic acid (AMC); Ampicillin (AMP); Cefazolin (CFZ); Cefepime (CPM); Cephalothin (CFL); Cefotaxime (CTX); Cefoxitin (CFO); Ceftazidime (CAZ); Ceftriaxone (CRO); Cefuroxime (CRX); Ciprofloxacin (CIP); Colistin (COL); Ertapenem (ERT); Gentamicin (GEN); Imipenem (IMI); Levofloxacin (LEV); Meropenem (MER); Piperacillin-tazobactam (PIPT); Trimethoprim-sulfamethoxazole (TRIS), was determined using automated

equipment VITEK 2 (bioMérieux). And the susceptibility profile was interpreted according to the CLSI (2019).

DNA extraction, PCR for resistance genes, Plasmid Incs and amplicon sequencing

The genomic DNA was extracted through a commercial kit (Wizard genomic DNA purification - Promega). PCR was performed to detect the resistance genes *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{GES}, *bla*_{VIM} and *bla*_{IMP}, using primers described in table 2. IncAI, Inc / IncN, , IncHI1B and IncQ, described in Table 2, since they are more commonly described groups of plasmidial incompatibility in the literature for *K. pneumoniae*. PCR products were subjected to 1.0% agarose gel electrophoresis in TBE buffer (0.089M Tris-Borate and 0.002M EDTA) and constant voltage of 100 v. The gels were visualized in ultraviolet light transilluminator and photographed by the photodocumentation system (Photocap, Vilber Lourmat). Representative positive amplicons, previously identified by PCR, were purified and subjected to DNA sequencing by the method of Sanger et al. (1997). The nucleotide sequences were analyzed by the BLAST programs (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) and will be deposited in the genbank.

Molecular typing

To evaluate the clonal relationship of the isolates, ERIC-PCR was performed according to Duan et al. (2009) and Cabral et al. (2012). The bands pattern was analyzed according to Tenover et al. 1995 and DARWIN 6.0 software was used to generate the dendrogram.

Table 1. Primers used in PCR and sequencing of amplicons for the detection of genes for carbapenemases, plasmid Incs and ERIC-PCR in the isolates of *K. pneumoniae*.

Gene	Primer	Sequência (5' - 3')	Temp. ^(a)	Tamanho do amplicon (pb)	Referência
<i>bla</i> _{KPC}	KPC-1a	TGTCACTGTATCGCCGTC	63°C	800	Yigit et al. (2001)
	KPC-1b	CTCAGTGCTCTACAGAAAACC			
<i>bla</i> _{GES}	GES-F	GAAACCAAACGGGAGACGC	60°C	207	Nordmann (2011)
	GES-R	CTTGACCGACAGAGGCAACT			
<i>bla</i> _{NDM}	NDM-F	TAAAATACCTTGAGCGGGC	52°C	439	Nordmann (2011)
	NDM-R	AAATGGAAACTGGCGACC			
<i>bla</i> _{VIM}	VIM-F	CAGATTGCCGATGGTGTGTTGG	62°C	600	Dong et al. (2008)
	VIM-R	AGG TGGGCCATTGAGCCAGA			
<i>bla</i> _{IMP}	IMP-F	GGAATAGAG TGG CTTAATTCTC	60°C	232	Dong et al. (2008)
	IMP-R	GTGATGCGTCYCCAAYTTCACT			
HI-2	IncHI-2-F	GGAGCGATGGATTACTTCAGTAC	64°C	644	Caratolli et al. (2005)
	IncHI-2-R	GGCTCACTACCGTTGTCATCCT			
L/M	IncL/M-F	GGATGAAAACCTATCAGCATCTGG	62°C	758	Caratolli et al. (2005)
	IncL/M-R	CTGCAGGGGCGATTCTTTAGG			
A/C	IncA/C-F	GAGAACCAAAGACAAAGACCTA	62°C	465	Caratolli et al. (2005)
	IncA/C-R	ACGACAAACCTGAATTGCCTCCT			
N	IncN-F	GTCTAACGAGCTTACCGAAG	62°C	559	Caratolli et al. (2005)
	IncN-R	GTTTCAACTCTGCCAAGTTC			
HI1B	HI1B-F	CAA AAC GAG AGA TAT TCAACCC	63°C	900	Dorted et al. (2012)
	HI1B-R	CTG ATT CTT GAT GAT ACA GGG			
FIB	IncFIB-F	GGAGTTCTGACACACGATTTTCG	62°C	702	Caratolli et al. (2005)
	IncFIB-R	CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT			
Q	Ori-V-F	CTCCCGTACTAACTGTCACG	61°C	436	
	Ori-V-R	ATCGACCGAGACAGGCCCTGC			
	Rep-B-F	TCGTGGTCGCGTTCAAGGTACG	64°C	1.160	Smalla et al. (2001)
	Rep-B-R	CTGTAAGTCGATGATCTGGGCGTT			
	Ori-T-F	TTCGCGCTCGTTGTTCTTCGAGC	63°C	191	
	Ori-T-R	GCCGTTAGGCCAGTTTCTCG			
NA	ERIC-1	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAAC	36°C		Duan et al., (2009)
	ERIC-2	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG			

RESULTS

Antimicrobial resistance profile

The antimicrobials that showed the best activity against the isolates of *K. pneumoniae* were amikacin (96.2%) and colistin (88.9%). Most of the isolates were resistant to the three carbapenems tested (ertapenem, imipenem and meropenem), except for the K5-A3 isolate that was sensitive to imipenem and intermediate to meropenem and from the K6-A3 isolate that was intermediate to imipenem.

Genes for beta-lactamases

The *bla*_{KPC} and *bla*_{NDM} genes were detected in 24 (88.8%) and 16 (59.2%) of the *K. pneumoniae* isolates respectively (Table 1), amplifying the expected fragments of 800 bp and 621 bp, respectively. The *bla*_{GES}, *bla*_{VIM} and *bla*_{IMP} genes were not detected in any of the isolates. The *bla*_{KPC-2} and *bla*_{NDM-1} variants were confirmed by sequencing the PCR product from representative isolates. The *bla*_{KPC} and *bla*_{NDM} genes were simultaneously positive in 13 (48.1%) of the isolates analyzed.

Groups of Plasmidial Incompatibility

FIB, Q, A / C, HI1B and L / M Inc were detected in 25 (92.6%), 24 (88.8%), 4 (14.8%), 3 (11.1%) and 2 (7.4%) of the *K. pneumoniae* isolates, respectively. Positive PCR products were sequenced for confirmation from Inc. Incs N and HI2 were not detected in any of the isolates. Two isolates (K16-A3 and K20-A3) showed only the IncFIB (Table 1); however, the other 25 isolates had more than one Inc that was investigated in this study.

Molecular typing

Twenty-seven genetic profiles were found among the 27 isolates of *K. pneumoniae* (Figure 1 and 2). Eleven isolates were related to 80% similarity (E1a profile), within that profile eight isolates were related to 100% similarity (E1 profile), where four isolates presented identical resistance profile (presence of *bla*_{KPC} and *bla*_{NDM} gene) and presence of same plasmid Incs (Q and FIB). The E2 profile grouped three isolates that were different in

both the resistance profile and the presence of the plasmid Incs. The E4 profile grouped two isolates that showed identical resistance profile (only the *bla_{KPC}* gene detected) and plasmid Incs (Q, FIB and HI1B). The E7 profile grouped three isolates, where two isolates were identical in both the resistance profile (*bla_{KPC}* and *bla_{NDM}* gene) and in the presence of plasmid Incs (Q and FIB), an isolate from that profile showed only the *bla_{KPC}* gene, but the same plasmid Incs. The isolates that were not clonally related presented resistance profile and presence of different plasmid Incs.

Comparative analysis of the presence of genes for carbapenemases, Incs and ERIC-PCR, according to the source of isolation: colonization or infection

Of the 27 isolates of *K. pneumoniae* resistant to carbapenems, 12 were from infection (blood and urine), 14 were isolated from colonization (rectal swab) and 1 isolate from cavitory drainage (Table 1). Most of the isolates from infection that had the *bla_{NDM}* gene also harbored the *bla_{KPC}* gene, with the exception of the K16-A3 isolate harboring only *bla_{NDM}*. Analyzing the isolates from colonization, it was observed that six isolates were positive for the *bla_{KPC}* and *bla_{NDM}* genes, while seven isolates of infection presented these two genes concomitantly. FIB, Q, A / C and HI1B Incs were detected in both infection and colonization isolates. IncL / M was detected only in two isolates from colonization. The isolates clonally related to ERIC-PCR came from different patients, from different hospital sectors and from both colonization and infection.

Figure 1. Agarose gel electrophoresis at 1.5% of the ERIC-PCR product of representative *K. pneumoniae* isolates. Line 1: molecular marker of 1Kb (promises), lines 2-17: isolated from *K. pneumoniae*.

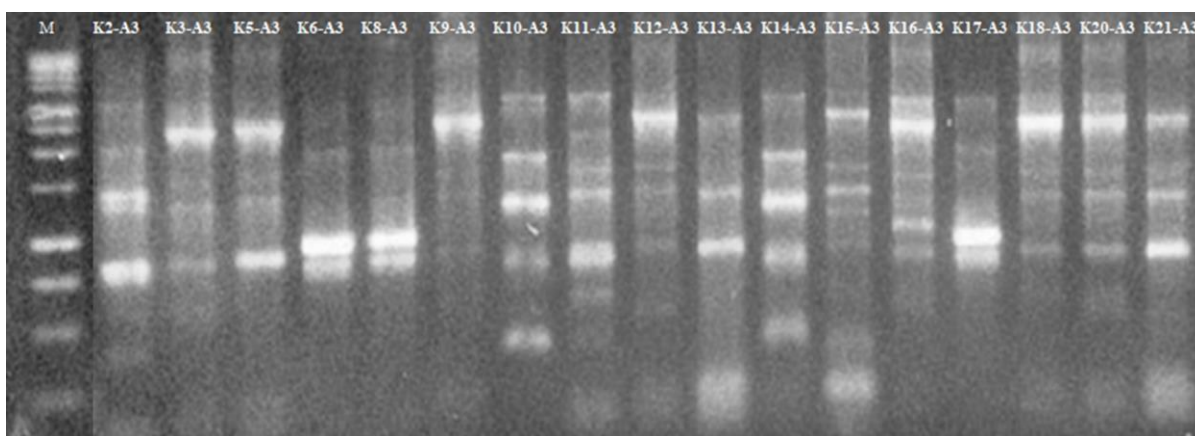
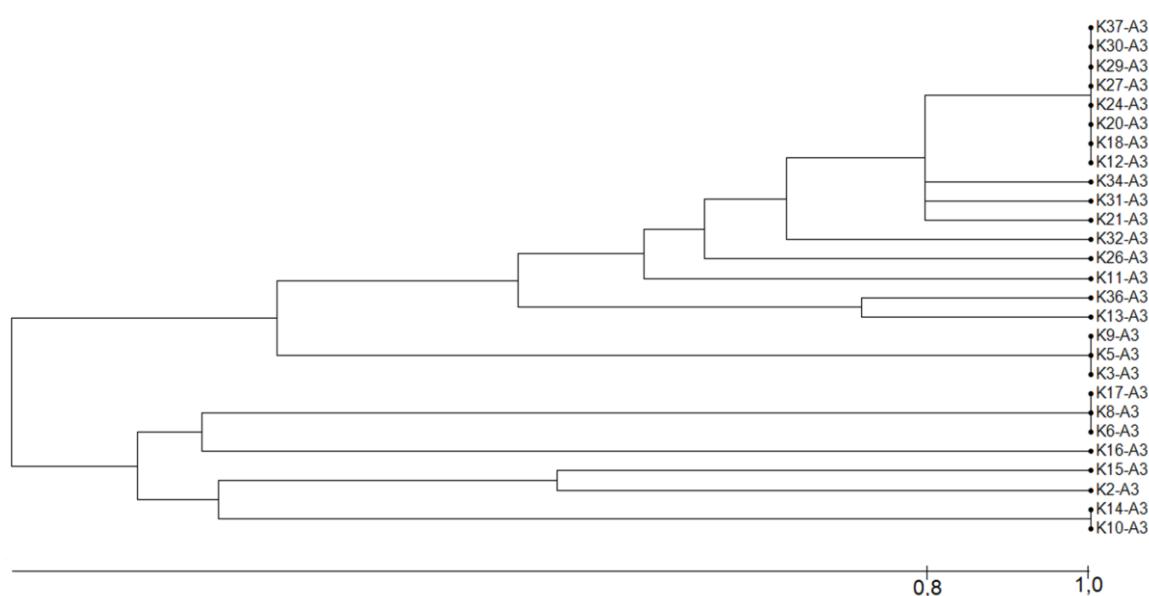


Figure 2. Dendrogram generated by ERIC-PCR using the software Darwin 6.0, illustrating the relationship of the profiles of the 27 isolates of *K. pneumoniae* resistant to carbapenems from Recife-PE, Brazil.



DISCUSSION

Most of the *K. pneumoniae* isolates evaluated in this study were resistant to all beta-lactams tested. These data justify the warning published by the CDC since 2013 showing that carbapenemase-producing enterobacteriaceae are an urgent global threat due to the high rates of antimicrobial resistance, requiring urgent and effective actions to control it. In the present

study, amikacin and colistin were the antimicrobials with the best activity against the isolates analyzed. Lorenzoni et al. (2017) in studies with carbapenem-resistant enterobacteria from a hospital in Rio Grande do Sul, Brazil, detected high rates of susceptibility to colistin and amikacin in *K. pneumoniae* isolates. The *bla_{KPC}* gene was detected in 80% of the isolates, corroborating with the data of the present study.

The rate of serine-carbapenems in *K. pneumoniae* detected in this study was 88.8%, which corresponds to the positivity for *bla_{KPC}*, 12 isolates from infection and 8 from colonization. These data highlight the persistence of the *bla_{KPC}* gene in *K. pneumoniae*, which since its detection in Recife, Brazil, in 2006 (MONTEIRO et al., 2009), remains the main carbapenemase associated with carbapenem resistant *K pneumoniae* samples in (Brazil), the Brazilian state of Rio Grande do Sul (Brazil), and several other Brazilian states, including Recife-PE (CABRAL et al., 2015, SCAVUZZI et al., 2017, ALVES et al).

Additionally, the presence of the *bla_{NDM}* gene in this study deserves to be highlighted, since it is the first report of isolates producing NDM-1 in Recife-PE. Since its detection in 2008 in New Delhi, India (YONG et al., 2009), NDM-1 producing strains have been reported in many countries, including Brazil (CARVALHO et al., 2013, 2014; ROZALES et al., 2017 , And generally associated with intra- and inter-hospital dissemination, along with travel-related epidemiological relationships. Barberino et al. (2018), were the first to report the *bla_{NDM}* gene in the Brazilian northeast, in clinical isolates of *K. pneumoniae* and *Citrobacter* in two patients admitted to a public hospital in Salvador, Bahia. Recently, Silva et al. (2019), detected the *bla_{NDM-1}* gene in different species (*K. pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Proteus stuartii*, *P. rettger*, *P. mirabilis*, *Morganella morganii*, *Acinetobacter bereziniae* and *A. baumannii* coming from nine Brazilian states, but did not include the state of Pernambuco.

The rate of occurrence of the *bla_{NDM}* gene in this study is similar to that of the *bla_{KPC}* gene. The concomitance of the *bla_{KPC}* and *bla_{NDM}* genes deserves to be highlighted by the accumulation of these genetic mechanisms of resistance in the same bacterial species. In Brazil, the accumulation of resistance determinants in *K. pneumoniae* has been cited by other authors. Nava et al. (2018), detected the simultaneous positivity of the *bla_{NDM}*, *bla_{KPC}* and *bla_{TEM}* genes in clinical isolates of *K. pneumoniae* at a university hospital in Londrina-PR. The concomitant presence of *bla_{KPC}* and *bla_{NDM}* also in colonization isolates detected in this study is worrying and reinforces the need for surveillance cultures, since colonized patients are an important reservoir for the dissemination of resistance mechanisms within the hospital environment and are the main gateway for the development of infection. The WHO (2017)

emphasizes that effective ARI prevention and control is the basis of action to combat bacterial resistance, with the identification and isolation of the colonized patient being one of the main strategies. Therefore, identifying colonized patients with strains carrying these genes and isolating these patients is an important step in preventing transmission.

It was observed in the present study that isolates of *K. pneumoniae* that despite being clonally related by ERIC-PCR presented different types of plasmids and different resistance genes. This may occur because the ERIC-PCR technique amplifies repetitive intergenic regions of the bacterial chromosome, not necessarily amplifying plasmid regions, where most of the resistance genes are located. Clonal dissemination of the isolates was observed in different sectors of the study hospital and among colonized and infected patients, this fact is important, since it makes visible the potential of dissemination of *K. pneumoniae* in the hospital environment.

The persistence of the genes that confer resistance to carbapenems is due to the clonal dissemination of the isolates and mainly the dispersion of these genes by conjugative or mobilizable plasmids. In the present study, we detected five types of Incs that according to the literature may be responsible for the dissemination of *bla*_{KPC} and *bla*_{NDM} in the isolates of *K. pneumoniae*, since all Incs detected in this study have already been described harboring resistance genes, including *bla*_{KPC} and BelaN et al., 2004), and the results obtained in this study are presented in Table 1.

The persistence of the genes that confer resistance to carbapenems is due to the clonal dissemination of the isolates and mainly the dispersion of these genes by conjugative or mobilizable plasmids. In the present study, we detected five types of Incs that according to the literature may be responsible for the dissemination of *bla*_{KPC} and *bla*_{NDM} in the isolates of *K. pneumoniae*, since all Incs detected in this study have already been described harboring resistance genes, including *bla*_{KPC} and BelaN et al., 2004), and the results obtained in this study are presented in Table 1. FIB and Q Incs were the most detected plasmids in the present study. This is the first report of IncFIB in Recife-PE, Brazil. Inhibition of the *bla*_{IMP} gene in *E. cloacae* in Japan (AOKI et al., 2018), as well as reported in Africa in *E. coli* isolates bearing the *bla*_{TEM} gene (SANA et al. , And in Europe, responsible for the dissemination of *bla*_{NDM-1}, *bla*_{SHV-12}, *bla*_{CTXM-15} and *bla*_{OXA-1} in *K. pneumoniae* (PASKOVA et al., 2018). In addition, IncFIB has been reported by Ruichao et al. (2016) in China in a sample of *E. coli* of animal origin producing *mcr-1*. The *mcr-1* gene is disseminated through plasmids and confers resistance to polymyxin, one of the antibiotics considered as a last resort for infections against multi-drug resistant gram-negative bacteria. In Brazil, only Dalmolin et al. (2018), identified a

clinical isolate of *K. pneumoniae* bearing the *mcr 1* genes, inserted into plasmid IncX4 and *bla*_{KPC-2} inserted into the plasmid IncFIB.

The second most detected Inc in the isolates of *K. pneumoniae* was IncQ, a plasmid that has been gaining prominence in some regions of Brazil, harboring resistance genes to carbapenems. Nicoletti et al. (2015) identified the *bla*_{BKC} gene inserted into an IncQ plasmid in *K. pneumoniae*. Recently, Cerdeira et al. (2019) in Brazil, detected two isolates of *K. pneumoniae* resistant to carbapenems bearing *bla*_{KPC} inserted into IncQ plasmids. According to Smalla et al. (2000) IncQ is a small plasmid that can range from 5.1-14.2 kb, which can be found in several host bacterial cells and is not conjugative but is mobilizable and promiscuous and can be transferred from one bacterium to another by conjugative plasmids present in the same bacterial cell. Considering the plasmidial variability, including conjugative plasmids, detected in the present study in *K. pneumoniae* isolates, probably IncQ can be easily disseminated to other species, as well as having an important role in potentiating the dissemination of the *bla*_{KPC} gene in Brazil (Cerdeira et al., 2019).

The A / C and L / M Incs despite being detected in a smaller number of isolates in the present study, have already been described by carrying resistance genes in different species of enterobacteria in Brazil, including *K. pneumoniae* (Andrade et al., 2011). Pereira et al. (2015), in Rio de Janeiro, detected the simultaneous presence of *bla*_{KPC} and *bla*_{NDM} genes in *E. hormaechei*, with *bla*_{NDM} inserted into IncA / C. However, only one study investigated Incs in isolates of *K. pneumoniae* from Recife-PE, Brazil, but the plasmids were not typed, and the number of isolates analyzed (only three) was a limitation of the study (Pereira et al. 2013).

Another plasmid detected in the present study was IncHI1B. To our knowledge, this is the first report of IncHI1B in Brazil. This conjugative plasmid has been reported in clinical isolates of *E. cloacae*, *K. pneumoniae*, *E. coli* and *C. freundii* carriers of the *bla*_{NDM} gene in hospitals in the United States (SONNEVEND et al., 2013). Additionally, Al Baloushi et al. (2018), also detected *K. pneumoniae* isolates carrying *bla*_{NDM} on IncHI1B in Arabia. Matsumura et al. (2018), carrying out a conjugation and transformation experiment on isolates from surveillance programs, identified the *bla*_{VIM} gene in IncLIB, IncN2, IncHI1B and IncFIB in *K. pneumoniae* from Greece and Spain. These studies show the ability of IncHI1B to harbor genes for carbapenemases in different species.

We conclude that the accumulation of resistance determinants and the variability of plasmid Incs detected in this study in both infection and colonization isolates of *K. pneumoniae* together with the clonal spread of these isolates demonstrate the ability of this species to acquire genes from resistance, as well as to disseminate them more easily, in view

of the arsenal of conjugative and mobilizable plasmids that these isolates presented. It should be emphasized the importance of early phenotypic and genetic identification of resistance mechanisms in bacterial isolates not only of infection, but also and mainly of colonization, since they are the main factor favoring the development of infection in hospitalized immunosuppressed patients.

Table 1. Primary isolation source (colonization, infection and cavitary drainage), minimal inhibitory concentration (MIC) for ertapenem, imipenem, meropenem, genes for carbapenemases, plasmid Incs and ERIC-PCR profile of *K. pneumoniae* isolates from a hospital of Recife-PE, Brazil.

Isolados	Setor	Tipo de amostra	CIM(ERT)	CIM(IMI)	CIM(MER)	Genes de resistência	Incs	ERIC-PCR
K5-A3	UTI	Dreno cavitário	>4(R)	<=1(S)	2(I)	<i>bla</i> _{KPC}	Q, FIB	E7
K6-A3	UCO2	Sangue	>4(R)	2(I)	4(R)	<i>bla</i> _{KPC}	Q, FIB	E2
K8-A3	UTI	Urina	>4(R)	>8(R)	>8(R)	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{NDM}	Q, FIB	E2
K9-A3	EG	Sangue	>4(R)	>8(R)	>8(R)	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{NDM}	Q, FIB	E7
K10-A3	UTI	Sangue	>4(R)	>8(R)	>8(R)	<i>bla</i> _{KPC}	Q, FIB, HI1B	E4
K11-A3	UCO1	Sangue	>4(R)	8(R)	4(R)	<i>bla</i> _{KPC}	Q, HI1B	E12
K12-A3	UTI	Sangue	>4(R)	>8(R)	>8(R)	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{NDM}	Q, FIB	E1
K16-A3	Cardiologia	Urina	>4(R)	>8(R)	>8(R)	<i>bla</i> _{NDM}	FIB	E3
K24-A3	UTI	Urina	>4(R)	>8(R)	>8(R)	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{NDM}	Q, FIB, A/C	E1
K26-A3	EG	Urina	>4(R)	8(R)	4(R)	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{NDM}	Q, FIB	E11
K27-A3	CM	Urina	>4(R)	>8(R)	>8(R)	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{NDM}	Q, FIB	E1
K30-A3	UCO1	Sangue	>4(R)	>8(R)	>8(R)	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{NDM}	Q, FIB	E1
K31-A3	UTI	Urina	>4(R)	>8(R)	>8(R)	<i>bla</i> _{KPC}	FIB, A/C	E1a
K2-A3	Cardiologia	Swab retal	>4(R)	(R)	(R)	<i>bla</i> _{KPC}	Q, FIB, L/M	E5
K3-A3	UCO2	Swab retal	>4(R)	>8(R)	>8(R)	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{NDM}	Q, FIB	E7
K13-A3	UCO1	Swab retal	>4(R)	>8(R)	>8(R)	<i>bla</i> _{KPC}	Q, FIB, A/C	E10
K14-A3	UCO2	Swab retal	>1(R)	>8(R)	>32(R)	<i>bla</i> _{KPC}	Q, FIB, HI1B	E4
K15-A3	Cardiologia	Swab retal	>1(R)	>8(R)	>32(R)	<i>bla</i> _{KPC}	Q, FIB	E6
K17-A3	UTI	Swab retal	>4(R)	>8(R)	>8(R)	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{NDM}	Q	E2
K18-A3	UCO1	Swab retal	>4(R)	>8(R)	>8(R)	<i>bla</i> _{KPC}	Q, FIB	E1
K20-A3	UCO1	Swab retal	>4(R)	>8(R)	>8(R)	<i>bla</i> _{NDM}	FIB	E1
K21-A3	Cardiologia	Swab retal	>4(R)	>8(R)	>8(R)	<i>bla</i> _{KPC}	Q, FIB, A/C	E1a
K29-A3	UCO	Swab retal	>4(R)	>8(R)	>8(R)	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{NDM}	Q, FIB	E1
K32-A3	UTI	Swab retal	>4(R)	>8(R)	>8(R)	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{NDM}	Q, FIB	E8

K34-A3	UTI	Swab retal	>4(R)	>8(R)	>8(R)	<i>bla</i> _{NDM}	Q, FIB	E1a
K36-A3	UCO2	Swab retal	>4(R)	>8(R)	>8(R)	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{NDM}	Q, FIB, L/M	E9
K37-A3	UTI	Swab retal	>4(R)	>8(R)	>8(R)	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{NDM}	Q, FIB	E1

K, *Klebsiella pneumoniae*; EG, General Emergency; CM, Medical Clinic; ICU, Intensive Care Unit; UCO, Coronary Unit; CIM, Minimal Inhibitory Concentration; ERT, Ertapenem, IMI, Imipenem, Mer, Meropenem, R, Resisten; I, Intermediate; S, Sensitive; +, presence of the gene; - absence of the gene; Shaded text: clinical isolates from colonization.

REFERENCES

- AGEL, A. A.; et al. Characterization of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae from patients in Amman, Jordan. **Microbial Drug Resistance**. v, 24(8), p. 1121-1127, 2018.
- AIRES, C. A.; et al. Multiclonal Expansion of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing NDM-1 in Rio de Janeiro, Brazil. **Antimicrobial Agents Chemother**. V. 61, p. 32-35, 2017.
- AL-BALOUSHI, E. A.; et al. Genetic support of carbapenemases in double carbapenemase producer *Klebsiella pneumoniae* isolated in the Arabian Peninsula. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**. v, 65(2). p, 135-150, 2018.
- ALVES, D. P.; et al. *Enterobacter cloacae* harbouring *bla*_{KPC-2} and *qnrB-1* isolated from a cystic fibrosis patient: a case report. **New Microbes New Infect**. v, 25, p. 49-51, 2018.
- AMBLER, P. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. **Biochemical Journal**, London, v. 276 (pt-1). p. 269-270. 1991.
- 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 Chemother**. v. 55, p. 3579-3583, 2011.
- ANES, J.; HURLY, M.; FANNING, S. Exploring the genome and phenotype of multi-drug resistant *Klebsiella pneumoniae* on clinical origin. **Frontiers in microbiology**. v. 8, p. 1-15, 2017.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 14: Avaliação dos indicadores nacionais das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e Resistência microbiana do ano de 2015**. Brasília, 30 de dezembro de 2016. [Internet]. Disponível em: <https://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/publicacoes/item/boletim-de-seguranca-do-paciente-e-qualidade-em-servicos-de-saude-n-13-avaliacao-dos-indicadores-nacionais-das-infeccoes-relacionadas-a-assistencia-a-saude-iras-e-resistencia-microbiana-do-ano-de-2015>.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Nota técnica nº 01/2013 medidas de prevenção e controle de infecções por enterobactérias multiresistentes**. Brasília, 17 de abril de 2013. [Internet]. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33852/271858/Nota+t%C3%A9cnica+n%C2%BA+01+de+2013/5be89853-7eca-4b4b-98e4-5096b9f5a2ec>.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Plano Nacional para a Prevenção e o Controle da Resistência Microbiana nos Serviços de Saúde**. Brasília, 15 de maio de 2017. [Internet]. Disponível em: <https://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/publicacoes/item/plano-nacional-para-a-prevencao-e-o-controle-da-resistencia-microbiana-nos-servicos-de-saude>
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Comunicação de Risco Nº 001/2013 - GVIMS/GGTES-ANVISA - Circulação de micro-organismos com mecanismo de**

resistência denominado "New Delhi Metalobetalactamase" ou NDM no Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2013b.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Nota Técnica Nº 01/2013 - Medidas de prevenção e controle de infecções por enterobactérias multiresistentes.** Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2013a.

AOKI, K.; et al. Molecular Characterization of IMIP-1-producing *Enterobacter cloacae* complex isolates in Tokyo. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** V, 62(3). 2018.

AREND, L. N. V. S. Caracterização molecular, fenotípica e epidemiológica de micro-organismos produtores de carbapenemase KPC isolados no Estado do Paraná. 2014. 68 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Interna), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

AZEVEDO, S.M.M. **Farmacologia dos Antibióticos Betalactâmicos.** Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Ciências da Saúde - Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2014.

BALELO, P. S.; et al. Detection of blaVIM-7 in an extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate belonging to ST1284 in Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.** V, 89(1), p. 80-82, 2017.

BARANIAK, A.; et al. Multiregional dissemination of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* ST258/ST512 genotypes in Poland, 2010-14. **Journal Antimicrobiology Chemother.** v. 72, p. 1610-1616, 2017.

BARBERINO, M. G.; et al. Isolation of blaNDM-producing Enterobacteriaceae in a public in Salvador, Bahia, Brazil. **The Brazilian Journal of infectious diseases.** v. 17, p. 30-32, 2018.

BELDER, D.; et al. Genetic diversity of KPC-producing *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia marcescens* and *Citrobacter freundii* isolates from Argentina. **Microbial Drug Resistance.** v, 24(7). p, 958-965, 2018.

BORER, A.; et al. Risk factors for developing clinical infection with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in hospital patients initially only colonized with carbapenem resistant *K. pneumoniae*. **American Journal Infection Control,** v.40, p. 421-5, 2012.

BRINK, A.J.; et al. Emergence of New Delhi Metallo-Beta-Lactamase (NDM-1) and *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC-2) in South Africa. **Journal Of Clinical Microbiology,** Africa, v. 2, n. 50, p.525-527, 23 nov. 2011.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of β -lactamases. **Antimicrobial agents and chemotherapy,** v.54, p.969-976, 2010.

CABRAL, A. B.; et al. Detection of bla_{KPC-2} in *Proteus mirabilis* in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical,** v. 48, (1), p. 94-95, 2015.

CABRAL, A. B.; et al. Clonal spread and accumulation of β -lactam 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**, v. 66, p. 70-77, 2017.

CABRAL, A. B.; et al. Multidrug resistance genes, including *bla*_{KPC} and *bla*_{CTX-M-2}, among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45(5), p.572-578, 2012.

CALIA, C.; et al. Carbapenemases-producing *Klebsiella pneumoniae* in hospitals of two regions of Southern Italy. **Journal of pathology, microbiology and immunology**. V. 125, p. 491-498, 2017.

CANTÓN R, OLIVER, A.; 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 (4), p. 1237–1243, 2002.

CARATOLLI, A. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. **Antimicrobial Agents Chemother.** V, 53(6). P, 2227-2238, 2009.

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

CARNEIRO, M.; et al. New carbapenases in Brazil. **Expert Rev Anti Infect Ther.** v. 12, p. 155–156, 2014.

CARRARA, M. F. E.; et al. Emergence and spread of KPC-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a Brazilian teaching hospital. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*.v. 3, p. 304-306, 2015.

CASTANHEIRA, M.; et al. Emergence of the Extended-Spectrum β -Lactamase GES-1 in a *Pseudomonas aeruginosa* Strain from Brazil: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48(6), p. 2344-2345, 2004b.

CDC - *Centers for Disease Control and Prevention*. ANTIBIOTIC RESISTANCE THREATS in the United States, 2013. [Internet]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>

CERDEIRA, L. T.; et al. Small IncQ-1 and Col-like Plasmids Harboring *bla*_{KPC-2} and non-Tn4401 Elements (NTE_{kpc-ld}) in high-risk lineages of *Klebsiella pneumoniae* CG258. **Antimicrobial Agents Chemother.** 2019.

CERQUEIRA, G.C. Multi-institute analysis of carbapenem resistance reveals remarkable diversity, unexplained mechanisms, and limited clonal outbreaks, vol. 114, n. 5, p. 1135-1140, 2017.

CHANG, M. R.; et al. The first report of infection with *Klebsiella pneumoniae* carrying the *bla*_{kpc} gene in State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 46, p. 114-5, 2013.

CHAPARRO, P. J. P. Complete Nucleotide Sequences of Two blaKPC-2-Bearing IncN Plasmids Isolated from Sequence Type 442 *Klebsiella pneumoniae* Clinical Strains Four Years Apart. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 58. n. 05. p. 2958-2960. 2014.

CHEN, L. R.; et al. Detection of plasmid-mediated IMP-1 metallo- β -lactamase and quinolone resistance determinants in an ertapenem-resistant *Enterobacter cloacae* isolate. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 10(5), p.348-354, 2009.

CHEN, L.; et al. Complete nucleotide sequence of a blaKPC harboring IncL2 plasmid and its dissemination in New Jersey and New York hospitals. **Antimicrobial Agents Chemother.** v, 10(57). p. 5019-5022, 2013.

CHEN, L.; et al. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: molecular and genetic decoding. **Trends in Microbiology**. v, 22(12). p. 686–696, 2014.

CHMELNITSKY, I. et al. Plasmid-mediated qnrB2 and carbapenemase gene *bla*_{KPC-2} carried on the same plasmid in carbapenem-resistant ciprofloxacin-susceptible *Enterobacter cloacae* isolates. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v, 52 (8), p. 2962–2965, 2008.

CUNHA, M. P. V.; et al. Pandemic extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) clonal group O6-B2-ST73 as a cause of avian colibacillosis in Brazil. **PLoSOne**. 12(6), p. 8, 2017.

CUZON, G. et al. Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produce beta-lactamase blaKPC-2 gene. **Emerging Infectious Diseases**. v. 16, n. 9, p. 1349-1356, 2010.

DA SILVA, I. R.; et al. Distribution of Clinical NDM-1-Producing Gram-Negative Bacteria in Brazil. **Microbial Drug Resistance**. v. 0, 2019.

DALMOLIN, T. V.; et al. Acquisition of the mcr-1 gene by a high-risk clone of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST437/CC258, Brazil. **Diagnostic Microbiology na Infectious Disease**. V, 90(2). P, 132-133, 2018.

DE CÁSSIA ANDRADE MELO R.; et al. Presence of fimH, mrkD, and irp2 virulence genes in KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Recife-PE, Brazil. **Current Microbiology**, v.69(6), p.824-831, 2014.

DE OLIVEIRA SANTOS, I. C.; et al. Draft genome sequence of KPC-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* recovered from a bloodstream infection sample in Brazil. **Jornal of Global Antimicrobial Resistance**. v, 15. p, 99-100, 2018.

DE SOUZA DA SILVA, A.P.; et al. *Escherichia coli* sequence type 73 as a cause of community acquired urinary tract infection in men and women in Rio de Janeiro, Brazil. **Diagnostic Microbiology & Infectious Disease**. V. 88(1), p. 69-74, 2017.

DELPHINE, G.; et al. Promoter characterization and expression of the blaKPC-2 gene in *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 72, p. 1597-1601, 2017.

- DIANCOURT, L.; et al. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. **Journal Clinical Microbiology**. 43(8): p.4178-82. 2005.
- DIXON, N. et al. IMP-27, a Unique Metallo- β -Lactamase Identified in Geographically Distinct Isolates of *Proteus mirabilis*. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 60, n. 10, p. 6418–6421, 2016.
- DOCQUIER, J. D.; et al. IMP-12, a new plasmid-encoded metallo-beta-lactamase from a *Pseudomonas putida* clinical isolate. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 47, n. 5, p. 1522–8, 2003.
- DOMENICO, P.; et al. Rapid plasmid DNA isolation from mucoid Gram-negative bacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, v.30, p.2859-2863, 1992.
- DONG, F.; et al. Characterization of multidrug-resistant and metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a paediatric clinic in China. **Chinese Medical Journal**, v.121, p.1611-1616, 2008.
- DORTET, L.; et al. NORDMANN, P. NDM-1, OXA-48 and OXA-181 carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Sultanate of Oman. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 18, p. 144-148, 2012.
- DROPA, M.; et al. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carrying the novel extended-spectrum β -lactamase gene variants *bla*_{SHV-40}, *bla*_{TEM-116} and the class 1 integron-associated *bla*_{GES-7} in Brazil. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16(6), p. 630-632, 2010.
- DUAN, H.; et al. Source identification of airborne *Escherichia coli* of swine house surroundings using ERIC-PCR and REP-PCR. **Environmental Research**, v.109, p.511-517, 2009.
- EILERTSON, B.; et al. CG258 *Klebsiella pneumoniae* isolates without β -lactam resistance at the onset of the carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* epidemic in New York City. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 74(11), p. 17-21, 2019.
- ESCOBAR P. J.A.; et al. Outbreak of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal unit in Colombia. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 57, p. 1957–1960, 2013.
- FEIZABADI, M. M.; et al. Phenotypic characterization and plasmid analysis of *Klebsiella pneumoniae* strains from Iranian patients **R. Ci. méd. biol., Salvador**, v.7, p.273-279, 2008.
- FERNANDES, R.; et al. β -Lactams: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance. **Reviews in Medical Microbiology**. v.24, p.7-17, 2013.
- FIGUEIRAL, A. C. D.; et al. *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase: an unsolvable problem? **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 9, n. 1, p. 45-48, 2015.
- FIROOZEH, F.; et al. New Delhi metallo- β -lactamase-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in hospitalized patients in Kashan, Iran. **Iran Journal Microbiology**. v. 9(5), p. 283-287, 2017.

FONSECA, L. É.; et al. Emergence of blaGES-5 in clinical colistin-only-sensitive (COS) *Pseudomonas aeruginosa* strain in Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. V.59, p. 576-577, 2007.

FORDE, B. M.; et al. Discovery of mcr-1-mediated colistin resistance in a highly virulent *Escherichia coli* lineage. **American Society for Microbiology**. V, 3(5). P, 36-38, 2018.

FROST, L., et al. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. **Nature Reviews Microbiology**. V.3. p. 722–732. 2005.

GAIBANI, P.; et al. Characterization of na IncL/M plasmid carrying blaOXA-48 in a *Klebsiella pneumoniae* strain from Italy. **New microbiológica**. v. 40. p. 284-285, 2017.

GALES, A. C.; et al. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008 2010). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 73, p. 354-360, 2012.

HASHEMIZADEH, Z.; et al. Clonal relationships, antimicrobial susceptibilities, and molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from urinary tract infections and fecal samples in Southeast Iran. **RevSocBrasMed Trop**. 51(1):44-51, 2018.

HONNEGOWDA, T. M.; et al. Epidemiological study of burn patients hospitalised at a burns centre, Manipal. **International Wound Journal**. v, 16(1). p, 79-83, 2018.

HOSSAIN, A.; et al. Plasmid-Mediated Carbapenem-Hydrolyzing Enzyme KPC-2 in an *Enterobacter* sp. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48 (11), p. 4438–4440, 2004.

HOSSEINZADEH, Z.; et al. Emerge of blaNDM-1 and blaOXA-48-like harboring carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from hospitalized patients in southwestern Iran. **Journal of the Chinese Medical Association**. V. 17, 2017.

IVERSEN, C.; et al. The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter genomospecies* 1. **BMC Evolutionary Biology**, v. 17, p.7-64, 2007.

JÁCOME, P.R.; et al. Phenotypic and molecular characterization of antimicrobial resistance and virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Recife, State of Pernambuco, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.45(6), p. 707-712, 2012.

JÁCOME, P. R. L. A.; et al. Detection of blaSPM-1, blaKPC, blaTEM and blaCTX-M genes in isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter spp.* and *Klebsiella spp.* from cancer patients with healthcare-associated infections. **Journal Medical Microbiology**. v, 65(7). p, 658-665, 2016.

JEONG, S. H.; et al. Molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamases produced by clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* from a Korean Nationwide survey. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, p.2902-2906, 2004.

KONEMAN, E.W.; ET AL. **Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido**. 6. ed. Rio de Janeiro: MEDSI Editora Médica e Científica, 2008.

KUNTAMAN, K.; et al. Occurrence and characterization of carbapenem-resistant Gram-negative bacilli: A collaborative study of antibiotic-resistant bacteria between Indonesia and Japan. **International Journal of Urology**. V. 10, p. 13787, 2018.

LAURETTI, L.; et al. Cloning and characterization of *bla_{VIM}*, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.43, p.1584-1590, 1999.

LEUNGTONGKAM, U.; et al. Dissemination of blaOXA-23, blaOXA-24, blaOXA-58, and blaNDM-1 genes of *Acinetobacter baumannii* isolates from four tertiary hospitals in Thailand. **Microb. Drug Resist.** 2017.

LI, P.; et al. Characterization of a novel blaKLUC variant with reduced β -lactam resistance from an IncA/C group plasmid in a clinical *Klebsiella pneumoniae* isolate. **Frontiers Microbiology**. V, 15, P, 1908, 2018.

LI, X.; et al. Draft genome sequence of *Enterobacter cloacae* ST128, a clinical strain coproducing KPC-2 and NDM-1 carbapenemases. **Journal Globo Antimicrob. Resist.** 2017.

LIANG, W. J.; et al. Emergence and mechanism of carbapenem-resistant *Escherichia coli* in Henan, China, 2014. **Journal of Infection and Public Health**. v. 9, n. 1, p. 45-48, 2017.

LINCOPAN, N.; et al. First isolation of metallo- β -lactamase-producing multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from a patient in Brazil. **Journal of clinical microbiology**. V, 43.p, 516-519, 2005.

LOHR, B.; et al. High prevalence of multidrug-resistant bacteria in Libyan war casualties admitted to a tertiary care hospital, Germany. **Microb. Drug Resist.** v, 24(5). p, 578-584. 2017.

LOPES, A. C. S.; et al. Molecular typing of *Klebsiella pneumoniae* isolates from public hospitals in Recife, Brazil. **Microbiological Research**. , v.160, p.37 - 46, 2005.

LOPES, A. C. S.; et al. Application of PCR ribotyping and tDNA-PCR for *Klebsiella pneumoniae* identification. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz (Impresso), Holanda**, v. 102, p. 827-832, 2007.

LORENZONI, V. V.; et al. Evaluation of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in a tertiary-level reference hospital in Rio Grande do Sul, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. V, 50, P, 5, 2017.

MARCHAIM, D. et al. Isolation of imipenem-resistant enterobacter species: emergence of KPC-2 carbapenemase, molecular characterization, epidemiology, and outcomes. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**. [S. L.], 52 (4), p. 1413–1418, 2008.

MARCHIARO, P.; et al. Convenient microbiological assay employing cell-free extracts for the rapid characterization of Gram-negative carbapenemase producers. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.62, p.336-344, 2008.

MARGATE, E.; et al. KPC-producing *Serratia marcescens* in a home-care patient from Recife, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical Sao Paulo**, v. 57, (4), p. 359–360, 2015.

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

MARRA, A. R.; et al. The Brazilian SCOPE Study Group Nosocomial Bloodstream Infections in Brazilian Hospitals: Analysis of 2,563 Cases from a Prospective Nationwide Surveillance Study. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 49, n. 5, p.1866–1871, 2011.

MATSUMURRA, Y.; et al. Genomic characterization of IMIP and VIM carbapenemase-encoding transferable plasmids of Enterobacteriaceae. **Journal Antimicrobial Chemother.** v, 73(11). p, 3034-3038, 2018.

MEDEIROS, R. D. A. Fatores de risco para a mortalidade em pacientes infectados por enterobactérias portadoras do gene blaKPC internados em um Hospital terciário de Recife-PE. 2017. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2017.

MELETIS, G.; et al. Whole Genome Sequencing of NDM-1-Producing ST11 *Klebsiella pneumoniae* Isolated in a Private Laboratory in Greece. **Microbial Drug Resistance**. V. 0, 2018.

MELGAREJO, J. L.; et al. Identification, molecular characterization, and structural analysis of the blaNDM-1 gene/enzyme from NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates. **The Journal of Antibiotics**.

MELO, R. C. A.; et al. Presence of *fimH*, *mrkD* and *irp2* virulence genes in KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Recife-PE, Brazil. **Current Microbiology** v, 69 (6), p. 824-831, 2014.

MENDES, C.; et al. *Klebsiella pneumoniae* with multiple antimicrobial resistance. **The Brazilian Journal of infectious Diseases**, v.8, p.109-111, 2004a.

MIRIAGOU, V. et al.; Imipenem Resistance in a *Salmonella* Clinical Strain Due to Plasmid-Mediated Class A Carbapenemase KPC-2. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, p.1297-1300, 2003.

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.

MULVEY, M.R.; et al. Characterization of a colistin-resistant *Salmonella enterica* 4,[5],12:i:- harbouring mcr-3.2 on a variant IncHI-2 plasmid identified in Canada. **Journal of Medical Microbiology**. V, 67(12), p. 1673-1675, 2018.

NAVA, R. G.; et al. New sequence type in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* harboring the blaNDM-1-encoding gene in Brazil. **International Journal Infectious diseases**. v, 79, p-101-103, 2018.

NEUWIRTH, C. et al. First occurrence of an IMP metallo- β -lactamase in *Aeromonas caviae*: IMP-19 in an isolate from France. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 12, p. 4486–4488, 2007.

NICOLETTI, A. G.; MARCONDES, M. F.; MARTINS, W. M.; et al. Characterization of BKC-1 class A carbapenemase from *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in Brazil. **Antimicrobial Agents Chemother.** V, 59(9). P, 5159-5164, 2015.

NODARI, S. C.; SIEBERT, M.; MATTE, S. U.; BARTH, L. A. Draft genome sequence of a GES-5- producing *Serratia marcescens* isolated in southern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, p. 191-192, 2017.

NORDMANN, P.; NAAS, T.; POIREL, L. Global Spread of Carbapenemase producing Enterobacteriaceae. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 10, p. 1791, 2011.

PASKOVA, V.; MEDVECKY, M.; SHALOVA, A. et al. Characterization of NDM-Enconding plasmids from Enterobacteriaceae recovered from Czech hospitals. **Frontiers in Microbiology**. V, 9. P, 1549, 2018.

PASTERAN, F.; ALBORNOZ, E.; FACCONI, D.; GOMEZ S.; et al. Emergence of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Guatemala. **J. Antimicrob. Chemother.** v. 67, p. 1795–1797, 2012.

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

PAVEZ, M.; MAMIZUKA, E. M.; LINCOPAN, N. Early dissemination of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.53, n. 6, p. 2702, 2009.

PEDERSEN, T.; SEKYERE, J. O.; GOVINDEN, U. et al. Spread of plasmid-encoded NDM-1 and GES-5 carbapenemases among extensively drug-resistant and pandrug-resistant clinical Enterobacteriaceae in Durban, South Africa. **Antimicrobial Agents Chemother.** V, 62(5). 2018.

PEIRANO, G.; SEKI, L.; PASSOS, V. L. V. et al. Carbapenem-hydrolysing beta-lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.63, n.2, p.265-268, 2009.

PELLEGRINO, F. L.P. C.; et al *bla*_{GES} carrying *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a public hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian Journal of Infection Disease**, v.10(4), pp. 251-253, 2006.

PEREIRA, P. S.; et al. Coproduction of NDM-1 and KPC-2 in *Enterobacter hormaechei* from Brazil. **Microbial Drug Resistance**. V, 21(2). P, 234-236, 2015.

PEREIRA, P. S. et al. Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: spread of clonal complex 11 (ST11, ST437 and ST340). **Journal Antimicrobial Chemother**. v. 68, p. 312-316, 2013.

PETRELLA, S.; et al. Genetic and structural insights into the dissemination potential of the extremely-broad-spectrum class A beta-lactamase (ESBL) KPC-2 identified in two strains of *Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae* isolated from the same patient in France. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.52, p.3725–3736, 2008.

PICÃO RC, et al. *Klebsiella pneumoniae* in Brazil. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, v. 65, n. 4, p. 796-807, 2010.

PILATO, D. V.; et al. Complete genome sequence of the first KPC-type carbapenemase-positive *Proteus mirabilis* strain from a Bloodstream infection. **American society for microbiology**. v. 4, p. 26-29, 2016.

POIREL et al. A novel IncQ plasmid type harbouring a class 3 integron from *Escherichia coli*. **Jornal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 65.n. 5. p. 1594–1598. 2009.

POLOTTO, M.; et al. Detection of *P. aeruginosa* harboring blaCTX-M-2, blaGES-1 and blaGES-5, blaIMP-1 na blaSPM-1 causing infections in Brazilian tertiary-care hospital. **BMC Infectious Diaseases**. v. 12, p. 176, 2012.

QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 20, n. 3, p. 440-458, Jul 2007.

RAHMAN, M.; PRASAD, K. N.; GUPTA, S.; Prevalence and Molecular Characterization of new delhi metallo-beta-lactamases in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* from India. **Microb. Drug. Resist.** 2017.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. **Farmacologia** 6°ed., Elsevier, 2006, 920p.

RECHENCHOSKI, Z. D.; et al. Antimicrobial activity evaluation and comparison of methods of susceptibility for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Enterobacter* spp. Isolates. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 48, p. 209-514, 2017.

RODRIGUES, C.; et al. KPC-3-Producing *Klebsiella pneumonia* in Portugal linked to previously circulating non-CG258 lineages and uncommon genetic platforms (Tn4401d-InFIA and Tnn4401d-IncN). **Frontiers in Microbiology**. V. 7, p. 56-59. 2017.

ROZALES, F. P.; et al. Emergence of NDM-1-producing *Enterobacteriaceae* in Porto Alegre, Brazil. **Int J InfectDis**. v. 25, p. 79–81, 2014.

ROZALES, F. P.; et al. Characterization of transformants obtained from NDM-1-producing Enterobacteriaceae in Brazil. **Infection Control & Hospital Epidemiology**. V, 38(5), p, 634-636, 2017.

RUICHÃO, L.; et al. Complete genetic analysis of plasmids carrying mcr-1 and other resistance genes in an *Escherichia coli* isolate of animal origin. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. V, 72. P, 696–699, 2016.

SANA, F.; et al. *Escherichia coli* colonizing healthy children in Tunisia: High prevalence of extra-intestinal pathovar and occurrence of non-extended-spectrum- β -lactamase-producing ST131 clone. **International Journal of Antimicrobial Agents**. V, 52. P, 878-885, 2018.

SANGER, F.; et al. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. **Nature**, v. 265, n. 5596, p. 687–695, 1977.

SANTERRE H. A, et al. Susceptibility to ceftobiprole of respiratory-tract pathogens collected in the United Kingdom and Ireland during 2014-2015. **Infect Drug Resist**. V. 11. P, 1309-1320, 2018.

SCAVUZZI, A. M. et al. Ultrastructural changes caused by polymyxin B and meropenem in multiresistant *Klebsiella pneumoniae* carrying blaKPC-2 gene, **Journal of Medical Microbiology**, v.65, p. 1–8, 2016.

SCAVUZZI, A. M.; et al. Ultrastructural changes caused by polymyxin B and meropenem in multiresistant *Klebsiella pneumoniae* carrying bla_{KPC-2} gene. **Microbiology society**. v. 65(12), p. 1370-1377, 2017.

SELIEM, W. A.; SULTAN, A. M. Etiology of early onset neonatal sepsis in neonatal intensive care unit - Mansoura, Egypt. **Jornal of Neonatal-Perinatal Medicine**. V, 11(3), p. 323-330, 2018.

SMALLA et al. Exogenous Isolation of Antibiotic Resistance Plasmids from Piggery Manure Slurries Reveals a High Prevalence and Diversity of IncQ-Like Plasmids. **Applied and environmental microbiology**. 2000; v. 66, n. 11. p. 4854–4862.

SOLGI, H.; et al. Emergence of carbapenem resistant *Escherichia coli* isolates producing blaNDM and blaOXA-48 like carried on IncA/C and IncL/M plasmids at two Iranian university hospitals. **Elsevier**. V. 55. P. 318-323, 2017.

SONNEVEND, A.; et al. Emergence and spread of NDM-1 producer Enterobacteriaceae with contribution of IncX3 plasmids in the United Arab Emirates. **Journal of Medical Microbiology**. V, 62. P, 1044-1050, 2013.

TADA, T.; et al. Dissemination of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates with various combinations of carbapenemases (KPC, NDM-1, NDM-4, and OXA-48) and 16S rRNA methylases (RmtB and RmtC) in Vietnam. **BMC Infectious Diseases**. v 17(1), p. 467, 2017.

TAVARES, C. P.; al. P. Molecular epidemiology of KPC-2-producing Enterobacteriaceae (non-Klebsiella pneumoniae) isolated from Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, V.82, P.326-330, 2015.

TENOVER, F.C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **American Journal of Medicine**. v. 119, p. 3-10, 2006.

THAKURIA.; et al. Profile of infective microorganisms causing ventilator-associated pneumonia: A clinical study from resource limited intensive care unit. **Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology**. v. 29.n. 3. p. 361-366. 2013.

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

TIJET, N.; et al. Molecular characterization of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing Enterobacteriaceae in Ontario, Canada, 2008-2011. **Open Access Journal**. v. 9, p. e116421, 2014.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 8.ed. Porto Alegre: Artmed, 2012, 894 p.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. Microbiologia. 5ª ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

TUON, F. F.; et al. KPC-producing Enterobacter aerogenes infection, **The Brazilian Journal of Infectious diseases**, v.19(3), p. 324-327, 2015.

UWINGABIYE, J.; et al. Clonal diversity and detection of carbapenem resistance encoding genes among multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates recovered from patients and environment in two intensive care units in a Moroccan hospital. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**. v. 6, p. 99, 2017.

VELASCO, C.; et al. Eradication of an extensive outbreak in a neonatal unit caused by two sequential *Klebsiella pneumoniae* clones harbouring related plasmids encoding an extended-spectrum β -lactamase. **Journal of Hospital Infection**. v. 73, p. 157-163. 2009.

VILLEGAS, M. V.; et al. First detection of the plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2 in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.50, n.8, p. 2880-2882, 2006.

WEI, Z. Q.; et al. Plasmid-mediated KPC-2 in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from China. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 51, n. 2, p.763-5, 2007.

WOODFORD, N.; et al. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum β -lactamases. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, v.57, p.154-155, 2005.

WOODFORD, N.; et al. Arrival of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC carbapenemase in the United Kingdom. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, n. 6, p.1261-1264, 2008.

XIONG, J. et al. bla IMP-9 and Its Association with Large Plasmids Carried by *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from the People ' s **Republic of China. Society**, v. 50, n. 1, p. 355–358, 2006.

YE, Y.; et al. The phenotypic and genotypic characterization of *Enterobacter sakazakii* strains from infant formula milk. **Journal of Dairy Science**. v. 93(6), p. 2315-2320, 2010.

YIGIT, H.; et al. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 2, p. 809, 2008.

YIGIT, H.; et al. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 4, p. 1151-1161, 2001.

YONG, D.; et al. Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, blaNDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 12, p. 5046-5054, 2009.

ZAHA, A. Biologia Molecular Básica. 3a Edição. Editora **Mercado Aberto** Ltda, Porto Alegre - RS. 421 páginas. 2003.

ZHAI, Y.; et al. Complete nucleotide sequence of pH11, an IncHI2 plasmid conferring multi-antibiotic resistance and multi-heavy metal resistance genes in a clinical *Klebsiella pneumoniae*. **Elsevier**. v. 86, p. 26-31, 2016.

ZHAO, W.-H. et al. Identification of a plasmid-borne blaIMP-11 gene in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Medical Microbiology**, v. 61, n. 2, p. 246–251, 2012.

ZHAO, X. F.; et al. Drug resistance and disseminaion of new delhi metallo- β -lactamase 1 positive bactéria in a patient. v. 51, p. 890-895, 2017.

ZHENG, B.; et al. Complete nucleotide sequences of two KPC-2-encoding plasmids from the same *Citrobacter freundii* isolate. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 7, n. 1, p. 49-56, 2017.

ZOU, D.; et al. Complete sequences of two novel blaNDM-1-harboursing plasmids from two *Acinetobacter towneri* isolates in China associated with the acquisition of tn125. **A nature research journal**, 2017.